

Aus der  
Klinik für Innere Medizin III  
mit den Schwerpunkten Kardiologie und Angiologie  
(Direktor: Prof. Dr. med. Norbert Frey)  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Untersuchung zur  
genetischen Prädisposition  
der koronaren Herzkrankheit des jüngeren Menschen  
anhand des CARD 15- Gens**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**Cathrin Wilkesmann**

aus Kiel

Kiel 2011

**1. Berichtstatter: Priv.-Doz. Dr. El-Mokhtari, Krankenhaus Rendsburg**

**2. Berichtstatter: Prof. Dr. Fändrich, Klinik für angewandte Zelltherapie**

**Tag der mündlichen Prüfung: 15.02.2011**

**Zum Druck genehmigt, Kiel, den 03.01.2011**

**gez. Prof. Dr. Dr. I. Cascorbi**

### **Abkürzungsverzeichnis:**

ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body Mass Index
BSA	bovine serum albumine
CARD	caspase recruitment domain
DNA	Desoxy ribonuclein acid
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IKK	I kappaB - Kinase
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low density lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	Leucin-rich repeat
MDP	Muramyldipeptid
NBD	nucleotide-binding domain
NF kappa B	Nuclear factor
NLR	nucleotide-binding oligomerization domain like receptors
NOD	nucleotide-binding domain
OR	Odds Ratio
PAMPs	Pathogen-associated molecules pattern
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PGN	Peptidoglycane
PRR	Pattern recognition receptor
PTCA	Percutane transluminale Coronarangiographie
RICK	receptor-interacting serine/threonine kinase
Rpm	Rounds per minute
SNP	Single Nucleotide Polymorphisms
TLR	Toll like receptors
TNF	Tumornekrosefaktor
WHO	World Health Organization

## **Inhaltsverzeichnis:**

1. Einleitung	
1.1 Die koronare Herzerkrankung	1
1.2 Die Relevanz der Vererbung in der Ätiologie der KHK	3
1.3 Coding SNPs, Polymorphismus	3
1.4 Die Rolle des Immunsystems in der Entstehung der KHK	5
1.5 Angeborenes Immunsystem und NOD2	5
1.6 Fragestellung	7
2. Material und Methoden	
2.1 Fall-Kontroll Studien	8
2.2 Beschreibung von PopGen	8
2.3 Patientenkollektivbeschreibung	9
2.4 Genotypisierung (Taqman®, PCR, Sonden, Primer)	10
2.4.1 Die DNA-Präparation	11
2.4.2 Das Prinzip der Polymerase Chain Reaction (PCR)	12
2.4.3 NOD2-Immunhistologie und Fluoreszenzmikroskopie	13
2.4.4 Die statistische Analyse	14
3. Ergebnisse	
3.1 Expressionsort von NOD2 in Koronararterien	16
3.2 Analyse von CARD15 Varianten bei Patienten mit einer KHK	16
4. Diskussion	18
5. Zusammenfassung	21
6. Literaturverzeichnis	23
7. Danksagung	28
Anhang	

# 1. Einleitung

## 1.1 Die koronare Herzerkrankung

Die koronare Herzerkrankung (KHK) ist, trotz sinkender Sterberaten in vielen Industrienationen, wie auch in Deutschland, nach wie vor eine Volkskrankheit und eine der häufigsten Ursachen für Morbidität und Mortalität in Deutschland (53). Die bedrohlichste klinische Manifestation der KHK ist der Herzinfarkt, der im akuten Stadium eine hohe Letalität aufweist. Aktuelle epidemiologische Daten belegen eine akute Letalität von 50% aller Patienten mit Herzinfarkten (53). Darüber hinaus ist die KHK eine Hauptursache für die Herzinsuffizienz, die sich als Folge eines überlebten Herzinfarktes manifestiert oder aufgrund einer kontinuierlich abnehmenden myokardialen Durchblutung entsteht.

Die koronare Herzkrankheit ist die Manifestation der Atherosklerose in den Herzkranzarterien. Als Atherosklerose wird eine chronische, systemische Inflammation der Gefäßwände großer und mittelgroßer Arterien bezeichnet (46). Gemäß der WHO ist die Atherosklerose definiert als eine variable Kombination von Intimaveränderungen, bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut- und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Calciumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Media der Arterien (47).

Die Entstehung der Atherosklerose wird von unbeeinflussbaren genetischen Faktoren von exogenen Faktoren wie Nikotinabusus, Hyperlipidämie, arterieller Hypertonie und Diabetes mellitus hauptsächlich bestimmt (54). Dabei wurde der Hypercholesterinämie über die letzten 50 Jahre eine überragende Rolle in der Atherogenese zugeschrieben. So wurde lange Zeit die Atherosklerose in erster Linie als Cholesterinspeicherkrankheit angesehen, die durch passive Ablagerung von Fetten in den Arterienwänden verursacht wird. Nachgewiesen wurde bei Patienten mit einer familiären Hypercholesterinämie, einer seltenen genetischen Erkrankung mit einem Defekt des "low density lipoprotein" (LDL) Rezeptors, ein exzessiv erhöhter Blutcholesterinspiegel, vergesellschaftet mit einer hohen Inzidenz an Herzinfarkten in frühen Lebensjahren. Diese Patienten erleiden bereits in sehr jungen

Jahren Herzinfarkte (17). Die „lipoprotein-induced atherosclerosis Hypothese“ wurde von Joseph Leonard Goldstein aufgestellt, der für diese Arbeiten 1985 den Nobelpreis erhielt. Hierin wird das oxidativ modifizierte low-density lipoprotein (oxLDL) als Initiator der Atherosklerose dargestellt. So wird das durch Acetylierung des Proteinanteils chemisch modifizierte LDL zügig von Makrophagen aufgenommen, wodurch es zur Ausbildung von Schaumzellen kommt. Durch verschiedene Stimuli wie z.B. oxidiertes LDL werden chronische Entzündungsprozesse aufrechterhalten und die typischen atherosklerotischen Gefäßwandveränderungen bis hin zur Bildung von Fibrinablagerung und Ausbildung von lokalen Nekrosezonen hervorgerufen (4; 14; 49; 52).

Eine kardiovaskuläre Erkrankung ist jedoch auch bei genetisch prädisponierten Patienten nicht in jedem Fall als Folge eines deutlich erhöhten Cholesterinspiegels zu beobachten (37). Epidemiologischen Untersuchungen zu Folge sind die klassischen Risikofaktoren nur für etwa 50% der Erkrankungsfälle einer Atherosklerose verantwortlich (63). Zudem ist die Kontrolle der Krankheitsaktivität nur bei einem Teil der betroffenen Patienten durch eine Kontrolle der Hyperlipidämie sowie anderer Riskofaktoren möglich. Daher werden zusätzliche pathogenetische Faktoren vermutet. Anhand zahlloser klinischer und experimenteller Befunde ist belegt, dass chronisch-entzündliche Prozesse die entscheidende Rolle in der Pathophysiologie der Atherosklerose spielen (23). Bereits Mitte des vorletzten Jahrhunderts wurde von Rudolf Virchow die Bedeutung von inflammatorischen Prozessen der Arterienwand diskutiert, das Konzept der Inflammation der Arterienwand ist damit nicht neu (60).

In den 70-er Jahren des letzten Jahrhunderts wurde die „Response-to-injury“ - Theorie zur Entstehung der Atherosklerose erstmals vom amerikanischen Pathologen Russell Ross aufgestellt. Diese Hypothese (50) besagt, dass unterschiedlichste schädigende Reize zu immer gleichen pathologischen Reaktionen der Gefäßwand führen. Die Reaktion der Arterien ist gekennzeichnet durch entzündliche Reaktionen. Der Beginn atherosklerotischer Veränderungen ist durch eine Endotheldysfunktion mit vermehrter Expression von Adhäsionsmolekülen charakterisiert. Diese Adhäsionsmoleküle sind wiederum ausschlaggebend für die Migration und Penetration von, vor allem, Makrophagen und spezifischen T-Lymphozyten. Diese Entzündungszellen bewirken eine lokale Freisetzung von

Zytokinen und Wachstumsfaktoren. Durch Proliferation, Migration glatter Muskelzellen aus der Media in die Intima und die durch Fetteinlagerung verursachte Bildung von Schaumzellen, kommt es im weiteren Verlauf zur Ausbildung von atherosklerotischen Plaques.

## **1.2 Die Relevanz der Vererbung in der Ätiologie der KHK**

Die genetische Prädisposition in Kombination mit individuellen Umweltfaktoren hat einen großen Einfluss auf die Entstehung einer koronaren Herzkrankheit (54). Hierbei gilt, dass mit sinkendem Manifestationsalter der genetische Einfluss stärker wird (5). So liegt der Einfluss genetischer Faktoren in höherem Lebensalter eine KHK zu entwickeln bei 15-30%, unter 55 Jahren schon bei 63%. Erkrankt man vor dem 46. Lebensjahr, liegt der Einfluss bei 90 % (48).

Obwohl der KHK in seltenen Fällen monogene Ursachen zugrunde liegen, wie z.B. bei der familiären Hyperlipoproteinämie, ist sie doch, im Gegensatz zur monogenen Erkrankungen wie z.B. die Cystische Fibrose, ein komplexes polygenes und multifaktorielles Krankheitsbild. Sowie der negative Einfluss von Nikotinabusus (32; 38; 43), Hyperlipidämie (6; 7; 31) und Bluthochdruck (30; 51; 56; 57) auf die Entstehung und Schwere der KHK wissenschaftlich belegt werden konnte, so wurden bereits einige Gene auf ihre Krankheitsrelevanz untersucht und Varianten (wie z.B. ApoE) detektiert, die mit einer signifikant erhöhten Wahrscheinlichkeit eine koronare Herzerkrankung zu entwickeln, einhergehen.

## **1.3 Coding SNPs, Polymorphismus**

Die Single-Nucleotid-Polymorphismen (SNPs) sind Gensequenzen mit einfachem Basenaustausch und Grundlage für die genetischen Unterschiede zwischen einzelnen Menschen (33). Cooper et al. (10) konnten zeigen, dass 90% aller Variationen im menschlichen Genom SNPs sind, welche in einem Abstand von 200 bis 300 Basenpaaren auftreten. Ihnen kommt in der heutigen Erforschung von Krankheiten eine wichtige Rolle zu, da Polymorphismen im Gegensatz zu Mutationen

Veränderungen im Erbgut darstellen, die mit einer Häufigkeit von mindestens 1% in der Bevölkerung auftreten. In ihrer Eigenschaft, niedrige Mutationsraten aufzuweisen und aufgrund ihrer Häufigkeit können sie als genetische Marker bei der Orientierung auf zu untersuchenden Gensequenzen (7) eingesetzt werden und sind statistischen Analysen gut zugänglich.

SNPs kommen in Promotorregionen, in nicht-kodierenden Introns und in kodierenden Exons als sogenannte cSNPs vor. Sie können in allen Genabschnitten Wirkungen auf die Replikation und den Aufbau des zu kodierenden Proteins ausüben, wobei ein Basenaustausch im cSNP direkt die Aminosäuresequenz eines Proteins verändern kann. Nicht unerwartet zeigt sich aber eine geringere Nukleotid-Diversität in Protein kodierenden Bereichen (Exons) im Vergleich zu nichtkodierenden Bereichen (Introns). Diese Beobachtung ist konsistent mit der Erwartung, dass auf der Variabilität in kodierenden Bereichen ein größerer negativer Selektionsdruck lastet (9). Mittlerweile weiß man, dass auch Introns eine regulatorische Funktion zukommt, indem sich beispielsweise die für den Spleißvorgang notwendigen Erkennungssequenzen auf ihren Abschnitten befinden. Somit können Abweichungen in diesen Sektoren zu Basenverschiebungen, nachfolgend zu Ablesefehlern und daraus resultierendem Funktionsdefekt im Protein führen (34). In Promotorregionen der DNA können SNPs für gesteigerte oder verminderte Replikationsraten eines Proteins verantwortlich sein.

Dadurch, dass der genetische Code degeneriert ist, das heißt mehrere Basensequenzen für ein und dasselbe Endprodukt kodieren können, bewirken SNPs im kodierenden Exon-Bereich häufig keinen Aminosäureaustausch im entsprechenden Protein. Dies und die Tatsache, dass genetische Variationen im nicht-kodierenden Intron-Bereich 50% häufiger vorkommen als im Exon-Abschnitt, aus den Variationen jedoch häufig keine biologisch relevanten Effekte resultieren, fanden Halushka et al. (19) in ihren Studien heraus.

Mehrere Argumente sprechen dafür, weitere Analysen von SNPs durchzuführen. Sie können zur Klärung genetischer Hintergründe verschiedener Erkrankungen, sowie unterschiedlicher pharmakologischer Wirkung bestimmter Medikamente beitragen.



## **1.4 Die Rolle des Immunsystems in der Entstehung der KHK**

Die Relevanz der erworbenen und der angeborenen Immunität in der Entstehung und Progression der Arteriosklerose konnte in den letzten Jahren aufgezeigt werden. Interessanterweise wird eine Vielzahl der zellulären und molekularen Prozesse der chronischen Entzündung, die das pathologische Korrelat der Arteriosklerose darstellt, durch die gleichen Mechanismen vermittelt, die den Organismus vor mikrobiellen Invasionen schützt (23). Neben erworbenen spezifischen Abwehrmechanismen höher entwickelter Lebewesen, existiert ein phylogenetisch älteres, unspezifisch agierendes Immunsystem, das die körpereigene Integrität vor mikrobieller Invasion schützt. In diesem angeborenen Immunsystem werden Mustererkennungsstrategien angewandt, die sich schon bei primitiven Organismen als effizient erwiesen haben. Diese Mustererkennungsstrategien beruhen auf der Erkennung mikrobieller Pathogene über Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, den „pattern recognition receptors“ (PRRs), die Pathogene an unveränderlichen molekularen Mustern erkennen. Diese Muster, meist Bakterienzellwandbestandteile wie Lipopolysaccharide (LPS), Mucopolysaccharide und Peptidoglykane (PGN), werden als pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) bezeichnet (2; 28). Durch die Bindung der PRRs an Liganden werden Effektormechanismen des angeborenen Immunsystems induziert und adaptive Immunreaktionen aktiviert.

## **1.5 Angeborenes Immunsystem und NOD2**

Die wichtigsten Vertreter der PRRs sind die membrangebundenen Toll-like receptoren (TLRs), die als Rezeptoren für die Erkennung von bakteriellen Strukturen dienen. Neben den membrangebundenen PRRs gibt es eine große Familie cytosolständiger Rezeptoren, die Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors (NLRs), deren prominenteste Vertreter die nucleotide-binding oligomerisation domain (NOD) Proteine sind. NOD1, das vom caspase recruitment domain 4 Gen (CARD4) codiert wird, und NOD2, das vom caspase recruitment domain 15 Gen (CARD15) codiert wird, erkennen beide an Bakterienzellwänden vorhandene Peptidoglykane (PGN). NOD1 und NOD2 werden von Antigen

präsentierenden und Epithelzellen exprimiert. Die Struktur der NODs besteht aus drei Bestandteilen: einer C (Carboxy) Terminalen leucine-rich repeat (LRR) Domäne, die der Ligandenerkennung dient, einer zentralen NODomäne, die ATPase Aktivität besitzt und zur (*Selbst-*) Oligomerisation befähigt (41) ist und einer N-(amino) Terminalen CARDomäne, die Protein-Protein oder CARD-CARD Interaktionen dient. NOD2 weist zwei Besonderheiten auf, die es deutlich vom NOD1 unterscheiden. Zum einen besitzt es zwei CARD Domänen am N-Terminalen Ende, zum anderen kann es durch seine Fähigkeit, das in allen Bakterienzellwänden vorhandene Muramyl-dipeptid (MDP) zu erfassen, grampositive und gramnegative Bakterien erkennen (8). Die Expression von NOD2 wird durch verschiedene Cytokine geregelt. Im Falle der Epithelzellen steigert Tumornekrosefaktor (TNF) die Expression von NOD2, wobei dieser Prozess durch Interferon gamma (IFN $\gamma$ ) verstärkt wird. Nuclear-factor kappaB (NF- $\kappa$ B) Bindungsstellen im CARD15 Promotor sind ebenfalls an der Antwort auf TNF beteiligt, was bedeutet, dass die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch NOD2 auch zu einer Selbstaktivierung führt (58). Für die Antigen präsentierenden Zellen konnte kein ähnlicher Signalweg gezeigt werden. Man geht davon aus, dass hier Typ1 IFN vermittelte Signalwege eine Rolle spielen, da Mäuse (wildtyp), die IFN defizient waren, keine NOD2 Steigerung aufwiesen (55). Heften sich nun Liganden an die LRR Domäne, kommt es zu einer Konformationsänderung, NOD2 oligomerisiert sich und kann so über CARD-CARD Interaktion die receptor-interacting serine/threonine kinase (RICK) rekrutieren (27; 38; 59). Die Aktivierung der receptor-interactingserine/threonine kinase RICK führt zu K63 (Lys63)-linked polyubiquitylation von IKK $\gamma$ , dem Gerüst des Inhibitors des NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B)-kinase complex (I kappaB Kinase Komplex), der aus IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  besteht (1). Nachfolgend kommt es zur Phosphorylation von IKK $\beta$  und I $\kappa$ B, was zur Freisetzung von nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) und seiner Translokation zum Zellkern führt (58).

Aufgrund des Umstandes, dass NOD2 eine Rolle in der Einleitung einer Immunantwort und in entzündlichen Prozessen spielt, wurde ein besonderes Augenmerk auf Assoziationen genetischer Veränderungen des CARD15-Genes mit Inflammation gelegt. In zwei Fällen bestätigte sich die Vermutung, dass Mutationen in CARD15-Gen mit chronischen Entzündungsprozessen assoziiert sind. So konnte nachgewiesen werden, dass eine Phänotyp-Genotyp-Assoziation zwischen dem

Card15-Gen und dem Morbus Crohn (20; 21; 26), dem Blau-Syndrom (40) und Graft versus Host disease (25) bestehen.

Im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen ist es bemerkenswert, dass beide NOD-Proteine in Endothelzellen nachgewiesen werden konnten (11; 16; 44). Darüber hinaus war in atherosklerotischen Läsionen und nach pro-inflammatorischer Stimulation eine Hochregulierung der Gene TLR2 und TLR4 sowie NOD1 und NOD2 nachweisbar. (13; 15 ; 44; 64)

## **1.6 Fragestellung**

Die zentrale Bedeutung der NOD2/CARD15 Polymorphismen in der Entstehung chronisch entzündlicher Erkrankungen wie z.B. dem Morbus Crohn und dem Blau-Syndrom konnte in der Vergangenheit bereits nachgewiesen werden.

Die vorliegende Arbeit soll untersuchen inwiefern bei der ebenfalls auf dem Boden inflammatorischer Prozesse entstehenden KHK eine Assoziation mit den bekannten CARD15 – Mutationen besteht und ob ein Nachweis von NOD2 in atherosklerotischen Plaques möglich ist.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Fall-Kontroll-Studien**

Fall-Kontroll-Studien sind leistungsfähige und effiziente retrospektive Studiendesigns, die es ermöglichen Assoziationen zwischen genetischen Markern und Phänotypen genetisch komplexer Krankheiten aufzuspüren (36). Es werden Stichproben, die aus erkrankten Personen bestehen (Fall), und Stichproben, die aus gesunden Personen bestehen (Kontrolle), miteinander verglichen und in beiden Gruppen wird ermittelt, ob in der Vergangenheit eine Exposition gegenüber potentiellen Risikofaktoren vorlag. Finden sich signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen, kann man zwar von einer Korrelation zwischen Erkrankung und Risikofaktoren ausgehen, jedoch nicht von einem Ursache- Wirkungsprinzip.

### **2.2 Beschreibung von PopGen**

PopGen ist eine Biodatenbank, deren Abkürzung für „populationsgenetische Rekrutierung von Patienten zur Analyse komplexer genetischer Phänotyp-Genotyp Zusammenhänge“ steht. Dieses Projekt hat sich zum Ziel gesetzt, über die molekulargenetische Erforschung von komplexeren Erkrankungen krankheitsrelevante Gene zu detektieren. Um zu erkennen, inwieweit Kandidatengene für den Durchschnittspatienten aus der Allgemeinbevölkerung relevant sind, wird versucht, alle Patienten mit einer bestimmten Erkrankung aus Nord Schleswig-Holstein anzusprechen. Um vergleichbare Daten zu sammeln, werden (ehemalige) Patienten als Fälle in die Datenbank eingebracht. Die Kontrollen rekrutiert man per Zufallsprinzip über das Einwohnermeldeamt. In Frage kommende Personen werden angeschrieben, mit der Bitte, Fragebögen zu bearbeiten sowie eine Blutprobe abzugeben. Die weitere Vorgehensweise besteht darin, DNA aus den gewonnenen Blutproben zu extrahieren und genau definierte Sequenzen zu untersuchen. Um sicherzustellen, dass kein Datenmissbrauch betrieben werden kann, werden alle Analysen anonym durchgeführt. Hierüber wachen

Ethikkommission und Datenschutzbeauftragte. Die Hoffnung des Projektes PopGen liegt darin, über das Anlegen einer möglichst umfassenden Biodatenbank krankheitsrelevante Zusammenhänge zu erkennen und wirkungsvollere Diagnostiken und Therapien zu entwickeln, um somit eine sinnvolle Prävention und eine Kosten sparende Medizin zu ermöglichen (35).

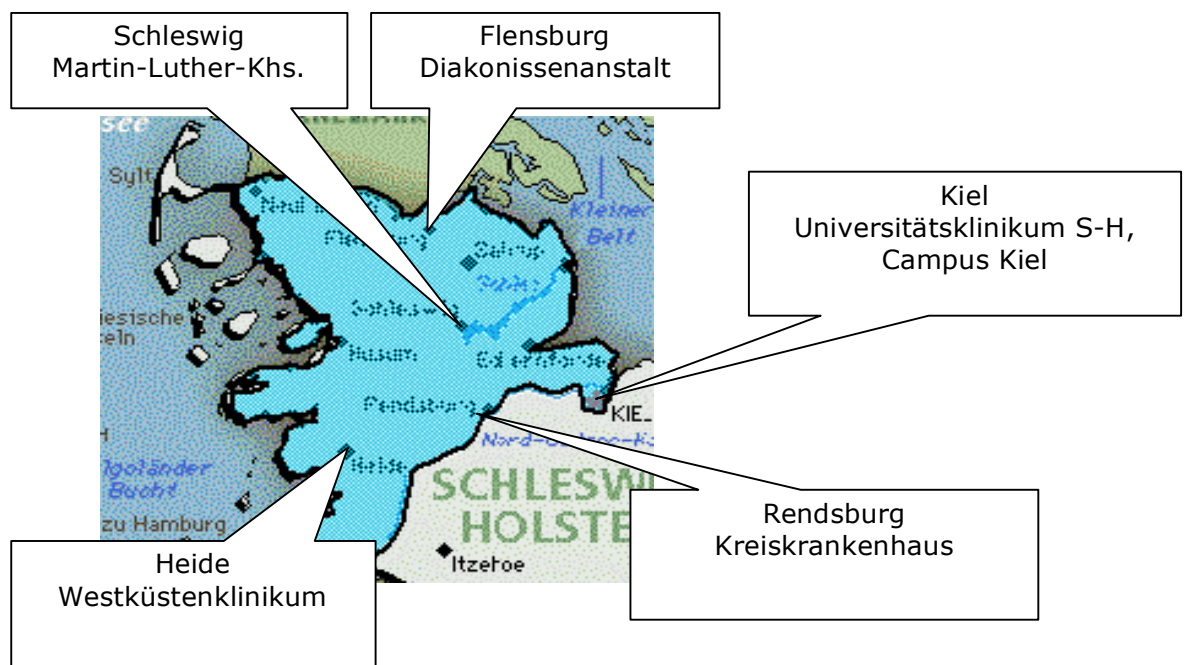


Abb. 1 Am KHK-Popgen-Projekt nahmen alle fünf Kliniken im Untersuchungsgebiet mit einem Herzkatheterlabor teil. Blau markiert ist das PopGen Untersuchungsgebiet.

## 2.3 Patientenkollektivbeschreibung

Gewählt wurde für diese Studie ein vornehmlich junges Patientenkollektiv, da der genetische Einfluss, den es hier zu untersuchen galt, in jüngeren Jahren um ein 3-6faches höher ist als bei alten Patienten (48).

Die Stichprobe von 900 an einer koronaren Herzkrankheit erkrankten Patienten beinhaltet eine die Bevölkerung repräsentierende Gruppe nicht verwandter deutscher KHK-Patienten mit einem Krankheitsbeginn unter 55 Jahren. Sie wurden aus Schleswig-Holstein durch die Biodatenbank PopGen rekrutiert. In dieser Region wurden alle Coronarangiogramme der fünf Katheterlabors bearbeitet. Einschlusskriterium war der Nachweis einer signifikanten KHK (mindestens 70% Stenose in einem der Hauptkoronargefäße). Die meisten Personen (90,3%) hatten eine sehr schwere Form der KHK und schon eine Revaskularisation in Form einer Ballondilatation (PTCA) oder als Bypass in der Vorgeschichte. Eine Untergruppe von 596 Personen hatte einen Myocardinfarkt in der Vorgeschichte. Die Patienten waren zum Zeitpunkt der Erfassung zwischen 33 und 71 Jahre alt (Durchschnittsalter: 54 Jahre) und unter 55 Jahren zum Zeitpunkt des Krankheitsbeginns (Durchschnittsalter: 48 Jahre). Die Geschlechterverteilung in der Gesamtgruppe betrug 83,7% Männer und 16,3% Frauen. Die Daten 632 gesunder Kontrollpersonen wurden ebenfalls von PopGen bezogen. Die Kontrollen stammten aus der gleichen geografischen Region, um sicherzustellen, dass die gleichen Rahmenbedingungen hinsichtlich der Entwicklung einer KHK wie bei den Erkrankten bestanden. Sie wurden zufällig aus dem Einwohnermeldeamt identifiziert, waren alle deutscher Herkunft (alle hatten deutsche Eltern) und zwischen 48 und 77 Jahre alt. Daten über den allgemeinen Gesundheitsstatus und Risikofaktoren wie Rauchen, Body Mass Index (BMI), Diabetes und Bluthochdruck wurde mittels Fragebogen und einer ärztlichen körperlichen Untersuchung erhoben. Kontrollpersonen mit vorhergegangener KHK und früheren Myocardinfarkten wurden von der Studie ausgeschlossen. Alle Teilnehmer gaben vor der Registrierung ihr Einverständnis zur Teilnahme und die Ethikkommission der Universitätskliniken Schleswig Holstein, Campus Kiel genehmigte diese Studie.

## **2.4 Genotypisierung (Taqman®, PCR, Sonden, Primer)**

Es wurden genotypisierte DNA-Proben von Patienten und von der Kontrollgruppe für die drei funktionellen CARD15 - Hauptvarianten R702W (rs2066844), G908R (rs2066845) und 1007fs (rs2066847) analysiert. Hierzu wurden TaqMan ® SNP Genotyping Assays verwendet. (Applied Biosystems, Foster City, USA). In allen analysierten Subpopulationen war die callrate der Genotypen 1 für die Varianten C14772T und G25386C, und 0.99 für die Variante 32629insC in der Analyse aller Proben und 1 unter Berücksichtigung nur männlicher Proben.

### **2.4.1 DNA-Präparation**

Den Patienten wurde im Rahmen der stationären Routineblutentnahme 30 ml peripher venöses Blut abgenommen. Die Blutproben wurden umgehend bis zur DNA-Präparation bei -80° C tiefgefroren.

Die Extraktion der DNA aus den EDTA-Blutproben der Patienten erfolgte unter Anwendung des Invisorb® Blood Giga Kit von Invitex (Invitex, Robert- Rössle- Str. 10, 13125 Berlin- Buch). Die bei -80° C tiefgefrorenen Blutproben wurden hierzu aufgetaut. Zur Lyse der in den Proben enthaltenen Erythrozyten wurden 10 ml des Patientenblutes zusammen mit 30 ml kaltem Puffer I in Falcon Tubes (Bluecaps) gegeben, 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und 3 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen. Das in dem Tube sedimentierte leukozytenhaltige Pellet wurde zur optimalen Trennung von Erythrozyten und DNA-haltigen Leukozyten nach Hinzufügen von 20 ml des Puffer I zur Probe erneut 3 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Um sämtliche Erythrozytenreste auszuwaschen, wurde, unter Zugabe von 20 ml des Puffer I, erneut zentrifugiert, bis das leukozytenhaltige Pellet eine weiße Farbe aufwies.

Im nächsten Schritt wurden die Leukozyten dann lysiert und die DNA aus dem Zellkern extrahiert. Das Pellet wurde unter dem Zusatz von 3 ml des Puffer II und 50 µl Proteinkinase K gründlich resuspendiert und in einem 60° C warmen Schüttelbad zwei Stunden lang mit einer Schüttelgeschwindigkeit von 95/min

inkubiert. Wies der Ansatz im Anschluss an die zwei Stunden keine klare Farbgebung auf, erfolgte die Verlängerung der Inkubation um weitere 30 Minuten.

Im weiteren Verlauf der Präparation wurden Proteine ausgefällt. Dafür wurden 1,8 ml Puffer III zum Pellet hinzu gegeben. Es erfolgte die Inkubation des Gemisches in Falcon Tubes (Redcaps) für 5 Minuten auf Eis mit anschließender Zentrifugierung für 15 Minuten bei 5000 rpm. Der klare Überstand wurde in ein neues Redcap Tube überführt.

Nachfolgend wurde die genomische DNA zur Präzipitation gebracht. Es wurden 10 ml 96%-iges Ethanol beigemischt und vorsichtig geschwenkt. Nach weiterer Zentrifugierung bei 5000 rpm über drei Minuten und Abgießen des Überstandes wurde das verbleibende Pellet zum Auswaschen der DNA in ein mit 1 ml 70%-igem Ethanol gefüllte Eppendorf-Tube gegeben. Es erfolgte nach Durchmischung der Probe die erneute Zentrifugierung der Probe für 2 Minuten bei 13000 rpm. Das Ethanol wurde anschließend vorsichtig abpipettiert und die Eppendorf Tube 10 Minuten bei Raumtemperatur offen stehen gelassen, um auf diese Art und Weise eine Evaporation des überschüssigen Ethanols zu ermöglichen. Die gereinigte DNA wurde im Anschluss unter Zusatz von 500 µl Tris- EDTA-Puffer resuspendiert. Entsprechend der Koordination der weiteren Arbeitsabläufe war so die Lagerung der Proben für kurze Zeit bei  $-4^{\circ}\text{C}$  oder über einen längeren Zeitraum bei  $-20^{\circ}\text{C}$  möglich.

### **2.4.2 Prinzip der Polymerase Chain Reaction (PCR)**

DNA Proben von Patienten und Kontrollpersonen wurden auf die drei wichtigsten CARD15 Varianten R702W, G908R und 1007fs untersucht. Da die zur Verfügung stehende Menge der extrahierten DNA meist zu gering ist, um sofort mit Typisierungen beginnen zu können, wird mittels Polymerase Chain Reaction (PCR) die Zahl der Kopien erhöht. Dieses Prinzip der Vervielfältigung wurde 1986 von K. B. Mullis (42) eingeführt. Voraussetzungen zur Durchführung sind die Kenntnis der Nukleotid-Sequenz beiderseits des zu untersuchenden DNA-Abschnittes und das Vorhandensein der entsprechenden Oligonukleotide in Form von Primern. Die



Reaktion besteht aus drei Schritten, die vielfach wiederholt werden: Die Denaturierung zur Trennung der DNA-Stränge, die Hybridisierung zur Bindung der Primer an den entsprechenden DNA-Strang und die Polymerisation, die Neustrangsynthese.

Durch Erhitzen der DNA auf Temperaturen zwischen 94-96° C werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden DNA-Strängen gelöst, so dass die DNA in Einzelstränge denaturiert, d.h. zerlegt wird.

Nach der Trennung wird die Temperatur auf 60° C gesenkt, damit sich die Oligonucleotid-Primer unter Hybridisierungsbedingungen an die komplementären Sequenzen der Matrizen-DNA (Hybridisierung) binden können.

Unter Zugabe von DNA-Polymerase wird vom 3'-OH-Ende des jeweiligen Primers ausgehend durch Anheftung von Nukleotiden in 5' → 3' Richtung eine komplementäre DNA synthetisiert. Die DNA-Polymerase ist eine Taq-Polymerase, welche thermostabil ist und bei den im Rahmen der PCR erforderlichen Temperaturen nicht denaturiert wird. Die Zyklen werden vielfach wiederholt bis die für die weitere Analyse benötigte entsprechende Menge der definierten DNA amplifiziert ist.

Im theoretischen Modell würde die Menge der amplifizierten DNA nach jedem PCR-Zyklus exponentiell ansteigen. Da zu Beginn jedoch eine relativ geringe Templatemenge vorhanden ist, steigt die Menge (unter den gegebenen Untersuchungsbedingungen) während der ersten Zyklen lediglich linear an. Im weiteren Verlauf stellt sich eine exponentielle Funktion dar, welche ihren Abschluss mit den letzten Zyklen in einer „Plateau-Phase“ findet. Begründet ist dies durch eine langsame Reduktion der Enzymaktivität und einer Hybridisierung der DNA Stränge untereinander, und nicht mehr ausschließlich mit den zugegebenen Primern. Letztlich kann eine Effizienz von 70 bis 80 % erreicht werden (62).

### 2.4.3 NOD2-Immunhistologie und Fluoreszenzmikroskopie

Koronararterien von Patienten post mortem aus dem Institut für Pathologie wurden in Cryomatrix eingebettet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die gefrorenen Abschnitte (8 µm dick) wurden vor der weiteren Bearbeitung auf Superfrost™ Scheiben befestigt, fünf Minuten in Aceton fixiert, luftgetrocknet und bei -20° C aufbewahrt. Zwei Objektträger jeder Biopsie wurden mit Hämatoxylin-Eosin zur Routine - Histologieauswertung angefärbt. Die anderen Scheiben wurden in 0.1% Triton X-100 in 0.1M Phosphate-buffered saline (PBS) inkubiert, dreimalig in PBS gewaschen und für 20 Minuten mit 0,75% bovine serum albumin (BSA) geblockt. Die Abschnitte wurden anschließend mit primären Antikörpern (polyclonale anti-NOD-2, Cayman Chemicals, USA und monoclonale CD68, Dako, Deutschland) in einer 1:200 verdünnten 0,75%-igen bovine serum albumin (BSA) Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur bebrütet. Nach dem Waschen mit Phosphate-buffered-saline (PBS) wurden die an das Gewebe gebundenen Antikörper durch biotinylierte Ziege anti-Kaninchen IgG-Antikörper als Vektoren und anschließende Vermischung mit FITC-konjugiertem Avidin, beides in einer Verdünnung von 1:100 in PBS oder mittels Cy3-konjugierter Kaninchen anti-Maus-Antikörper (Jackson Immuno, PA, USA) in einer Verdünnung von 1:350 in PBS dargestellt. Unter Verwendung irrelevanter Antikörper und auch durch Weglassen primärer Antikörper wurden Kontrollen eingeschlossen, bei denen man sekundäre Antikörper oder auch FITC-konjugiertes Avidin verwandte. Die Fluoreszenz wurde durch ein mit einem Apotom ausgestatteten Axiolmager Mikroskop (Zeiss, Deutschland) mit adäquaten Filtersystemen, Fotos wurden durch ein Digitalkamerasystem erfasst (Axiocam, Zeiss, Deutschland).

#### 2.4.4 Statistische Analyse

Alle drei Mutationen wurden zum Ausschluss einer auffälligen Abweichung vom Hardy-Weinberg-Equilibrium unter Zuhilfenahme der Software HaploView, Version 3.2 (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>) untersucht. Einzelmarker Fall-Kontroll-Analysen wurden mittels  $\chi^2$  Statistik oder Fisher's exact test unter Gebrauch der Genstatistik Software GENOMIZER, verfügbar unter <http://www.ikmb.uni-kiel.de>, ausgeführt. Die Power Calculation wurde mit OpenEpi auf <http://www.openepi.com> durchgeführt.

Da alle drei CARD15 Varianten relativ selten vorkommen, wurde die Häufigkeit der Träger in der Patientenstichprobe und in der Kontrollgruppe miteinander verglichen. Signifikante gruppenspezifische Abweichungen ergaben sich aber nicht (0.174 vs. 0.194; odds ratio [OR] = 1.12 mit 95% Konfidenzintervall im Bereich von 0.851 bis 1.467).

Die Power Berechnung ergab, dass wir dazu befähigt wären, eine Variante mit einem relativen Risiko von 1,46 (bei einem Signifikanzlevel von 0,05 und einer Power von 80%) zu detektieren, wenn wir dem Patientenkollektiv eine Größe und eine durchschnittliche Träger-/Risikofaktorhäufigkeit von 0,181 gäben. Zur Berücksichtigung der fünf die KHK beeinflussenden Faktoren (Geschlecht, BMI, Blutdruck, Diabetes und Rauchen) wurde die logistische Regressionsanalyse im Rahmen des R statistical environment, Version 2.3.1 (<http://www.R-project.org>) durchgeführt.

## **3. Ergebnisse**

### **3.1 Expressionsort von NOD2 in Koronararterien**

Unter Zuhilfenahme der Immunfluoreszenzfärbung zeigte sich, dass in den Koronararterien von fünf gesunden Kontrollen und fünf Patienten mit einer makroskopisch und mikroskopisch nachgewiesenen KHK, die größte Färbeintensität in atherosklerotischen Plaques, vor allem in den Bereichen, die von Entzündungszellen infiltriert waren, zu sehen war (Abb.2). In rupturierten Plaques fanden sich die NOD2 positiven Zellen in der Nähe des Gefäßlumens. Dagegen zeigte sich nur eine geringe Färbung in der Immunfluoreszenz im Endothel von normalen Koronararterien. „Double staining“ und Zelltyp-spezifische Marker konnten beweisen, dass NOD2 primär von CD68-positiven Makrophagen exprimiert wird.

### **3.2 Analyse von CARD15 Varianten bei Patienten mit einer KHK**

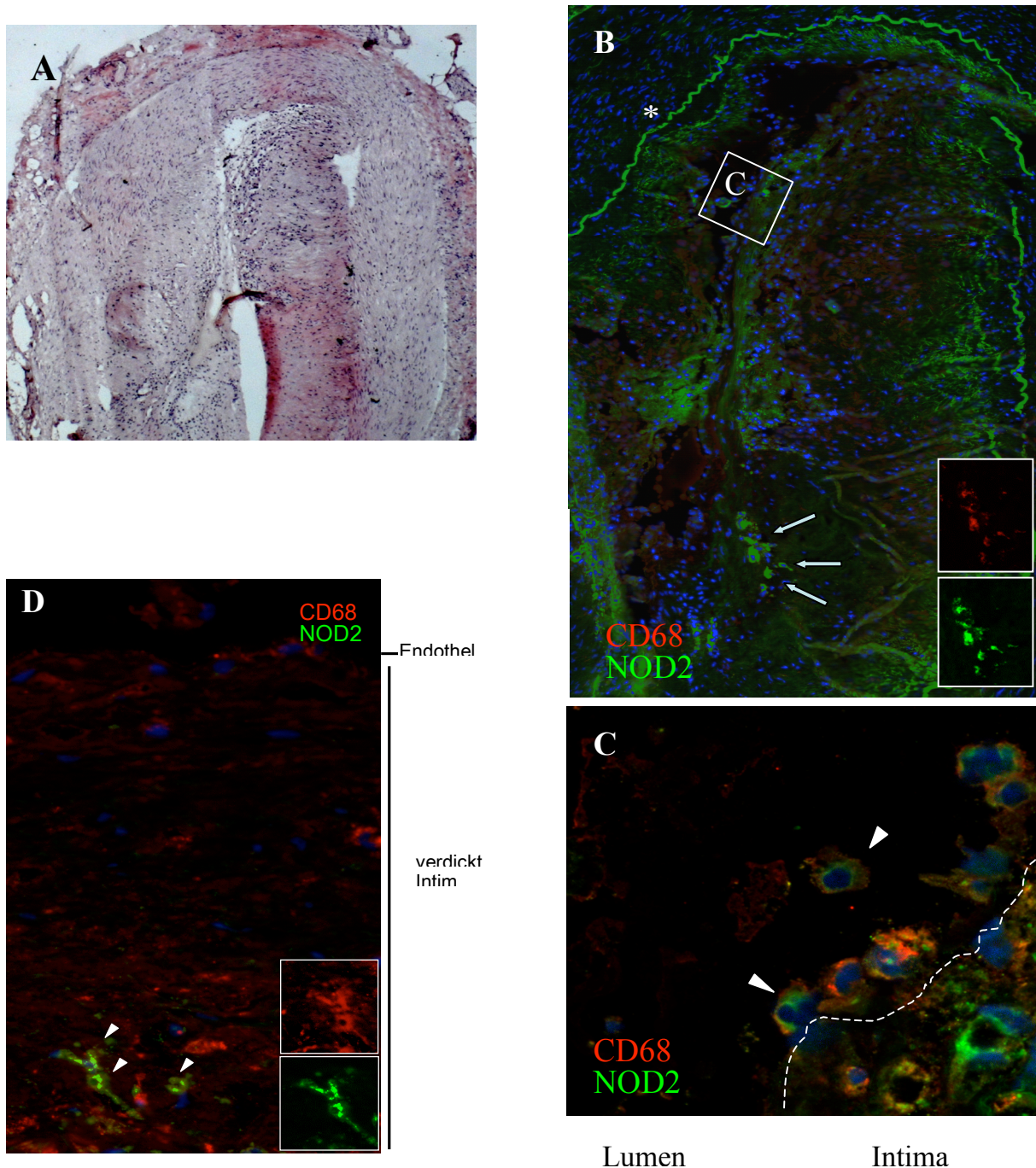
900 Patienten, die in jüngeren Jahren an einer KHK erkrankt waren, und 632 gesunde Kontrollpersonen wurden einer geschlechts- und altersbezogenen Fall-Kontroll-Analyse in Hinblick auf die drei CARD15 Varianten R702W, G908R und 1007fs unterzogen. Für alle Marker der Genotypen - Verteilung in Fällen und Kontrollen galt das Hardy-Weinberg-Equilibrium. Es konnte weder auf Allel-, noch auf Genotyp-Niveau eine Assoziation zwischen den drei Varianten und dem Auftreten einer KHK bewiesen werden (Tabelle 1). Auch eine Analyse eines Genotyp-Phänotyp-Zusammenhangs bezüglich eines Myocardinfarktes ergab ein negatives Ergebnis (Tabelle 1). Da alle drei Genvarianten des CARD15 relativ selten sind, wurde die Häufigkeit der Träger (homozygote, heterozygote, doppelt -heterozygote Träger aller drei Polymorphismen) zwischen KHK Fällen und der Kontrollgruppe verglichen. Es ergab sich aber kein signifikanter Unterschied zwischen diesen zwei Gruppen (0,170 in Fällen vs. 0,192 in den Kontrollen; odds ratio OR= 0,87 mit 95% Konfidenzintervall im Bereich von 0,67 bis 1,137). Zusätzlich zeigte die logistische

Regressionsanalyse, welche den Einfluss der bekannten KHK – Risikofaktoren berücksichtigt, keine Evidenz für einen Zusammenhang. Die durchgeführte Power-Kalkulation zeigt, dass, wenn man die Größe der Proben und ein durchschnittliches Trägerrisiko Faktor von 0,181 berücksichtigt, es möglich wäre, eine Variante mit einem relativen Risiko von 1,46 zu erkennen (Signifikanzlevel 0,05 und einer Power von 80%). Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass keine der drei analysierten CARD15 Varianten eine signifikante Rolle in der Entstehung einer KHK zu spielen scheint.

<b>CARD15 Variante</b>	<b>KHK</b>	<b>Subgruppe Myokardinfarkt</b>	<b>Kontrollen</b>	<b>P KHK</b>	<b>P Myokardinfarkt</b>
<b>R702W (rs2066844)</b>					
Individuen (n)	890	589	632		
Variantenhäufigkeit	0.046	0.045	0.055	0.246	0.242
Genotypfrequenzen				0.173	0.290
C / C	0.913	0.914	0.890		
C / T	0.083	0.083	0.108		
T / T	0.004	0.003	0.002		
<b>G908R (rs2066845)</b>					
Individuen (n)	900	596	632		
Variantenhäufigkeit	0.017	0.017	0.013	0.476	0.499
Genotypfrequenzen				0.626	0.553
G / G	0.968	0.968	0.973		
G / C	0.031	0.030	0.027		
C / C	0.001	0.002	0.000		
<b>1007fs (rs2066847)</b>					
Individuen (n)	897	594	630		
Variantenhäufigkeit	0.027	0.030	0.026	0.736	0.892
Genotypfrequenzen				0.489	0.583
- / -	0.945	0.939	0.942		
- / insC	0.055	0.061	0.056		
insC / insC	0.000	0.000	0.002		

**Tabelle 1:** CARD15 Varianten in KHK-Patienten und Kontrollprobanden

insC = Cytosin Insertion



**Abb. 2** Nachweis von NOD2 in atherosklerotischen Plaques durch Immunfluoreszenzfärbung. **A**, Überblick über einen histologischen Schnitt einer Koronararterie (Hämatoxylin-Eosin, HE, 5fache Vergrößerung). **B**, NOD2-Färbung (grün) und Makrophagen (rot). Der Stern zeigt eine kräftige Autofluoreszenz. Die Pfeile weisen auf die NOD2 positiven Makrophagen hin. Die zwei eingeschobenen kleinen Abbildungen am rechten Bildrand zeigen doppelpositive Zellen für CD68+ und NOD2+ (10fache Vergrößerung). **C**, NOD2+/CD68+ Zellen sind im Bereich eines rupturierten Plaques zu sehen (200fache Vergrößerung). **D**, Ko-Lokalisation von NOD2 und CD68+ Makrophagen in inflammatorischen Infiltraten der Intima. Die Pfeile kennzeichnen doppelpositive Zellen (50fache Vergrößerung).

## 4. Diskussion

Experimentelle und klinische Studien haben einen Zusammenhang zwischen infektiösen Pathogenen, als mögliche pathophysiologische Faktoren, und einer KHK aufgezeigt. Eine Infektion könnte den chronisch entzündlichen Prozess in einer atheromatösen Läsion verstärken. Dafür spräche auch ein weites Spektrum bakterieller Spezies, welches in atherosklerotischen Veränderungen in Koronararterien gefunden wurde. Die meisten von ihnen kommen als ortsständiger Biofilm auf Organen mit Barrierefunktion wie der Mucosa des respiratorischen und gastrointestinalen Traktes und der Haut vor. Weiterhin wurden immer wieder bestimmte pathogene Keime des Respirationstraktes (*Chlamydia pneumoniae* u.a.) oder der Mundschleimhaut (*Porphyromonas gingivalis* u.a.) in Atheromen gefunden. Die interindividuelle Vielfalt bakterieller Kolonien in atherosklerotischen Veränderungen, das große Spektrum der gefundenen Erreger und die Übereinstimmung mit der Mikroflora auf menschlichen Barriereorganen erhärten die Hypothese, dass die Pathophysiologie der KHK auf einem Defekt der angeborenen Immunität und somit einer Barrierefunktion beruht. Dieser Umstand würde Bakterien erlauben, von ihrem natürlichen Lebensraum (Biofilm auf Schleimhäuten) in die Blutbahn überzutreten, um sich in atheromatösen Veränderungen anzusiedeln und dort die lokale Entzündung zu unterhalten. Diese Hypothese wird zudem durch epidemiologische Untersuchungen (18) gestützt, die eine Verbindung zwischen rheumatoider Arthritis, Parodontitis, Diabetes mellitus und einer allgemeinen Atherosklerose bzw. einer KHK zeigen. (3; 12 ;18)

Rezeptoren für PAMPS kommt eine Schlüsselrolle in der angeborenen Abwehr zu. Die Expression von Toll-like Rezeptoren, im Speziellen TLR1, TLR2 und TLR4 ist in atheromatösen Läsionen gesteigert und scheint eine Rolle in der Regulation der Entzündungsaktivität und Bakterienerkennung in Atheromen zu übernehmen. Edtfeldt et al. (13) fanden eine signifikante Verbindung zwischen TLR4 Genotyp/Varianten und dem Risiko, einen Myocardinfarkt zu erleiden. Veränderungen/Varianten in Genen, die bestimmte Proteine in Signalwegen zur Erkennung von Bakterien produzieren (z.B. das Interleukin 6 System), scheinen das Risiko, eine KHK zu entwickeln, ebenfalls zu verändern.

NOD2 hat eine besondere Bedeutung in der Abwehr von Bakterien. Die Expression von NOD2 als ein intrazellulärer Rezeptor für bestimmte Bakterienzellwandbestandteile, speziell das Muramyldipeptid (MDP), wird durch TNF und IFN $\gamma$  gesteigert. Das Protein enthält zwei N-Terminale Caspase recruitment domains (CARDs) als Effektoren, eine Nucleotide-binding domain (NBD) und C-Terminale leucin rich repeats (LRRs) zur Erkennung des Muramyldipeptids. Hauptsächlich wird NOD2 von Makrophagen und dendritischen Zellen, aber auch von Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes exprimiert. Eine Steigerung der Expression in Epithelzellen, aber auch in Makrophagen, ist Ausdruck einer erhöhten Aktivität des Immunsystems. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass NOD2 von Endothelzellen und Makrophagen in atheromatösen Läsionen der Koronargefäßwand exprimiert wird, und die Vermutung zulässt, dass NOD2 eine Rolle in der lokalen Immunantwort und Infektionskontrolle in der Läsion spielen könnte. Daher unterstützen die in dieser Arbeit vorgelegten Resultate die Hypothese, dass NOD2 nicht nur ein Marker einer generellen Barrieredysfunktion ist, sondern auch ein Faktor bei der lokalen Abwehr in atheromatösen Läsionen sein könnte. Vor dem Hintergrund der Entdeckung bakterieller Flora in atheromatösem Gewebe könnte NOD2 eine spezielle Funktion in der Abwehr bakteriellen Eindringens übernehmen. (45) Ein genetisch verursachter Defekt könnte durch Veränderung der Funktion von NOD2 zu einer gestörten bakteriellen Abwehr und damit zu einer pathologischen Besiedlung durch Keime in und an den Atheromen führen.

Auch NOD1, ein weiterer cytosolständiger PRR, scheint im inflammatorischem Prozess der KHK eine Rolle zu spielen. So ist die Expression von NOD1 in atherosklerotischen Koronargefäßen signifikant erhöht im Vergleich zu normalen Koronararterien. Zudem scheint die Anwesenheit von NOD1 wie auch NOD2 für die durch *C. pneumoniae* verursachte inflammatorische Reaktion der Endothelialzellen notwendig. *C. pneumoniae* induziert eine durch NOD1 und NOD2 vermittelte NFkappaB - Aktivierung in Endothelialzellen, wobei NOD1 die dominante Rolle in dieser inflammatorischen Kaskade zukommt (44).



Varianten des NOD2 kodierenden CARD15-Genes R702W, G908R und 1007fs erhöhen das Risiko, an einem Morbus Crohn zu erkranken bis auf das 40fache (22). Diese Varianten beeinflussen die Funktion der C-terminalen LRR des NOD2 Proteins, der als Sensor für MDP fungiert und spielen wahrscheinlich auch eine Rolle bei anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen wie dem Atopischen Ekzem und dem Asthma bronchiale (29; 61). Die NOD2 Dysfunktion könnte darum ebenso zu einer abgeschwächten lokalen Reaktion der Makrophagen bei einer KHK, wie auch zu einer erhöhten Durchlässigkeit und Undichtigkeit der gastrointestinalen Barriere beitragen, was ein vermehrtes Eindringen von Bakterien in die Blutzirkulation zur Folge hätte. In dieser Studie wurden 1532 deutsche KHK-Patienten auf drei relevante Varianten im CARD15 Gen untersucht und mit entsprechenden gesunden Kontrollen verglichen. Alle Patienten hatten frühzeitig, vor dem 55. Lebensjahr, eine KHK entwickelt, von denen eine Untergruppe von 596 Patienten einen Myocardinfarkt als Ausdruck einer klinisch manifesten KHK erlitt. Die durchgeführten Fall-Kontroll-Analysen offenbarten keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Allel- und Genotypfrequenzen der drei CARD15 Varianten. Ebenso wenig konnten logistische Regressionsanalysen, die Bezug auf bekannte, die KHK begünstigende Risikofaktoren nehmen, den Beweis für eine Assoziation von Polymorphismen und der Entstehung einer KHK bringen.

## 5. Zusammenfassung

Die koronare Herzkrankheit stellt in Industrienationen trotz sinkender Sterberaten eine Volkskrankheit dar, die mit hoher Morbidität und Mortalität verbunden ist. Die klinische Manifestation einer KHK als Herzinfarkt weist neueren Erhebungen zu Folge immer noch eine Letalität von 50% auf. Bekannte Risikofaktoren für die Erkrankung an einer KHK sind exogene und endogene Einflüsse wie der Nikotinabusus, Diabetes mellitus, Hypertonus und Hypercholesterinämie. In Bezug auf diese Faktoren ist in gewissem Umfang eine Kontrolle des Erkrankungsrisikos durch Kontrolle dieser Einflüsse möglich. Das Wissen, inwiefern eine genetische Prädisposition gegenüber der koronaren Herzkrankheit, insbesondere des jüngeren Menschen, besteht und wo diese zu finden ist, könnte in Zukunft die Prävention, Diagnose und Therapie der KHK erleichtern und effizienter machen. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Überprüfung pathophysiologischer Zusammenhänge zwischen Mutationen des CARD15 – Genoms und der Entstehung einer koronaren Herzkrankheit. Die KHK als eine Erkrankung, in deren Entstehung entzündliche Prozesse eine wichtige Rolle spielen, könnte, der Hypothese zu Folge, wie auch der M. Crohn und das Blau-Syndrom mit eben diesen Mutationen vergesellschaftet sein. Über die Biodatenbank PopGen wurden für diese Studie 900 an einer KHK erkrankte Patienten und für die Kontrollgruppe 632 gesunde Personen rekrutiert. In einer umfangreichen DNA-Analyse wurden die Patienten und die Kontrollgruppe auf das Vorhandensein der drei Polymorphismen des CARD15 Gen, R702W, G908R und 1007fs, welche zur Expression von NOD2 führen, untersucht. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass NOD2 zwar in atheromatösen Läsionen der KHK vermehrt nachweisbar ist, konnten aber keine Assoziation von Varianten in CARD15 und der Entwicklung einer KHK in jüngeren Jahren anhand einer großen deutschen Stichprobe belegen. Basierend auf diesen Ergebnissen kann eine entscheidende Beteiligung von CARD15/NOD2 bei der Entstehung der KHK, wie bei dem Morbus Crohn bewiesen, ausgeschlossen werden. Während das Lebensalter zum Zeitpunkt der Manifestation oder der Diagnosestellung der KHK nicht mit der Länge der Exposition zu klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren wie Bluthochdruck, Hyperlipidämie, Diabetes mellitus oder Rauchen in Verbindung zu stehen scheint, bleiben andere Barrierefunktionsgene wichtige Kandidaten für weitere genetische und funktionelle Untersuchungen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Abbott DW, Wilkins A, Asara JM, Cantley LC: The Crohn's disease protein, NOD2, requires RIP2 in order to induce ubiquitylation of a novel site on NEMO. *Curr. Biol.* 14, 2217–2227(2004)
2. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O: Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;124:783-801
3. An N, Ou-Yang XY, Han W: Detection of periodontal pathogens in atherosclerotic lesions in patients; *Beijing Da Xue Xue Bao.*; Feb. 2010; 42(1):33-6
4. Anderson JW, Diwadkar VA, Bridges SR: Selective effects of different antioxidants on oxidation of lipoproteins from rats. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1998 Sep; 218(4):376-81
5. Boer JM, Feskens EJ, Verschuren WM, Seidell JC, Kromhout D: The joint impact of family history of myocardial infarction and other risk factors on 12-year coronary heart disease mortality. *Epidemiology* 10/1999: 767-770
6. Brown MS, Goldstein JL: A receptor mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232 (1986) 34-47
7. Castelli WP, Garrison RJ, Wilson, Abbott RD, Kalousdian S, Kannel WB: Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. *JAMA* 256 (1986) 2835-2838
8. Chamailard M, Girardin SE, Viala J, Philpott DJ: NODs, NALPs and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. *Cell Microbiol* 2003 Sep; 5(9): 581-92
9. Cichon S: Variabilität im menschlichen Genom; *Dtsch. Ärztebl.* 2002; 46: 3091–3101

10. Cooper D, Krawczak M: Human gene mutations. BIOS Scientific Publishers, Oxford, 1993
11. Davey MP, Martin TM, Planck SR, Lee J, Zamora D, Rosenbaum JT: Human endothelial cells express NOD2/CARD15 and increase IL-6 secretion in response to muramyl dipeptide. *Microvasc Res.* 2006;71:103-7.).
12. Drexler SK, Foxwell BM: The role of Toll-like receptors in chronic inflammation. *Int J Biochem Cell Biol.*, Okt. 2009
13. Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK, Yan ZQ: Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation.* 2002;105:1158-61.
14. Falk E, Shah PK, Fuster V: Pathogenesis of plaque disruption. In: Fuster V, Ross R, Topol E.J., eds.: *Atherosclerosis and coronary artery disease.* Vol. 2, 492-510, Lippincott-Raven, Philadelphia 1996;
15. Faure E, Thomas L, Xu H, Medvedev A, Equils O, Arditi M: Bacterial Lipopolysaccharide and IFN- $\gamma$  Induce Toll-Like Receptor 2 and Toll-Like Receptor 4 Expression in Human Endothelial Cells: Role of NF- $\kappa$ B Activation. *J Immunol.* 2001;166:2018-2024.
16. Fillon S, Soulis K, Rajasekaran S, Benedict-Hamilton H, Radin JN, Orihuela CJ, El Kasmi KC, Murti G, Kaushal D, Gaber MW, Weber JR, Murray PJ, Tuomanen EI: Platelet-activating factor receptor and innate immunity: uptake of gram-positive bacterial cell wall into host cells and cell-specific pathophysiology. *J Immunol.* 2006;177:6182-91.
17. Goldstein JL: Familial hypercholesterolaemia. In: Scriver CR BA, Sly WS, Valle D, ed. *The metabolic basis of inherited disease.* New York: McGraw Hill; 1995:1215-45.).
18. Halm VP van, Nurmohamed MT, Twisk JW, Dijkmans BA, Voskuyl AE: Disease-modifying antirheumatic drugs are associated with a reduced risk for cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: a case control study.; *Arthritis Res Ther.* 2006; 8 (5): R151

19. Halushka MK, Fan JB, Bentley K, Hsie L, Shen N, Weder A, Cooper R, Lipshutz R, Chakravarti A: Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis; *Nat Genet.* 1999 Jul; 22(3):239-47.
20. Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, Frenzel H, King K, Hasselmeyer A, MacPherson AJ, Bridger S, van Deventer S, Forbes A, Nikolaus, Lennard-Jones JE, Foelsch UR, Krawczak M, Lewis C, Schreiber S, Mathew CG: Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet.* 2001;357:1925-8.
21. Hampe J, Grebe J, Nikolaus S, Solberg C, Croucher CJ, Mascheretti S, Jahnsen J, Moum B, Klump B, Krawczak M, Mirza MM, Foelsch UR, Vatn M, Schreiber S: Association of NOD2 (CARD 15) genotype with clinical course of Crohn's disease: a cohort study. *Lancet.* 2002;359:1661-5.
22. Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, Frenzel H, King K, Hasselmeyer A, MacPherson AJ, Bridger S, van Deventer S, Forbes A, Nikolaus S, Lennard-Jones JE, Foelsch UR, Krawczak M, Lewis C, Schreiber S, Mathew CG: Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet.* 2001;357:1925-8.
23. Hansson GK: Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. *N Engl J Med.* 2005;352:1685-1695.
24. Hansson GK, Edfeldt K. Toll to be paid at the gateway to the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1085-7.
25. Holler E, Rogler G, Herfarth H, Brenmoehl J, Wild PJ, Hahn J, Eissner G, Schölmerich J, Andreesen R: Both donor and recipient NOD2/CARD15 mutations associate with transplant-related mortality and GvHD following allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2004; 104: 889-894

26. Hugot JP: Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 599-603
27. Inohara N, del Peso L, Koseki T, Chen S, Nunez G: RICK, a novel protein kinase containing a caspase recruitment domain, interacts with CLARP and regulates CD95-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 1998 May 15; 273(20): 12296-300
28. Janeway CA Jr, Medzhitov R: Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:197-216.
29. Kabesch M, Peters W, Carr D, Leupold W, Weiland SK, von Mutius E: Association between polymorphisms in caspase recruitment domain containing protein 15 and allergy in two German populations. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111:813-7.
30. Kannel WB: The role of blood pressure in cardiovascular disease. The Framingham Study. *Angiology* 26 (1975) 1-14)
31. Kannel WB, Castelli WP, Gordon T: Cholesterol in the prediction of atherosclerotic disease. New perspectives based on the Framingham Study. *Ann Intern Med* 90 (1979) 85-91)
32. Kannel WB, D'Agostino RB, Belanger AJ: Fibrinogen, cigarette smoking, and risk of cardiovascular disease: Insights from the Framingham Study. *Am Heart J* 113 (1987) 1006-1010
33. Knippers R: *Molekulare Genetik*. 8. Auflage (2001), Seite 493, Thieme, Stuttgart
34. Knippers R: *Molekulare Genetik*. 8. Auflage (2001), Seite 398, Thieme, Stuttgart
35. Krawczak M, Nikolaus S, von Eberstein H, Croucher PJ, El Mokhtari NE, Schreiber S: PopGen: population-based recruitment of patients and controls for the analysis of complex genotype-phenotype relationships. *Community Genet.* 2006;9(1):55-61)

36. Lamina C, Steffens M, Mueller J, Lohmussaar E, Meitinger T, Wichmann HE.: Genetische Diversität in deutschen und europäischen Bevölkerungen: Suche nach Substrukturen und genetischen Mustern. *Gesundheitswesen* 2005; 67.
37. Leitersdorf E, Tobin EJ, Davignon J, Hobbs HH: Common low-density lipoprotein receptor mutations in the French Canadian population. *J Clin Invest.* 1990;85:1014-23.
38. Levy RI, Feinleib M: Risk factors for coronary artery disease and their management. In: Braunwald, M (ed): *Heart disease. A textbook of cardiovascular medicine*, 5th ed. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto, usw., 1997, S. 1209-1230
39. McCarthy JV, Ni J, Dixit VM: RIP2 is a novel NF-kappaB-activating an cell death-inducing kinase. *J Biol Chem* 1998 Jul 3; 273(27): 16968-75
40. Miceli-Richard C, Lesage S, Rybojad M, Prieur AM, Manouvrier-Hanu S, Häfner R, Chamaillard M, Zouali H, Thomas G, Hugot JP: CARD15 mutations in Blau syndrome. *Nat Genet*2001; 29: 19-20]
41. Mitchell JA, Paul-Clark MJ, Clarke GW, McMaster SK, Cartwright N: Critical role of toll-like receptors and nucleotide oligomerisation domain in the regulation of health and disease. *Journal of Endocrinol.* 2007, Jun; 193(3):323-30.
42. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H.: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986, 51: 263-73
43. Office on Smoking and Health: Leads from the morbidity and mortality weekly report. *JAMA* 251 (1984) 574-579
44. Opitz B, Förster S, Hocke AC, Maass M, Schmeck B, Hippenstiel S, Suttorp N, Krüll M.: Nod1-mediated endothelial cell activation by *Chlamydomydia pneumoniae*. *Circ Res.* 2005; 96: 319-26)

45. Ott SJ, El Mokhtari NE, Musfeldt M, Hellimg S, Freitag S, Rehman A, Kühbacher T, Nikolaus S, Namsolieck P, Blaut M, Hampe J, Sahly H, Reinecke A, Haake N, Günther R, Krüger D, Lins M, Herrmann G, Fülsh UR, Simon R, Schreiber S: Detection of diverse bacterial signatures in atherosclerotic lesions of patients with coronary heart disease. *Circulation*. 2006 Feb 21;113(7):929-37.
46. Riede U, Schaefer H: *Allgemeine und spezielle Pathologie.*, 4. Auflage (1999), S. 485, Thieme, Stuttgart
47. Riede U, Schaefer H: *Allgemeine und spezielle Pathologie.*, 4. Auflage (1999), S. 437, Thieme, Stuttgart
48. Rissanen AM: Familial occurrence of coronary heart disease: effect of age at diagnosis. *Am J Cardiol* 1979 Jul; 44(1): 60-6
49. Ross R: Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 1999 Nov; 138(5 Pt 2): S. 419-20
50. Ross R, Glomset JA: Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle cell is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* 1973, Jun 29; 180(93): 1332-9
51. Stamler J, Stamler R: Intervention for the prevention and control of hypertension and atherosclerotic diseases: United States and international experience. *Am J Med* 76 (2A)(1984) 13-36
52. Sary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW: A definition of initial, fatty streak and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1994 May; 89(5): 2462-78
53. Statistisches Bundesamt Deutschland, 2007
54. Stephens JW, Humphries SE: The molecular genetics of cardiovascular disease: clinical implications. *J Intern Med* 2003 Feb; 253(2): 120-7



55. Stockinger S, Reutterer B, Schaljo B, Schellack C, Brunner S, Materna T, Yamamoto M, Akira S, Taniguchi T, Murray PJ, Müller M, Decker T: IFN regulatory factor 3-dependent induction of type I IFNs by intracellular bacteria is mediated by a TLR- and Nod2-independent mechanism. *J. Immunol.* 173, 7416–7425 (2004)
56. Stokes J 3<sup>rd</sup>, Kannel WB, Wolf PA, D'Agostino RB, Cupples LA: Blood pressure as a risk factor for cardiovascular disease. The Framingham Study – 30 years of follow-up. *Hypertension* 13 Suppl 5 (1989) 113-118
57. Strauer BE, Motz W: Hypertonie und Herz. *Internist* 29 (1988) 260-269
58. Strober W, Murray PJ, Kitani A, Watanabe T: Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2; 2006
59. Thome M, Hofmann K, Burns K, Martinon F, Bodmer JL, Mattmann C, Tschopp J: Identification of CARDIAK, a RIP-like kinase that associates with caspase-1. *Curr Biol* 1998 Jul 16; 8(15): 885-8
60. Virchow R: *Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medicin.* Berlin: Druck und Verlag von G. Reimer ed. Berlin; 1847
61. Weidinger S: Association of CARD15 polymorphisms with atopy-related traits in a population-based cohort of Caucasian adults. *Clin Exp Allergy.* 2005;35:866-72.
62. Wilfingseder D, Stoiber H: Quantifizierung von PCR-Produktmengen durch real-time PCR-Verfahren. *Antibiotica Monitor, Heft 1/2/2002*
63. Wilson PW, D'Agostino Rb, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB: Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation.* 1998;97:1837-47
64. Xu XH, Shah PK, Faure E, Equils O, Tomas L, Fishbein MC, Luthringer D, Xu XP, Rajavashisth TB, Yano J, Kaul S, Arditi M: Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. *Circulation.* 2001;104:3103-8



## **Danksagung**

Mein größter Dank gilt PD Dr. Nour Eddine El Mokhtari für die Überlassung des Themas und seine fachlich kompetente Betreuung und Unterstützung in allen Bereichen meiner Doktorarbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Rüdiger Simon und Prof. Dr. med. Norbert Frey sowie Herrn Prof. Dr. med. Stefan Schreiber möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, dass ich diese Arbeit an der Klinik für Kardiologie und dem Institut für Molekularbiologie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel unter ausgezeichneten Bedingungen durchführen konnte.

Mein ausdrücklicher Dank gilt auch Dr. Nothnagel, Institut für medizinische Informatik und Statistik, für die Unterstützung bei statistischen Fragestellungen.

Ein besonderer und großer Dank geht an meine Familie, die mir diese Doktorarbeit mit zeitlichem und seelischem Beistand erst ermöglichte. Und denen ich mit dieser Promotion eine Bestätigung ihrer Unterstützung liefern möchte.

Ebenso danke ich den Freunden und Freundinnen, die mir vor allem mit der Betreuung meiner Tochter zu Zeit verholfen haben.

## Lebenslauf:

Name	Cathrin Wilkesmann
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Geburtsdatum	29.09.1975
Geburtsort	Kiel
Bildungsweg	1982-1985 Grund- und Hauptschule Rickling 1986-1989 Dahlmansschule Bad Segeberg 1990-1995 Jungmannschule Eckernförde (Abitur)
Ausbildung	1996-1999 Physiotherapieschule Bad Iburg (Examen)
Studium	Wintersemester 2001: Beginn des Medizinstudiums an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel März 2003: Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
Famulaturen	Klinik für Rechtsmedizin der CAU Kiel (2005) Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der CAU Kiel (2005) Klinik für Gynäkologie der CAU Kiel (2006) Klinik für Kardiologie, CAU Kiel (2006) Praxis für Orthopädie Dr. W. Hunger, Kiel (2006)
Praktisches Jahr	1. Terial (02-06/2007): 1. Medizinische Klinik, Städtisches Krankenhaus Kiel 2. Terial (07-12/2007): Unfall- und Allgemein Chirurgie, CAU Kiel 3. Terial (11/2007-01/2008): Dr. A. Leybold, Praxis für Allgemeinmedizin, Kiel
Examen	April 2008

Berufserfahrung

Juni 2008: Assistenzärztin in Weiterbildung in der  
Rehaklinik Damp

Seit Juli 2008: Assistenzärztin in Weiterbildung für  
Orthopädie und Unfallchirurgie, Lubinus Clinicum, Kiel



