

Abteilung für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Komm. Direktor: Prof. Dr. J. Geisel

Bedeutung der p66^{Shc}-Promotormethylierung für die Atherosklerose

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

**der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2009

vorgelegt von: Steffen Roß

geb. am: 28. Mai 1980 in Pirmasens

Für:

Wilhelm Wagner

Gerda Wagner

Fritz Roß

Traute Roß

Thomas Roß

Gertraud Roß

Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

Inhaltsverzeichnis:

1.	Zusammenfassung	5
1.1	Zusammenfassung	5
1.2	Summary	6
2.	Einleitung und eigene Fragestellung	7
2.1	Atherosklerose und ihre Risikofaktoren	7
2.2	Genetik der Koronaren Herzerkrankung	9
2.3	DNA-Methylierung und Atherosklerose	11
2.4	Die Rolle von p66 ^{Shc}	14
2.5	Folgen veränderter Methylierung	19
2.6	Die Analyse der CpG-Methylierung in p66 ^{Shc} und LINE-1 mittels Bisulfit-Modifikation und Pyrosequenzierung	21
2.7	Eigene Fragestellung	23
3.	Material und Methodik	25
3.1	Verwendete Reagenzien	25
3.2	Verwendete Geräte	29
3.3	Weitere Materialien	31
3.4	Verwendete DNA und weitere Daten zu den untersuchten Proben	32
3.5	Methoden	33
3.5.1	DNA-Quantifizierung	33
3.5.2	Aufkonzentrierung	33
3.5.3	Schneiden der DNA mit Restriktionsenzymen	34
3.5.4	Bisulfit-Modifikation	34
3.5.5	Polymerasekettenreaktion	37
3.5.5.1	PCR des p66 ^{Shc} -Gens	38
3.5.5.1 A	1. PCR	38
3.5.5.1 B	Nested PCR	39
3.5.5.2	PCR der LINE-1-DNA-Abschnitte	40
3.5.5.2 A	1. PCR	40
3.5.5.2 B	Nested PCR	41
3.5.6	Gelelektrophorese zur Kontrolle der PCR-Effizienz	42

3.5.7	Pyrosequenzierung	43
3.5.7.1	Methylierung p66 ^{Shc}	47
3.5.7.2	Methylierung LINE-1	47
3.5.8	Statistische Analyse	48
<hr/>		
4.	Ergebnisse	49
4.1	Homogenität der Stichproben	49
4.2	Voraussetzungen für den T-Test bzw. ANOVA	52
4.2.1	Kontrollgruppe	52
4.2.2	KHK-Patienten	53
4.3	Statistische Bewertung der Ergebnisse	54
4.3.1	Methylierung in den LINE-1 als Maß für die Gesamtmethylierung	54
4.3.2	Promotormethylierung des p66 ^{Shc} -Gens	55
4.3.3	Einfluss der Anzahl der beteiligten Gefäße im Rahmen der Methylierung	57
4.3.4	Korrelation zwischen der Promotormethylierung von p66 ^{Shc} und der Methylierung in den LINE-1	60
4.3.5	Homocystein und Methylierung	61
4.3.6	Homocystein und Atherosklerose	63
4.3.7	Homocystein und Kreatinin	64
4.3.8	Homocystein und Lipoproteine	65
4.3.9	MTHFR-Polymorphismus und Methylierung	66
4.3.10	Korrelation zwischen HDL und CRP	70
4.3.11	Korrelation von HDL mit der Methylierung des p66 ^{Shc} -Gens	71
4.3.12	Durchführung einer rückwärts gerichteten Regressionsanalyse (Backward-regression)	72
4.3.13	Weitere signifikante Zusammenhänge nach Korrelationsanalyse	73
<hr/>		
5.	Diskussion	75
5.1	Homocystein, globale DNA-Methylierung und Atherosklerose	75
5.2	Methylierung von p66 ^{Shc} und Atherosklerose	79
5.3	Methylierung in p66 ^{Shc} , Lipoproteinstoffwechsel und CRP	84
<hr/>		
6.	Literaturverzeichnis	86

7. Danksagung 100

8. Lebenslauf 101

1. Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung

Die Atherosklerose wird nicht nur durch die bereits bekannten Risikofaktoren beeinflusst, sondern auch durch genetische Faktoren. Hier konnten einige direkt zur Atherosklerose führende Mutationen beschrieben werden, die allerdings höchstens fünf Prozent aller KHK-Fälle erklären können. Desweiteren werden die Wirkung von Suszeptibilitätsgenen und die Auswirkung epigenetischer DNA-Modifikationen, die das Erkrankungsrisiko erhöhen können, diskutiert. Eine Form epigenetischer Modifikation ist die DNA-Methylierung, bei der zwischen einer globalen DNA-Methylierung und einer genspezifischen DNA-Methylierung unterschieden werden kann. In dieser Arbeit werden in einer Fall-Kontroll-Studie die Methylierungsgrade in der Promotorregion des $p66^{\text{Shc}}$ -Gens und in den long interspersed nucleotide elements 1 (LINE-1) ermittelt. LINE-1 gilt als Marker für die Gesamtmethylierung. Für $p66^{\text{Shc}}$ konnte ein Einfluss auf die Vermittlung von oxidativem Stress, die Langlebigkeit eines Organismus und die Entstehung atherosklerotischer Läsionen nachgewiesen werden. Es ist also ein Genabschnitt, der in der Pathogenese der Atherosklerose eine Rolle spielen könnte.

Die Untersuchung wird an 40 Patienten mit klinisch manifester Koronarer Herzerkrankung und 40 gesunden Kontrollen durchgeführt. Nach Durchführung der Bisulfit-Modifikation erfolgt eine Amplifikation der DNA durch PCR und nested-PCR. Zur Quantifizierung wird die Methode der Pyrosequenzierung eingesetzt. Neben der Methylierung werden weitere, als Atheroskleroserisikofaktoren bekannte Laborwerte untersucht und auf Zusammenhänge mit den gemessenen Methylierungswerten überprüft. Da eine Promotormethylierung von $p66^{\text{Shc}}$ nachweislich zu einer Stilllegung der Genaktivität führt, wird im Vergleich mit der Kontrollgruppe für die KHK-Patienten eine geringere prozentuale Methylierung in der Promotorregion von $p66^{\text{Shc}}$ erwartet.

Nach Auswertung der Ergebnisse konnten diese Befunde nicht bestätigt werden. Es zeigten sich allerdings Zusammenhänge zwischen hohen Homocysteinwerten und einer verminderten Konzentration von HDL-Cholesterin. Außerdem stehen HDL-Cholesterin und die Promotormethylierung von $p66^{\text{Shc}}$, und damit dessen Inaktivierung, in signifikantem Zusammenhang. Sichere Erklärungen für diese

Korrelationen können zu diesem Zeitpunkt nicht gegeben werden. Die Erforschung der grundlegenden Pathophysiologie der Atherosklerose ist weiterhin notwendig. Auf dem Gebiet der Epigenetik erscheint eine weitere Forschungstätigkeit, die heute erst am Anfang steht, besonders aussichtsreich.

1.2 Summary

Atherosclerosis is not only influenced by the well known risk factors, but although by genetic factors. There are a few mutations leading directly to atherosclerosis. These mutations cause about 5 percent of all coronary heart disease (CHD) as the cardiac manifestation of atherosclerosis. Beyond this, the effects of susceptibility genes and epigenetic modifications have been discussed as factors which should cause an increasing morbidity. One possible epigenetic modification is the DNA methylation, which must be separated in genspecific and global methylation. In this examination, the promoter methylation of p66^{Shc} and the methylation of the long interspersed nucleotide elements 1 (LINE-1) are analysed in a case-control-study. LINE-1-methylation could be used as a surrogate marker for the whole genome methylation status. For the p66^{Shc} gene effects in the mediation of oxidative stress, longevity and the development of atherosclerotic lesions are described. The p66^{Shc} may be interesting in the understanding of atherosclerosis and its pathomechanism. The study includes 40 patients with clinically verified CHD and 40 healthy controls. After bisulfit modification the DNA is amplified by PCR. Additionally nested PCR is performed to improve the quality of the analysis. Then pyrosequencing is used for the quantification of methylated DNA. The results are estimated in comparison with the value of some of the atherosclerotic risk factors, like HDL cholesterol, homocysteine or CRP. The p66^{Shc} promoter is expected to be lower methylated in CHD patients than in the control group. After analysis this supposition could not be confirmed. However, a relationship between homocysteine and lower serum levels of HDL cholesterol could be noticed. Beside this, HDL cholesterol and the p66^{Shc} promoter methylation, therefore its inactivation, are correlated. This result could not be explained at this point. Continued investigations at these relations appear to be necessary. Especially the field of epigenetics seems to be promising for future research.

2. Einleitung und eigene Fragestellung

2.1 Atherosklerose und ihre Risikofaktoren

Atherosklerotische Krankheiten und ihre thrombotischen Komplikationen sind die führende Ursache für Mortalität und Morbidität in der westlichen Welt. In den Vereinigten Staaten von Amerika sind kardiovaskuläre Erkrankungen für 41,4% aller Todesfälle verantwortlich und damit die häufigste Todesursache (112). Laut dem Statistischen Bundesamt starben im Jahr 2005 in Deutschland über 250.000 Menschen an einer koronaren Herzkrankheit (KHK) oder den Folgen eines Myokardinfarktes (101).

Die Atherosklerose ist ein pathogenetisch spezifischer Prozess, der über Jahrzehnte abläuft und lokalisiert an großen und mittelgroßen arteriellen Gefäßen im gesamten Körper auftritt. Im fortgeschrittenen Stadium führt sie zu Organischämie oder Infarkt im entsprechenden Versorgungsbereich des arteriellen Stromgebietes (83).

Die klinisch bedeutsamen pathogenetischen Prinzipien bei der Atherosklerose sind die durch fibröse Plaque ausgelöste Stenosierung des Gefäßes und eine durch Ruptur einer instabilen Plaque ausgelöste Thrombosierung des betroffenen Gefäßabschnittes. Meist geht dies mit einem Infarkt im betreffenden Versorgungsgebiet einher. Je nach betroffener Region kann sich eine Atherosklerose klinisch als koronare Herzkrankheit, periphere arterielle Verschlusskrankheit, zerebrale Durchblutungsstörung oder viszerale Durchblutungsstörung manifestieren. Ausgangspunkt für atherosklerotische Läsionen ist, nach der „response to injury“-Theorie (90), eine lokale Funktionsstörung des Endothels in Form einer endothelialen Dysfunktion, die mit Veränderung der Adhäsions- und Permeabilitätseigenschaften des Endothels für Plasmabestandteile, sowie einer lokalen Produktion von Zytokinen, vasoaktiven Substanzen und Wachstumsfaktoren einhergeht. Außerdem sind Veränderungen der Leukozyten- und Thrombozytenfunktion wichtig.

Bei persistierender endothelialer Dysfunktion führt der fortgesetzte Entzündungsprozess zu einer Proliferation im subintimalen Raum des Gefäßes. Durch die Wachstumsfaktoren angeregt, wandern glatte Muskelzellen aus der Media in die Intima ein. Makrophagen nehmen modifizierte Lipoproteine (z.B. oxidierte LDL) über Scavenger-Rezeptoren auf. Im Gegensatz zur Aufnahme normaler LDL über den LDL-Rezeptor besteht bei der Aufnahme modifizierter LDL über Scavenger-Rezeptoren keine negative Rückkopplung. Die Makrophagen wandeln sich daraufhin in Schaumzellen um, da der Überschuss an Cholesterin als Cholesterinester in cytosolischen Fetttropfchen gespeichert wird. Es resultiert eine makroskopisch sichtbare

weiße Fettablagerung. Leukozyten und Thrombozyten lagern sich durch die veränderten Adhäsionseigenschaften an der Endotheloberfläche an und T-Lymphozyten werden aktiviert. Diese frühen atherosklerotischen Läsionen sind zum Teil bereits bei Kindern nachweisbar und führen in der Regel nicht zu einer relevanten Stenosierung des Gefäßes.

Die Entstehung von Intermediärläsionen erfolgt durch weitere Zelleinwanderung mit Proliferation glatter Muskelzellen. Es kommt zur Ausbildung einer fibrösen Matrix im Inneren der Läsion, die aus Proteoglykanen und Kollagen besteht. Spätläsionen bilden sich erst in Laufe von Jahren bis Jahrzehnten. Kennzeichen dieser komplizierten Plaques, die durch Fortschreiten der Stenosierung unter Einfluss von Wachstumsfaktoren (u. a. platelet-derived growth factor) entsteht, ist eine fibröse Kappe. Diese durch eingewanderte glatte Muskelzellen vom synthetischen Typ gebildete Kappe dichtet das Innere der Läsion gegenüber dem Gefäßlumen ab. Sie bedeckt die sich angesammelte Mischung aus Makrophagen, Leukozyten, Lipiden und Zelldebris, die einen nekrotischen Kern bilden. Die fortbestehende Endotheldysfunktion geht darüber hinaus mit einer gestörten Regulation der Vasomotorik im betroffenen Gefäßabschnitt einher. Die Stickstoffmonoxid-vermittelte endothelabhängige Vasodilatation, zum Beispiel nach einem Ischämieereiz, ist unzureichend oder fehlt ganz. Stattdessen überwiegen vasokonstriktorisch wirkende Mediatoren wie Endothelin, Thromboxan oder Angiotensin II. Bei Verlust der fibrösen Kappe im Sinne einer Ruptur oder Ulzeration wird der thrombogene Inhalt der Plaque freigelegt und führt akut zur Thrombosierung des Gefäßes. Für die mit der Zeit zunehmende Instabilität der Kappe sind anscheinend Proteasen und andere proteolytische Enzyme aus aktivierten Makrophagen verantwortlich.

Für die koronare Herzkrankheit werden abhängig von der Anzahl der verengten großen Koronararterien (RCA: right coronary artery, LAD: left anterior descending, RCX: Ramus circumflexus) zwischen Ein-, Zwei- oder Dreigefäßerkrankungen unterschieden.

Die Ursachen für die Entstehung einer KHK sind vielfältig und umfassen in den seltensten Fällen nur einen auslösenden Faktor. Bei der Prävention wird die Vermeidung oder Verminderung von Risikofaktoren empfohlen.

Es sind folgende Risikofaktoren für die Entstehung einer KHK bekannt (4, 17, 23, 26, 83, 86):

- Arterieller Hypertonus
- Nikotinkonsum (zwei- bis fünffach erhöhtes Risiko für Raucher gegenüber Nichtrauchern, ca. 20% aller KHK-Todesfälle sind mit inhalativem Zigarettenrauchen assoziiert)

- Diabetes mellitus (ca. 60% aller Todesfälle bei Diabetes mellitus werden durch eine KHK verursacht, bei Nicht-Diabetikern 20%)
- Adipositas
- körperliche Inaktivität
- Alter
- männliches Geschlecht
- Hypercholesterinämie (erhöhtes LDL- und Gesamtcholesterin)
- niedriges HDL-Cholesterin (erhöhtes HDL-Cholesterin wirkt kardioprotektiv)
- Lipoprotein (a) (ein erhöhter Lipoprotein (a)-Serumspiegel (>300 mg/l) ist ein unabhängiger Risikofaktor für eine KHK)
- Hyperfibrinogenämie
- Hyperhomocysteinämie
- psychosoziale Faktoren (Verarbeitung von beruflichem und privatem Stress, ehrgeiziges, kompetitives und konfliktbereites Verhalten- und niedriger sozialer Status)
- genetische Disposition (siehe 2.1.2)

2.2 Genetik der Koronaren Herzerkrankung

Wie gezeigt, verfügt die koronare Herzerkrankung über eine komplexe, multifaktorielle Ätiologie, die auch erbliche Faktoren umfasst. In neuerer Zeit wird bereits nach Lokalisationen für entsprechende Gene gesucht (30).

Die familiäre Häufung der KHK wurde durch etliche Studien belegt. So zeigen die Framingham Heart Study (22) und die deutsche PROCAM Studie (3) vergleichbare Resultate. Bei einem in frühem Lebensalter von einem Myokardinfarkt betroffenen Elternteil zeigte sich eine Risikoerhöhung um den Faktor 1,5-2,0. Auch Zwillingsstudien konnten diese Zahlen bestätigen. Der Einfluss der Genetik bei der Entwicklung einer KHK wird im Allgemeinen auf 40-60% geschätzt (67).

Bei komplexen Erkrankungen wie der KHK werden Gene, die unmittelbar zur Erkrankung führen von Suszeptibilitätsgenen unterschieden, welche die Entwicklung der Erkrankung verstärken oder vermindern. Die Grenze dieser Einteilung gilt als fließend und abhängig von der Mutation kann das gleiche Gen auch beiden Gruppen zugeordnet werden.

Unmittelbar zur KHK führende Gene dürften weniger als 5% der gesamten KHK-Fälle erklären. Beispielsweise kann hier die familiäre Hypercholesterinämie als Form eines LDL-Rezeptordefektes genannt werden. Die weitaus größere Zahl der KHK-Fälle ist allerdings nicht auf eine monogene Erkrankung zurückzuführen, sondern unterliegt einer komplexen Pathogenese. Diese umfasst neben genetischen Faktoren auch Lebensführung und Umwelteinflüsse.

Als Beispiel eines genetischen Einflusses kann hier das Apolipoprotein E (Apo E) dienen, dessen wichtige Rolle in der Pathogenese der KHK auf seine zentrale Bedeutung im Lipidstoffwechsel zurückzuführen ist. So dienen Knock-out-Mäuse für Apo E als Atherosklerosemodell. Unter anderem hemmt Apolipoprotein E die Thrombozytenaggregation und die Proliferation und Migration glatter Muskelzellen. Dabei besitzen unterschiedliche ApoE-Genotypen auch verschiedene Wirkungen auf das Serumcholesterin. Während Apo E4 mit einem erhöhten Cholesterinspiegel einhergeht, führt Apo E2 zu einer Cholesterinspiegelsenkung (98).

Ein weiteres Beispiel eines genetischen Polymorphismus, der das Risiko für die Entstehung einer Koronaren Herzerkrankung beeinflusst ist der Nukleotidaustausch C → T an Position 677 des Gens für die Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR). Bei den drei möglichen Genotypen CC, CT und TT konnte für den Genotypen TT eine Steigerung der Homocysteinwerte und eine, evtl. damit begründbare Erhöhung des KHK-Risikos nachgewiesen werden (54).

Genetische Faktoren tragen somit zumindest teilweise zu einem erhöhten Risiko für atherosklerotische Läsionen bei. Die Suche nach Suszeptibilitätsgenen ist in der Regel auf die Durchführung von Fall-Kontroll-Studien mit klinisch an KHK erkrankten Patienten und gesunden Kontrollen begrenzt. Bei den meisten untersuchten Genvarianten handelt es sich entweder um Punktmutationen (SNP: single nucleotide polymorphism) oder um Bereiche, in denen kurze Sequenzabschnitte mehrfach wiederholt werden (VNTR: variable number of tandem repeats). Hier soll eine Korrelation zwischen messbaren bekannten und genetischen Markern ermittelt werden, die dann eine Risikoabschätzung ähnlich dem PROCAM-Algorithmus ermöglichen soll.

Bereits in der Erprobung befindliche genetische Screeningtests in Form von Genchips sind der Versuch persönliche Risikofaktoren in der Bevölkerung zu ermitteln. Zwar können zum jetzigen Zeitpunkt etliche genetische Einflüsse einer Risikoerhöhung in einer Population zugeordnet werden, für die Risikoberechnung für einzelne Personen fehlen aber noch weitere Daten. So ist der Überblick über weitere Einflussfaktoren nicht nur bei proatherosklerotisch

wirkenden Faktoren noch nicht geben, sondern auch bei Varianten, die eine verminderte Atherosklerose bedingen (72). Umso wichtiger wird die möglichst vollständige Ermittlung von involvierten Faktoren.

Neben ApoE und MTHFR sind bereits über 100 weitere Kandidatengene aus den Bereichen Renin-Angiotensin-System, Gerinnungskaskade und Entzündungsmediatoren in die Untersuchungen einbezogen worden. Bei den Untersuchungen dieser Suszeptibilitätsgene ist es allerdings zu widersprüchlichen Ergebnissen gekommen. Daneben wird der Epigenetik, also Veränderungen auf Ebene der Genexpression, eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Atherosklerose zugeschrieben.

2.3 DNA-Methylierung und Atherosklerose

Epigenetik bedeutet die Änderung der Genexpression, ohne dass es zu einer Veränderung in der Basensequenz der DNA kommt. Der Einfluss auf die Genexpression erfolgt über Modifikationen an der DNA oder in der Abfolge der Transkription und Translation. Neben Veränderungen der Genfunktion sind also auch Änderungen der Genaktivität wirksam (27).

Ein epigenetischer Faktor, dem ein Einfluss auf die Genexpression nachgewiesen werden konnte, ist die DNA-Methylierung (27).

DNA-Methylierung bedeutet die postmitotische Anlagerung von Methylgruppen an die 5'-Position des Cytosinringes in CpG-Dinukleotiden. Dies bedeutet eine Modifikation des DNA-Abschnittes, an dem DNA-Bindungsproteine, bzw. Transkriptionsfaktoren angreifen (10). Einerseits können die epigenetischen Modifikationen nach DNA-Synthese kopiert und weitergegeben werden, andererseits sind auch akute Veränderungen des Methylierungsmusters möglich. Letztendlich führen sie zu einer merklichen Änderung der Chromatinstruktur, ohne dass eine unterschiedliche DNA-Sequenz vorliegen würde (27).

Ungefähr 70 Prozent der CpG-Dinukleotide des menschlichen Genoms sind naturgemäß methyliert (20). Das menschliche Genom besteht zu 0,8 – 1% aus 5-Methylcytosin, wobei je nach Gewebe ein unterschiedlicher Gehalt nachgewiesen werden kann. So ist der Gehalt an 5-Methylcytosin in Hirngewebe am größten (32). Die meisten dieser konstitutionell methyliert vorliegenden CpG-Dinukleotide liegen in Abschnitten des Genoms, die für das Stilllegen (Silencing) des Großteils der nicht-kodierenden Genabschnitte im menschlichen Genen verantwortlich sind, inklusive Introns, repetitiven Elementen und potentiell kodierenden Abschnitten (102).

Zusätzlich existieren sogenannte CpG-Inseln, also DNA-Abschnitte, die eine ungewöhnliche Dichte an CpG-Dinukleotiden aufweisen. Sie sind ungefähr alle 100 kbp entlang des Stranges nachweisbar und ihre Länge beträgt zwischen 0,5 bis 5 Kilobasenpaaren (kbp). Diese DNA-Abschnitte sind weitgehend unmethyliert und werden als CpG-Inseln bezeichnet (2, 21). CpG-Inseln wird eine mögliche Funktion als Replikationsursprung zugeordnet (25).

Obwohl CpG-Inseln allgemein nicht methyliert vorliegen, sind sie in den Mittelpunkt von Untersuchungen gelangt, bei denen es um die Rolle der DNA-Methylierung bei biologischen Prozessen geht. Es wurde gezeigt, dass die DNA-Methylierung für ein normales embryonales Wachstum (58), die X-chromosomale Inaktivierung (77), die genomische Prägung (59) und die Unterdrückung von retroviralen oder parasitären DNA-Sequenzen (110) essentiell ist. Weitere Forschungsergebnisse lassen den Schluss zu, dass die DNA-Methylierung in CpG-Inseln einen wichtigen Mechanismus bei der Entstehung von Neoplasien und Atherosklerose darstellt (27, 92).

Ein Stoffwechselweg mit Einfluss auf die DNA-Methylierung ist der Homocysteinmetabolismus. Homocystein ist ein Risikofaktor der Atherosklerose, wobei die genauen pathobiochemischen Prozesse unzureichend verstanden sind (33, 56, 87). Während viele Arbeiten den direkten Einfluss von Homocystein im Rahmen der Pathobiochemie untersuchen (33, 66, 100) besitzt Homocystein möglicherweise einen mehr indirekten Beitrag zur Entstehung oder Verstärkung der Atherosklerose über den Umweg einer Störung des Methylierungsprozesses, bzw. über S-Adenosylhomocystein (SAH) oder S-Adenosylmethionin (SAM). SAM ist der Donor für Methylgruppen im Rahmen der meisten Methylierungsvorgänge. Aus SAM entsteht nach Abgabe der Methylgruppe SAH, aus welchem dann durch Hydrolyse Homocystein entsteht. Um den Kreislauf zu schließen kann Homocystein durch die über 5-Methyltetrahydrofolat vermittelte Remethylierung zu Methionin umgewandelt werden oder es kann durch Transsulfurierung abgebaut werden. 5-Methyltetrahydrofolat entsteht durch die MTHFR-abhängige Umwandlung aus 5,10-Methylenetetrahydrofolat. Das bei der Remethylierung entstandene Methionin steht nun wieder als Ausgangsprodukt für die SAM-Synthese zur Verfügung. An der Remethylierung sind Vitamin B12 und Folsäure beteiligt.

Auf der einen Seite wird durch eine verminderte Remethylierung bei erhöhten Homocysteinwerten weniger SAM als Methylgruppendonor zur Verfügung gestellt, auf der anderen Seite kann durch die Umkehrung der Hydrolyse von SAH zu Homocystein die Konzentration von SAH ansteigen. Dies wäre ein weiteres Erklärungsmuster, da SAH ein

starker Inhibitor von Methylierungsprozessen ist (118). Eine Umkehr der Hydrolyse wäre bei erhöhten zellulären Homocysteinwerten denkbar wahrscheinlich.

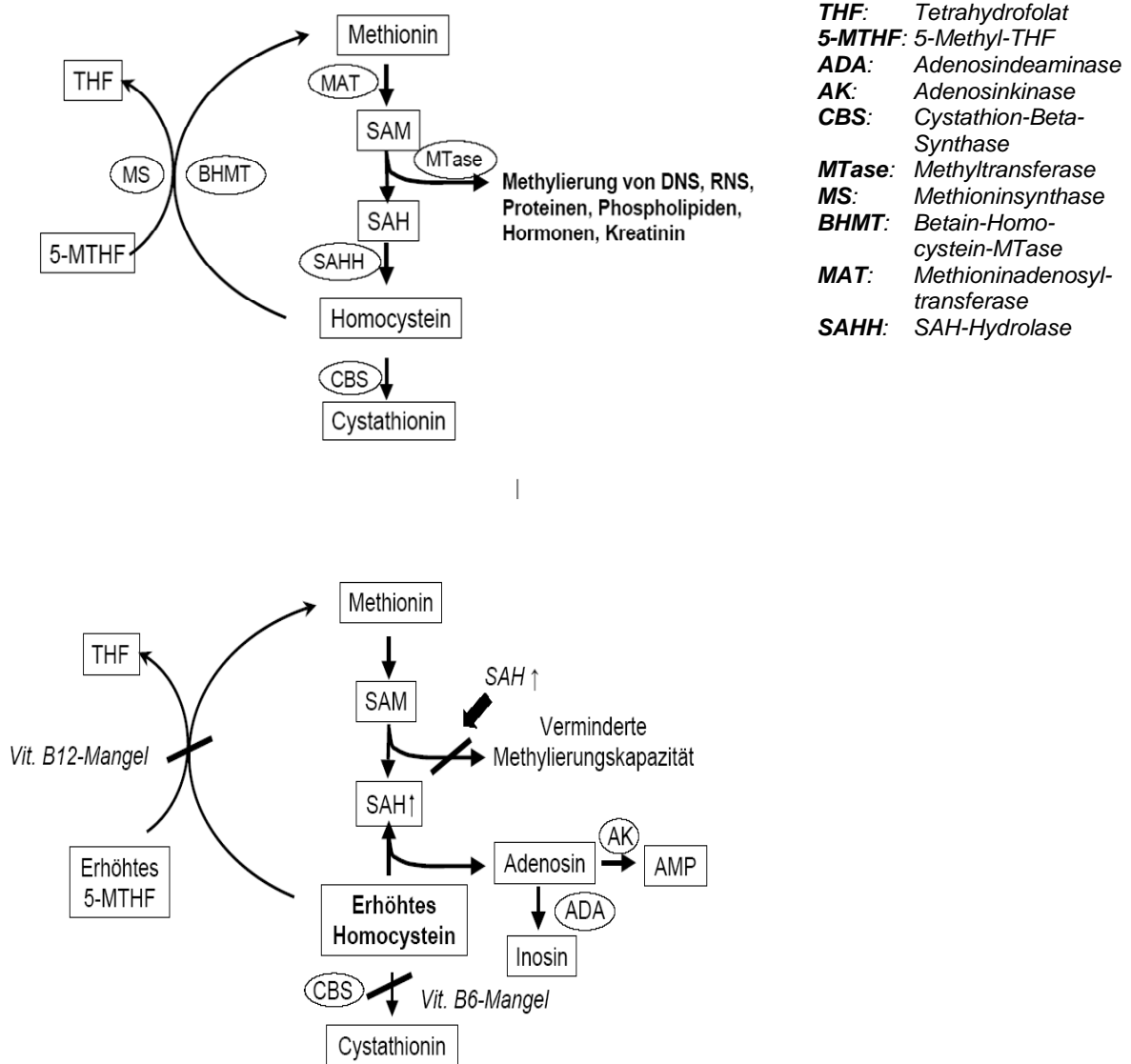


Abb. 2.1: Homocysteinemetabolismus und DNA-Methylierung (118)

Ziel dieser Arbeit ist es mehr auf den epigenetischen Faktor DNA-Methylierung im Rahmen der Atherosklerose einzugehen als auf die Rolle des Homocysteins.

Die Folgen veränderter Methylierung können vielfältig sein. Eine wichtige Rolle spielt die DNA-Methylierung von antiproliferativ wirkenden Genen in der Entstehung der Atherosklerose. Untersuchungen zeigen eine Hypermethylierung des Östrogenrezeptor α

(ER α)-Gens in Gefäßmuskelzellen (contractile smooth muscle cells, sog. SMC) von Patienten mit koronar-arteriellem Bypass und in eingewanderten Gefäßmuskelzellen aus entfernten atherosklerotischen Plaques im Vergleich zu gleichartigen Zellen gesunder Kontrollen (27).

Ein Gen, dessen Methylierungsstatus im Rahmen der Atherosklerose untersucht wurde ist p53 (39). Als Tumorsuppressorprotein hat p53 antiproliferative und proapoptotische Wirkung. Embryonale Fibroblasten von p53-Knock-out-Mäusen zeigten höhere Proliferationsraten im Vergleich zum Wildtyp. Doppel-Knock-out-Mäuse für p53 und das antiatherosklerotisch wirkende Apolipoprotein E (ApoE) zeigten nach 6, 10 und 15 Tagen fettreicher Ernährung eine um 50-100 Prozent erhöhte Rate an atherosklerotischen Läsionen als bei Knock-out-Mäusen nur für Apolipoprotein E. Ebenfalls können mehr eingewanderte Zellen in den Läsionen nachgewiesen werden. Also scheint p53 eine antiatherosklerotische Wirkung über die Hemmung der Zellproliferation zu haben. Eine Herunterregulation von p53 entsteht nachweislich durch DNA-Methylierung in seiner Promotorregion (88). Ebenfalls bewiesen werden konnte, dass in atherosklerotisch veränderten Aorten von Kaninchen ein geringerer Gehalt an methyliertem Cytosin vorhanden war als in den Kontrollproben (57). Es scheint also einen Zusammenhang zwischen Methylierungsstatus und Grad der atherosklerotischen Veränderungen zu geben (27). Ein interessanter Kandidat für Untersuchungen scheint ein Teilabschnitt des ShcA-Gens, p66^{Shc}, und dessen Expression zu sein.

2.4 Die Rolle von p66^{Shc}

Im menschlichen Genom werden drei Shc-Gene beschrieben ShcA, ShcB (Sli) und ShcC (Rai) (65). ShcA-Proteine können in allen menschlichen Zellen, mit Ausnahme der Zellen des ZNS und peripherer Nervenzellen, nachgewiesen werden. Dort werden ShcB- und ShcC-Proteine exprimiert (16, 19, 65).

ShcA kodiert für zwei mRNAs: p66^{Shc} und p46/p52^{Shc}. Die Startpunkte der Transkription beider mRNAs liegen ca. 3900 bp voneinander entfernt. Wegen dem Vorhandensein von alternativen Translationsstartpunkten können aus dem Abschnitt p46/p52^{Shc} zwei Proteine entstehen: p46^{Shc} und p52^{Shc}, die aus der gleichen mRNA erzeugt werden (108).

Alle drei Shc-Proteine sind an der Informationsübertragung bei Mitose und Onkogenese beteiligt, da sie Signale über verschiedene Rezeptoren regulieren. Sie besitzen alle drei eine N-terminale Phosphotyrosin-Bindungsdomäne (PTB), eine zentrale Prolin-reiche Domäne

(CH1) und eine carboxyterminale src homology 2 (SH2) Domäne (65). p66^{Shc} besitzt zusätzlich eine weitere N-terminale Prolin-reiche Domäne (CH2) (65). Die SH2-Domäne ist für verschiedene Interaktionen wichtig, wie z.B. für die mit epidermalen Wachstumsfaktoren (EGF). PTB kann an Phospholipide binden, was auch eine Rolle bei der Aktivierung von Shc über die Phosphatidylinositol-3-kinase spielt, wie sie z.B. durch Insulin hervorgerufen wird, welches die Phosphorylierung von Tyrosin in Shc auslöst (12, 75, 105). Dieses und auch die Interaktion zwischen SH2-Domäne und EGF-Rezeptortyrosinkinase ist bei der Tyrosin-Phosphorylierung der CH1-Domäne von Shc beteiligt. Diese Tyrosin-Phosphorylierung von p46^{Shc} und p52^{Shc} löst ihre Bindung an das Grb2-Protein, was dann zu einer Aktivierung des Guanin-Nukleotid-Austauschfaktors SOS führt. Am Ende dieser Kaskade steht die Induktion von Ras und der mitogen-activated-protein-Kinase (MAPK)-Kaskade (12, 69, 75).

Die Induktion von Ras erfolgt hierbei durch Grb2, wenn sich p46^{Shc} und p52^{Shc} gelöst haben. Dies führt letztlich zur Apoptose der Zelle. p66^{Shc} wird keine fördernde Wirkung bei der Induktion des Ras-Signalweges zugeschrieben (69). p66^{Shc} scheint als entscheidender Regulator der hemmenden Wirkung von p46^{Shc} und p52^{Shc} auf die Ras-Aktivierung sogar entgegenzuwirken, indem es mit p46^{Shc} und p52^{Shc} um die Bindung am Grb2-Protein konkurriert (75).

p66^{Shc} besitzt zwei Serin-Phosphorylierungsabschnitte: Ser36 in der CH2-Domäne und Ser138 in der PTB-Domäne. Ser 36 scheint den intrazellulären oxidativen Stress und die Apoptose zu beeinflussen, die über die Wirkung von sog. Forkhead-Transkriptionsfaktoren reguliert werden (81). Besonders interessant ist, dass bei Studien mit Knock-out-Mäusen für p66^{Shc} deren Lebensdauer um ca. 30 Prozent verlängert wurde (70).

Zum jetzigen Zeitpunkt werden zwei alternative Hypothesen diskutiert, über die p66^{Shc} wirken könnte (s. Abb. 2.2).

Vermutet wird einerseits, dass es durch die Aktivierung von p66^{Shc} zu einer Inaktivierung von Forkhead-Transkriptionsfaktoren kommt, die dann zu einer verminderten Expression von antioxidant wirkenden Enzymen wie z. B. Katalase, führt. Im Umkehrschluss wird also bei fehlender Expression von p66^{Shc} die Bildung von Antioxidantien begünstigt und oxidativer Stress vermehrt abgefangen.

Alternativ zu dieser Hypothese besteht die Vermutung p66^{Shc} wirke über eine intramitochondriale Bildung von Wasserstoffperoxid (H₂O₂). Dies kann zu einer Permeabilitätszunahme der Mitochondrienmembran führen. Daraufhin folgt eine Freisetzung von Cytochrom C und eine Aktivierung von apoptotisch wirkenden Kaspasen (74, 76).

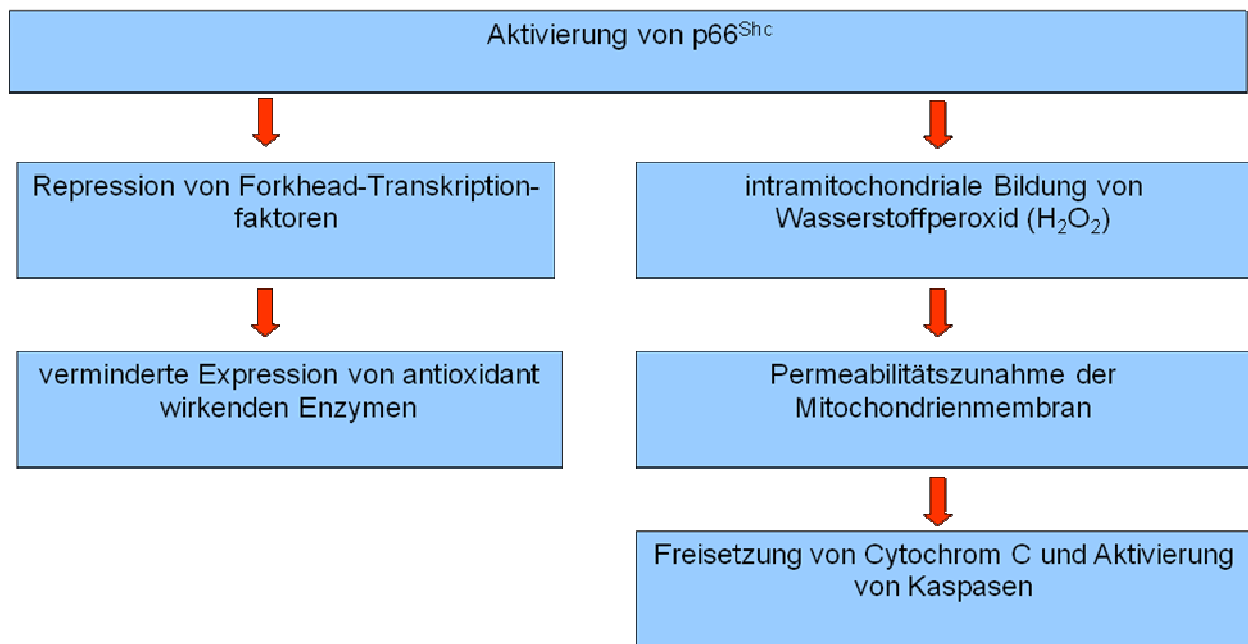
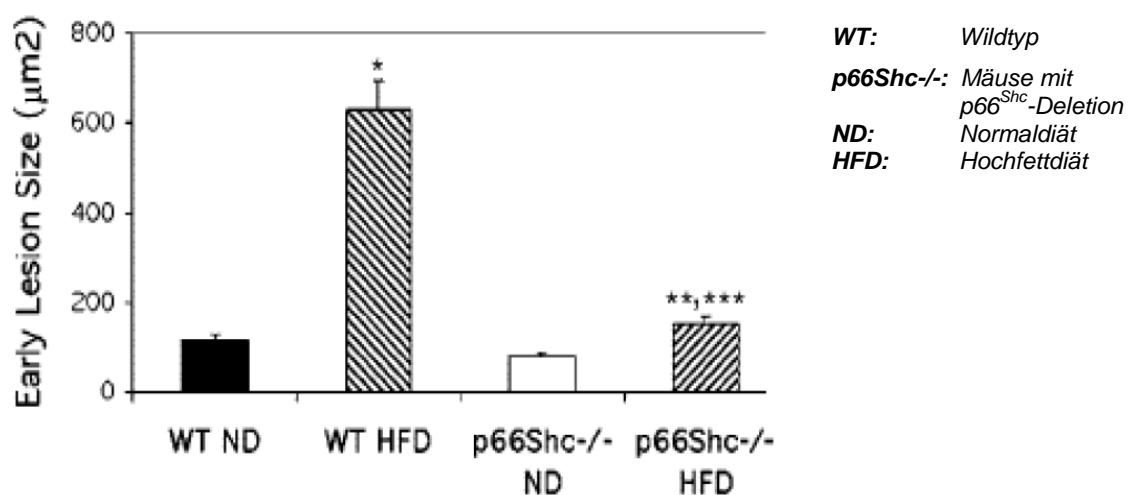


Abb. 2.2: Hypothesen über die Wirkung von p66^{Shc}

Von besonderer Bedeutung scheint die Expression von p66^{Shc} auch bei der Entstehung der Atherosklerose zu sein. So konnte nachgewiesen werden, dass sich unter einer mehrwöchigen hochfettthaltigen Diät bei nur drei Prozent von im Labor gezüchteten Mäusen (70) mit einer Deletion von p66^{Shc} Frühläsionen im Sinne der Atherosklerose ausbildeten, während 21% der Wildtypmäuse eine solche Läsion aufwiesen. Ein signifikanter Unterschied ergab sich auch für die Größe der atherosklerotischen Plaques, was Abbildung 2.3 verdeutlicht (73).



* $P < 0,00001$ vs. WT (ND); ** $P < 0,05$ vs. p66Shc^{-/-} (ND); *** $P < 0,001$ vs. WT (HFD)

Abb. 2.3: Größe der Frühläsionen (Early Lesion Size) in Abhängigkeit von Genotyp und Ernährung bei Mäusen (73)

Die p66^{Shc}-Promotorregion enthält acht CpG-Dinukleotide, die auf eine Gesamtlänge von 200 bp verteilt sind. Diese acht CpG-Dinukleotide liegen an Position -138, -127, -78, -53, -30, +16, +23 und +30 (108). In Zellkulturexperimenten führt die in vitro-Methylierung mit SssI Methyltransferase zu einer Hemmung der p66^{Shc}-Aktivität (Abb. 2.4). Dies bestätigt eine generelle Beeinflussbarkeit der p66^{Shc}-Genaktivität über die DNA-Methylierung.

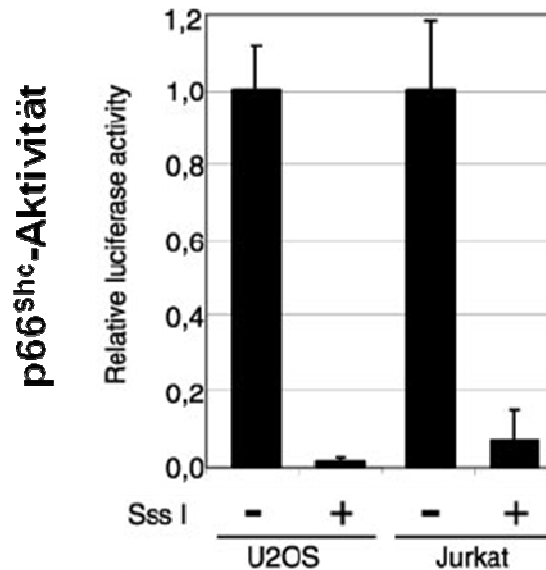
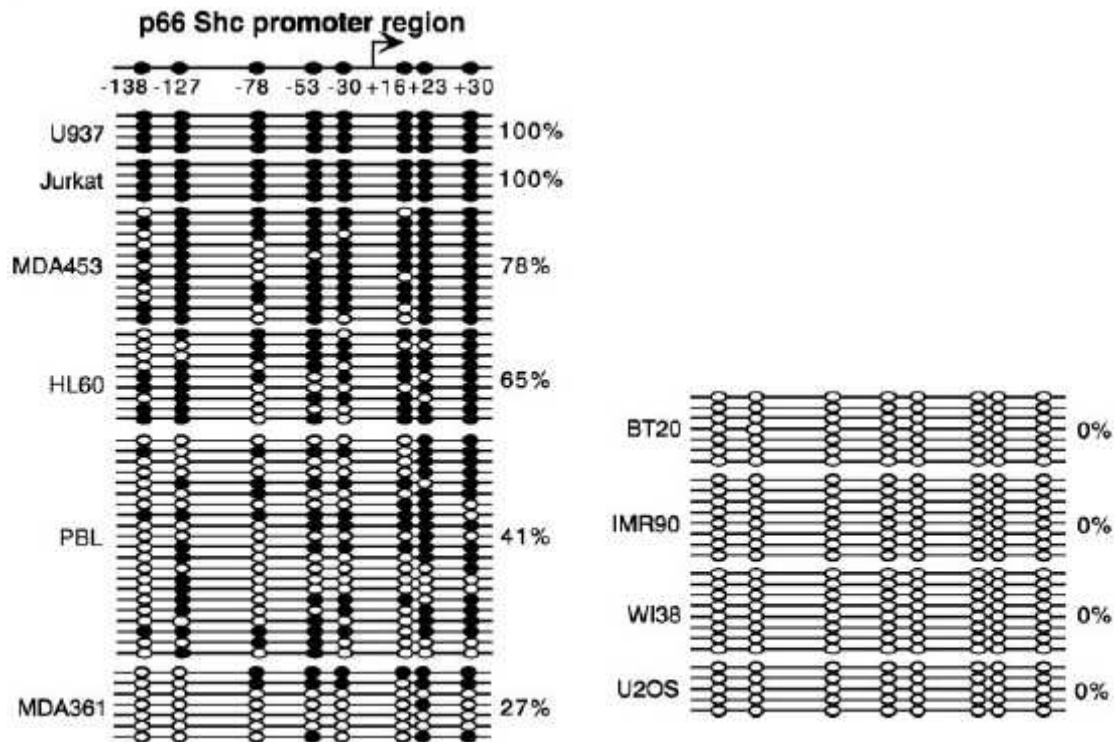


Abb. 2.4: p66^{Shc}-Aktivität in kulturell angezüchteten Zelllinien vor (-) und nach (+) Behandlung mit SssI Methyltransferase (108)

Dabei ist zu beachten, dass p66^{Shc} bereits physiologisch in verschiedenen Zelllinien unterschiedlich exprimiert wird. In den o.g. Zellkulturexperimenten war in sechs von neun kulturell angezüchteten Zelllinien entweder jedes oder kein CpG-Dinukleotid methyliert. Bei aus peripherem Blut isolierten mononukleären Zellen waren in 21 Proben durchschnittlich 41% der CpG-Stellen methyliert (Abb. 2.5). Dieses inhomogene Methylierungsmuster bietet epigenetischen Modifikationen die Möglichkeit der Beeinflussung im Sinne einer Stilllegung oder einer Aktivierung der Genexpression.



U937, Jurkat, MDA453, HL60, MDA361, BT20, IMR90, WI38, U2OS: kulturell angezüchtete Zelllinien
PBL: aus peripherem Blut isolierte mononukleäre Zellen

Abb. 2.5: $p66^{Shc}$ -Promotormethylierung in verschiedenen Zelltypen. Ein ausgefüllter Punkt steht für ein methyliertes CpG-Dinukleotid (108)

Überträgt man das Studienergebnis an den Knock-out-Mäusen und die Zellkulturexperimente auf den Menschen, folgt daraus die Möglichkeit, dass die $p66^{Shc}$ -Promotormethylierung zu einer Hemmung der $p66^{Shc}$ -Expression führt. Hypothetisch könnte dieser epigenetische Faktor den menschlichen Altersvorgang und die Atheroskleroseentstehung beeinflussen und unterschiedliche Lebensdauer oder unterschiedliche Ausprägung der Atherosklerose in verschiedenen Individuen zumindest teilweise erklären (81).

2.5 Folgen veränderter Methylierung

Wie gezeigt, kommt der DNA-Methylierung eine besondere Funktion bei der Stilllegung und Überexpression von Genen zu. Dabei ist zwischen einer globalen DNA-Methylierung und einer genspezifischen DNA-Methylierung zu unterscheiden. Globale und genspezifische DNA-Methylierung können an der Entstehung von Krankheiten beteiligt sein. Eine abweichende Methylierung im Sinne von globaler DNA-Hypomethylierung hat eine Bedeutung in der Onkogenese (7, 48, 92). So kann die Wirkung veränderter Methylierung einerseits über die Stilllegung von Genen oder andererseits auch über eine höhere Mutationrate von Methylcytosin im Vergleich zu Cytosin und somit über eine Chromosomeninstabilität erklärt werden (85).

In vielen neoplastischen Zellen und Tumoren wurde, zusätzlich zu einer globalen Hypomethylierung (107), eine auf die Promotorregion spezifische Hypermethylierung nachgewiesen. Im Speziellen konnte eine hohe Rate derart veränderter Methylierung bei einigen hämatopoetischen Neoplasien gezeigt werden (45).

Im Zusammenhang mit dem Bronchialkarzinom und Lymphomen konnten veränderte Methylierungsmuster im Gen für Calcitonin (6) bewiesen werden. Ein weiteres Beispiel für die epigenetische Modifikation in regulatorischen Abschnitten einzelner Gene ist die Methylierung im Gen für MyoD1. MyoD1 ist ein normalerweise ausschließlich im Skelettmuskel exprimiertes Gen, dessen Aktivierung zum Ende der Zellteilung führt. In immortalisierten Zelllinien wurde eine abnorm hohe Methylierung in den CpG-Inseln dieses Gens gemessen (47).

Der erste Beweis eines Tumorsuppressorgens, das durch Hypermethylierung inaktiviert wird gelang beim RB1-Gen, bei dem Methylierung als Alternative zu Mutation und Deletion für die Stilllegung der Expression funktioneller Proteine nachgewiesen wurde (91). Seitdem konnten bei verschiedenen Tumorsuppressorgenen gleichartige Inaktivierungsmechanismen beschrieben werden, zum Beispiel bei VHL (42), P16 (68), E-Cadherin (50) und hMLH1 (51). Gut untersucht ist der Einfluss lokaler DNA-Hypermethylierung bei der Entstehung von colorektalen Karzinomen (104) und beim Prostatakarzinom, bei dem Hypermethylierung in den Genen für den Androgenrezeptor, den Endothelin B Rezeptor und für GST-pi nachgewiesen werden konnte (92). Inhalt aktueller Forschung sind die sich aus diesen Erkenntnissen ergebenden therapeutischen Möglichkeiten. Medikamente, die die Methylierung vermindern können, sind bereits in der Erprobung. So konnten für 5-Azacytidin und für Decitabin therapeutische Wirkungen in der Behandlung der Chronisch Myeloischen

Leukämie (CML) gezeigt werden. Als Niedrigdosistherapie konnte Decitabin bei Patienten, die nicht auf die herkömmliche Therapie ansprachen, erfolgreich eingesetzt werden. So wiesen Patienten mit Philadelphia Chromosom-positiver CML, die nicht auf eine Therapie mit Imatinib ansprachen eine höhere kumulative Überlebenszeit auf, falls sie auf die Therapie mit Decitabin eingestellt wurden (46). Im Jahr 2006 wurde Decitabin von der FDA für die Behandlung des Myelodysplastischen Syndroms zugelassen.

Hypermethylierung, die theoretisch durch Abschaltung von Tumorsuppressorgen an allen Stellen der Tumorentstehung beteiligt sein kann (92), ist allerdings nicht immer sicheres Zeichen einer neoplastischen Veränderung oder bringt diese zwangsläufig mit sich. So ist es möglich, dass die involvierten CpG-Inseln nicht im Promotorbereich des Gens liegen (8) oder die hypermethylierten, stillgelegten Gene schon vorher in den betroffenen Zellen nicht aktiviert waren (1).

Die Gründe für eine abweichende Methylierung in Krebszellen sind nicht hinreichend geklärt, sicher bleibt aber, dass die Hypomethylierung im Alter stärker ausgeprägt ist (9). Im sehr komplexen Alterungsprozess geschehen signifikante Änderungen, die Proteine, Lipide und Aminosäuren betreffen. Eine der Änderungen, die während des Alterungsprozesses abläuft ist die Zunahme der DNA-Methylierung. Die Auswirkungen auf die Genexpression könnte über die Jahre vielleicht auch die altersabhängige Zunahme der Inzidenz von Krebserkrankungen erklären (84, 92).

Zusammenfassend kann der globalen DNA-Methylierung ein eher allgemeiner Informationsgehalt über z. B. die Mutagenität des Genoms zugeschrieben werden, während die genspezifische DNA-Methylierung konkreten Einfluss auf die Genexpression nimmt.

2.6 Die Analyse der CpG-Methylierung in p66^{Shc} und LINE-1 mittels Bisulfit-Modifikation und Pyrosequenzierung

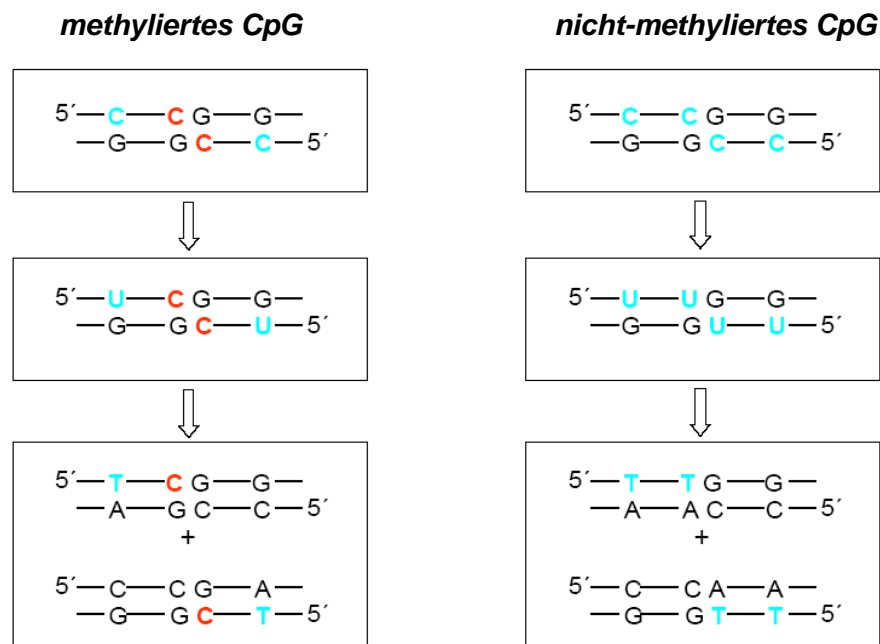
Die DNA-Methylierung ist, wie oben ausgeführt, ein wichtiger epigenetischer Faktor, der eine bedeutende Rolle bei der Regulation der Genexpression besitzt (10). Diese Unterschiede in der Genexpression könnten eine Erklärung für die Entstehung verschiedenster Krankheiten geben. Dabei ist zwischen DNA-Methylierung des gesamten Genoms und der genspezifischen DNA-Methylierung zu unterscheiden. So dient die genspezifische Methylierung der Abschaltung von Genen, was auch als Gene silencing bezeichnet wird.

Die Messung der DNA-Methylierung wird in der vorliegenden Arbeit für die Promotorregion von p66^{Shc} und für die repetitiven DNA-Elemente LINE-1 (long interspersed elements) durchgeführt.

Diese LINE-1-Elemente umfassen mit rund 500.000 repetitiven Elementen circa 21% der gesamten DNA und liegen in Längen von einigen Hundert bis zu ungefähr 9000 Basenpaaren vor (52). Die gemessene Methylierung in den LINE-1-Elementen ist adäquat der Methylierung aller nicht-kodierenden Anteile des Genoms. Die Methylierung in LINE-1 dient somit als Surrogatmarker für die Gesamtmethylierung.

Die Analyse des p66^{Shc}-Genabschnittes bestimmt den Methylierungsstatus dieses spezifischen DNA-Abschnittes und kann als Maß für die Ruhigstellung oder Aktivierung des Gens verstanden werden.

Die DNA-Methylierung findet nur an Cytosin mit nachfolgendem Guanosin -abgekürzt CpG- statt, welches in 5-Methyl-Cytosin umgewandelt wird. Da das Vorhandensein von 5-Methyl-Cytosin in der Promotorregion von Genen die Anlagerung von Transskriptionsfaktoren verhindert, führt dies zum Ausschalten des Gens da die nachfolgende Genexpression nicht stattfindet. Eine Möglichkeit diese 5-Methyl-Cytosine in der Basenabfolge aufzuspüren ist die Bisulfit-Modifikation. Im Rahmen dieser Modifikation werden alle unmethylierten CpG in UpG umgewandelt. Nach einer darauffolgenden Polymerasekettenreaktion liegen diese UpG als TpG vor. Die methylierten CpG können nicht in UpG umgewandelt werden und sind somit auch nach Polymerasekettenreaktion unverändert als CpG nachweisbar (18).



nicht-methyliertes CpG

methyliertes CpG

Abb. 2.6: DNA-Analyse durch Bisulfit-Modifikation

Zur Differenzierung zwischen TpG und CpG wird im Anschluss an die PCR eine DNA-Sequenzierung durchgeführt. Hier bietet die Pyrosequenzierung einige Vorteile. Bei der Pyrosequenzierung kann die Quantifizierung anhand der Peakhöhe vorgenommen werden (Beispiel siehe Abschnitt 3.5.7.1), während andere Methoden keine quantitative Beurteilung über die Peakhöhe ermöglichen. Um den prozentualen Anteil eines Peaks zum anderen zu berechnen ist die Pyrosequenzierung also unverzichtbar. Außerdem ermöglicht sie eine akkurate Quantifizierung multipler DNA-Methylierungsstellen in einer einzigen Sequenzierung. Es entstehen weniger Artefakte und eine Gelelektrophorese ist verzichtbar (114).

Für die Quantifizierung der globalen DNA-Methylierung mittels Pyrosequenzierung ist es notwendig die Zahl der methylierbaren CpG-Stellen innerhalb der LINE-1-Elemente zu bestimmen. In Referenzmaterial (Hct116-Zellen) wurde nach Behandlung mit SssI Methyltransferase ein Methylierungsgrad von ca. 77% gemessen (114). Dieser Methylierungsgrad ist unter anderem vom Geschlecht abhängig und beträgt bei Männern durchschnittlich 78,74% und bei Frauen durchschnittlich 76,56% (29). In einem Vergleich von Messungen per Pyrosequenzierung (106) und bewährten Methoden konnten keine signifikanten Unterschiede berichtet werden (18, 113). In dieser Promotionsarbeit erfolgt die Messung durch Nutzung der Pyrosequenzierung.

2.7 Eigene Fragestellung

Die große Inzidenz der Koronaren Herzerkrankung als kardiale Manifestationsform der Atherosklerose in den Industrienationen lässt sich alleine durch den Lebensstil nicht erklären. Neben gut bekannten Risikofaktoren beeinflusst auch die Genetik die Entstehung von Atherosklerose. Hier konnten einige direkt zur Atherosklerose führende Mutationen beschrieben werden, die allerdings höchstens fünf Prozent aller KHK-Fälle erklären können. Weitere Forschungsergebnisse beschreiben die Wirkung von Suszeptibilitätsgenen und die Auswirkungen epigenetischer DNA-Modifikationen, die das Erkrankungsrisiko erhöhen können.

Eine epigenetische Modifikationsmöglichkeit ist die DNA-Methylierung. Bei der Krankheitsentstehung muss zwischen einer globalen DNA-Methylierung und einer genspezifischen DNA-Methylierung unterschieden werden. Erfolgt eine DNA-Hypermethylierung an CpG-Dinukleotiden im Promotorbereich eines Gens führt dies zu einer Inaktivierung der Genexpression. Weißt die Promotorregion einen geringeren Methylierungsgrad auf ist das entsprechende Gen verstärkt exprimiert. Ein Einflussfaktor auf die Methylierung ist Homocystein. Bei Störung der Homocysteinmetabolisierung wird der Plasmaspiegel von Homocystein erhöht. Es kommt zu einer Umkehrung der Hydrolyse, bei der normalerweise aus S-Adenosylhomocystein (SAH) Homocystein gebildet wird. Die Konzentration von SAH steigt dadurch an. SAH ist ein starker Inhibitor von Methylierungsprozessen und könnte so Einfluss auf die Genexpression haben. Da der Homocysteinspiegel bei KHK-Patienten erhöht ist (33), könnte ein Pathomechanismus über die Aktivierung proatherosklerotisch wirkender Gene verlaufen.

Ein Gen, das in diesem Zusammenhang interessant für den Pathomechanismus sein könnte, ist p66^{Shc}. Für p66^{Shc} konnte ein Einfluss auf die Vermittlung von oxidativem Stress, die Langlebigkeit eines Organismus und die Entstehung atherosklerotischer Läsionen nachgewiesen werden. Eine Aktivierung von p66^{Shc} geht mit der Herunterregulation von antioxidativ wirkenden Enzymen und mit der Ausschüttung apoptotisch wirkender Kaspasen und von Cytochrom C einher. Neben der vermuteten DNA-Hypomethylierung in der Promotorregion von p66^{Shc}, was eine Aktivierung von p66^{Shc} bedeuten würde, wird auch die im Alterungsprozess einsetzende globale Hypomethylierung untersucht, die bei vielen neoplastischen Veränderungen eine Rolle spielt. Eine durch Homocystein- oder SAH-Einfluss verstärkte globale und genspezifische DNA-Hypomethylierung könnte wichtige

Erkenntnisse im Rahmen von Prävention, Diagnostik und Therapie der Atherosklerose erbringen.

In dieser Arbeit sollen Unterschiede im Methylierungsmuster zwischen klinisch gesunden Kontrollen und Patienten mit klinisch manifester KHK nachgewiesen werden. Aus den Erkenntnissen früherer Untersuchungen zur DNA-Methylierung und zur Funktion von p66^{Shc} wird bei den KHK-Patienten eine geringere prozentuale Methylierung in der Promotorregion von p66^{Shc} erwartet. Zur Auswertung der Arbeit wurde für alle Patienten und Kontrollen die prozentuale Promotormethylierung in p66^{Shc} und die Methylierung in den long interspersed nucleotide elements 1 (LINE-1), als Marker für die Gesamtmethylierung, ermittelt. Weitere Serumwerte, u. a. von kardiovaskulären Risikofaktoren, wurden der Untersuchung von Geisel et al. (33) entnommen (siehe Abschnitt 3.4).

3. Material und Methodik

3.1 Verwendete Reagenzien

Alkohol:	70% (v/v) 2-Propanol von Aug. Hedinger, 70327 Stuttgart, Deutschland
Destilliertes Wasser:	Ecotainer Aqua B. Braun 1000 ml sterile Spüllösung von B. Braun Melsungen AG, 34209 Melsungen, Deutschland
Dest. Wasser (für PCR):	Molekular Biology Grade 10x50 ml von Eppendorf, 22331 Hamburg, Deutschland
EcoR1 Puffer:	10x EcoR1 Puffer von Fermentas, 68789 St. Leon-Rot, Deutschland #ERO271 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl ₂ , 100 mM NaCl, 0,02% Triton X-100, 0,1 mg/ml BSA
EcoR1 Enzym:	Restriktionsendonuklease EcoR1 von Fermentas, 68789 St. Leon-Rot, Deutschland #ERO271 Konz.: 10 units/μl Quelle: E. coli mit geklontem ecoR1R-Gen von Escherichia coli RY13
Natriumdisulfit:	Na ₂ O ₅ S ₂ ; M=190,1 g/mol; 500 g von Merck KGaA; 64271 Darmstadt, Deutschland für je vier Proben werden 1,9 g in einem 15 ml Gefäß lichtgeschützt aufbewahrt
Hydrochinon:	C ₆ H ₆ O ₂ ; M=110,11 g/mol; 250 g von Merck KGaA; 64271 Darmstadt, Deutschland Für je vier Proben werden 55 mg in einem 1,5 ml Gefäß lichtgeschützt aufbewahrt

NaOH:	5M NaOH von VWR International GmbH, Wien, Österreich
GTG-Agarose:	NuSieve GTG Agarose von Cambrex BioScience Rockland Inc., Rockland Maine, USA
1xTBE-Puffer:	5xTris-Borate-EDTA-Puffer von Eppendorf, 22331 Hamburg, Deutschland
Amplifikationspuffer:	10x Konz. + MgCl ₂ von Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
MgCl ₂ :	MgCl ₂ stock solution von Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
dTNP-Mix:	40 µmol von Promega Corp., Madison, Wisconsin, USA
Taq DNA Polymerase:	1647 687 / 1000 U, 1 unit/µl von Roche Applied Science, 82372 Penzberg, Deutschland
Glycerin:	87% von Merck KGaA; 64271 Darmstadt, Deutschland
Stop-Mix:	2,38 ml Glycerin (> 99,5% für die Fluoreszenzmikroskopie) 2 ml 250 mM EDTA 1,0 ml Bromphenolblau 1,00% 2,5 ml Xylencyanol 0,25% 2,1 ml steriles Wasser
Ethidiumbromid:	C ₂₁ H ₂₀ BrN ₃ , ≥ 98% zur DNA-Färbung von Carl Roth, 76185 Karlsruhe, Deutschland
Universal-Agarose:	von peqLab Biotechnologie GmbH, 91052 Erlangen, Deutschland

1-KB-Marker:	von Gibco BRL Life Technologies, 76344 Eggenstein, Deutschland
Bindungspuffer:	40-0033 von Biotage, Uppsala, Schweden, 200 ml
Sepharose:	Streptavidin Sepharose HP (5 ml) von Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Denaturierungslösung:	40-0034 von Biotage, Uppsala, Schweden, 500 ml
Ethanol:	70% aus Riedel-de Haen-Ethanol absolut 2,5 l von Honeywell Special Chemicals Seelze GmbH, 30926 Seelze, Deutschland
Waschpuffer:	40-0035 von Biotage, Uppsala, Schweden, 200 ml
Annealing-Puffer:	40-0036 von Biotage, Uppsala, Schweden, 250 ml
Enzym-Mix:	im Set Pyro Gold Reagentien 40-0044, von Biotage, Uppsala, Schweden als Pulver zur Mischung mit 620 µl Wasser Single Stranded DNA-Binding Protein, Luciferase, DNA Polymerase, Apyrase, Sulfurylase
Substrat-Mix:	im Set Pyro Gold Reagentien 40-0044, von Biotage, Uppsala, Schweden als Pulver zur Mischung mit 620 µl Wasser Luciferin und Adenosin-5'-0-Phosphosulfat
Nukleotide:	im Set Pyro Gold Reagentien 40-0044, von Biotage, Uppsala, Schweden dATP α S, dTTP, dCTP, dGTP

PCR-Primer:

Die Primer sind mit destilliertem Wasser auf 10 pmol/μl verdünnt.

Primer H METP 66F: 5'-TTA GAT TAT TAG TTG TTT GTA TAG GGT GA-3'
(auf 10 pmol/μl verdünnt) von Gibco BRL Life Technologies,
76344 Eggenstein, Deutschland (108)

Primer H METP 66B: 5'-AAA AAC CAA ACA AAA AAT ATC CCC AAA CCC-3'
(auf 10 pmol/μl verdünnt) von Gibco BRL Life Technologies,
76344 Eggenstein, Deutschland (108)

Primer P66-Nested-US: 5'-TTT GTA TAG GGT AGG GGA GAG-3'
(auf 10 pmol/μl verdünnt) von Gibco BRL Life Technologies,
76344 Eggenstein, Deutschland (108)

Primer P66-Nested-DS: Biotin-5'-CAA CTC AAA CCC AAA CAA TT-3'
(auf 10 pmol/μl verdünnt) von Gibco BRL Life Technologies,
76344 Eggenstein, Deutschland (108)

Primer Methyl 1: 5'-TTT TTT GAG TTA GGT GTG GG-3'
(auf 10 pmol/μl verdünnt) von Gibco BRL Life Technologies,
76344 Eggenstein, Deutschland (46)

Primer Methyl 2: 5'-GGG ACA CCG CTG ATC GTT TAT CTC ACT AAA
AAA TAC CAA ACA A-3'
(auf 10 pmol/μl verdünnt) von Gibco BRL Life Technologies,
76344 Eggenstein, Deutschland (46)

Primer Met-Universal 3: Biotin-5'-GGG ACA CCG CTG ATC GTT TA-3'
(auf 10 pmol/μl verdünnt) von Gibco BRL Life Technologies,
76344 Eggenstein, Deutschland (46)

Primer für die Sequenzierung:

Seq.-primer 1 p66^{Shc}: 5'-TTG TTT TTT TTT TAG TTA GAG A-3'
(auf 10 pmol/μl verdünnt) von invitrogen Custom Primers,
76131 Karlsruhe, Deutschland (46)

Seq.-primer 2 p66^{Shc}: 5'-TTT TTG AGT TTG TGA GTT AGT A-3'
(auf 10 pmol/μl verdünnt) von invitrogen Custom Primers,
76131 Karlsruhe, Deutschland (46)

Seq.-primer 5 LINE-1: 5'-AGT TAG GTG TGG GAT ATA GT-3'
(auf 10 pmol/μl verdünnt) von invitrogen Custom Primers,
76131 Karlsruhe, Deutschland (46)

3.2 Verwendete Geräte

Photometer: BioPhotometer
von Eppendorf, 22331 Hamburg, Deutschland

Konzentrator: eppendorf Concentrator 5301
von Eppendorf, 22331 Hamburg, Deutschland

Waage: AB 204
von Mettler Toledo Inc., Columbus, Ohio, USA

Tischzentrifuge: EBA 12
von Hettrich Zentrifugen GmbH & Co. KG,
78532 Tuttlingen, Deutschland

Pipetten: Eppendorf Research
von Eppendorf, 22331 Hamburg, Deutschland

Heizblock: Thermomixer comfort oder 5436
von Eppendorf, 22331 Hamburg, Deutschland

Schüttler: Thermomixer comfort oder 5436
von Eppendorf, 22331 Hamburg, Deutschland

Wasserbad: julabo U3 von Julabo Labortechnologie GmbH,
77960 Seelbach, Deutschland

Vortex-Genie 2: von Scientific Industries, Bohemia, New York, USA

PCR-Gerät: RoboCycler Gradient 96
von Stratagene, La Jolla, Kalifornien, USA

Gelelektrophorese: Electrophoresis Power Supply EPS 500/400
von Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden
und Elektrophorese-Gelkammer von Biotec Fischer GmbH,
35447 Reiskirchen, Deutschland

Magnetheizplatte: IKA Combimag RCT
Magnetrührer mit elektronischer Heizautomatik
und Anschluss für Kontaktthermometer (= RCT)
von IKA Werke GmbH & Co. KG, 79219 Staufen, Deutschland

Vacuum Prep Workstation: PSQ 96 MA
von Biotage, Uppsala, Schweden

Pyrosequenzierer: PSQ 96 MA
von Biotage, Uppsala, Schweden

3.3 Weitere Materialien

Küvetten:	Uvette von Eppendorf, 22331 Hamburg, Deutschland
Sterilgefäße:	Mikroschraubröhre (steril) 2,0 ml von Sarstedt AG & Co., 51588 Nümbrecht, Deutschland
15 ml Gefäße:	Röhre 15 ml 120x17 mm PP REF 62.554.502 von Sarstedt AG & Co., 51588 Nümbrecht, Deutschland
25 ml Gefäße:	PS Tubes 25 ml Yellow Screw REF 60.9922.115 von Sarstedt AG & Co., 51588 Nümbrecht, Deutschland
1,5 ml Gefäße:	von Eppendorf, 22331 Hamburg, Deutschland
2 ml Bisulfit-Gefäße:	Safe-seal Reagiergefäße PP REF 72.695 von Sarstedt AG & Co., 51588 Nümbrecht, Deutschland
Parafilm:	Parafilm "M" Laboratory Film von Pechiney Plastic Packaging, Chicago, Illinois, USA
PCR-Gefäße:	PCR Tubes 0,2 ml, grün, Art. Nr. 710903 von Biozym Scientific GmbH, 31833 Hess. Oldenburg, Deutschland und PCR Tubes 0,2 ml, weiß, von Eppendorf, 22331 Hamburg, Deutschland
PSQ-Platte niedrig:	40-0010 von Biotage, Uppsala, Schweden
PSQ-Platte:	40-0002 von Biotage, Uppsala, Schweden

3.4 Verwendete DNA und weitere Daten zu den untersuchten Proben

Die vorliegenden Proben besitzen eine DNA-Konzentration von mindestens 19 µg/ml. In der DNA-Quantifizierung wurde eine Reinheit von höchstens 1,9 errechnet (siehe 3.5.1). Die Kontrollgruppe wurde im Bezug auf Alter und Geschlecht auf die Zusammensetzung in der KHK-Gruppe abgestimmt.

Die Studie umfasst 40 Patienten, die aus den 135 Patienten, die im Rahmen einer vorhergehenden Promotionsarbeit zur Hyperhomocysteinämie und weiteren kardiovaskulären Risikofaktoren untersucht wurden (33). Aus der Arbeit von Geisel et al. werden Daten für Geschlecht (männlich/weiblich), Alter (Jahre), Folsäure (ng/ml), Homocystein (µmol/l), Kreatinin (mg/dl), LDL-Cholesterin (mg/dl), HDL-Cholesterin (mg/dl), Gesamtcholesterin (mg/dl), C-reaktives Protein (mg/l), MTHFR-Genotyp an Position 677 (CC, CT oder TT), Vitamin B12 (pg/ml) und bei den KHK-Patienten zusätzlich die Anzahl der beteiligten Koronararterien (0, 1, 2 oder 3) und die Ejektionsfraktion (Prozent) übernommen (33).

Die 40 Personen zählende Kontrollgruppe setzt sich aus Mitarbeitern des Universitätsklinikums und freiwilligen Teilnehmern zusammen. Auch die Kontrollen wurden aus der 93 Personen umfassenden Kontrollgruppe der o. g. Promotionsarbeit ausgewählt. Das Probenmaterial wurde 3 Jahre lang lichtgeschützt bei einer Temperatur von 7°C in 1xTBE-Puffer gelagert.

Das Durchschnittsalter der KHK-Patienten liegt bei 66,48 Jahren, wobei das Durchschnittsalter der Frauen bei 70,83 Jahren und das der Männer bei 64,61 Jahren liegt. Für die Kontrollgruppe wurde anhand des vorhandenen Materials eine gleiche Altersverteilung angestrebt. Das Durchschnittsalter liegt hier bei 66,18 Jahren. Bei den weiblichen Kontrollen konnte ein Durchschnittsalter von 59,73 Jahren, bei den männlichen Kontrollen ein Durchschnittsalter von 68,62 Jahren errechnet werden.

Die erkennbare Abweichung zwischen weiblichen KHK-Patientinnen und weiblichen Kontrollen ergibt sich aufgrund der Tatsache, dass nur eine beschränkte Zahl an Kontrollen zur Verfügung steht und somit keine optimalen matched pairs hergestellt werden konnten.

Bei den KHK-Patienten handelt es sich um 12 Frauen und 28 Männer, die Kontrollgruppe besteht aus 11 weiblichen und 29 männlichen Kontrollen.

15 Patienten sind an einer 1-Gefäß-KHK, 11 Patienten an einer 2-Gefäß-KHK und 14 Patienten an einer 3-Gefäß-KHK erkrankt. Es wurde kein Patient mit einer beginnenden KHK in die Studie aufgenommen.

Um fehlende Strukturgleichheit zwischen den Gruppen auszuschließen, wurden Fälle und Kontrollen im Hinblick auf die Serumwerte für Homocystein, Folsäure, Vitamin B12, C-reaktives Protein (CRP), Kreatinin, HDL, LDL und Gesamtcholesterin verglichen.

Bei jeder Analyse wird eine Negativkontrolle ohne DNA und eine Präzisionskontrolle mitgeführt, die vergleichbare Werte garantieren soll (siehe 4.1 Homogenität der Stichproben).

3.5 Methoden

3.5.1 DNA-Quantifizierung

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration werden jeweils 70 µl der bereits isolierten DNA in Küvetten gemessen. Die Extinktion bei 260 nm gibt den DNA-Gehalt der Probe an. Die Reinheit der Probe wird durch den Quotienten angegeben, der sich aus der Extinktion bei 260 nm durch die Extinktion bei 280 nm errechnet. Dieser Quotient sollte im optimalen Fall einen Wert von 1,5 bis 1,9 aufweisen. Dies konnte beim vorliegenden Material in der Regel erfüllt werden, der Höchstwert beträgt 1,86, der kleinste Wert liegt bei 1,47 und der Mittelwert aller Proben errechnet sich mit 1,72.

Bei den Anforderungen an die Konzentration der DNA wurde eine Grenze ≥ 19 µg/ml gesetzt. Der Mittelwert der DNA-Konzentrationen liegt bei 35,85 µg/ml (Minimum: 19 µg/ml; Maximum: 72 µg/ml). Alle hier vorgegebenen Grenzwerte konnten eingehalten werden.

3.5.2 Aufkonzentrierung

Nach der Quantifizierung der DNA-Konzentration wird dasjenige Volumen in Sterilgefäße abgefüllt, das 0,75 µg DNA enthält. Dazu wird die im Kühlschrank bei 7°C aufbewahrte Probe bei 14000 Umdrehungen pro Minute eine Minute lang zentrifugiert und das entsprechende Volumen entnommen. Die befüllten Sterilgefäße werden geöffnet und im vorher mit Alkohol gereinigten Konzentrator für ca. 40 Minuten bei 60°C vom Wasser befreit. Während des Eindampfvorgangs werden die Proben ständig zentrifugiert. Nach den o.g. 40 Minuten bleibt die aufkonzentrierte DNA zurück.

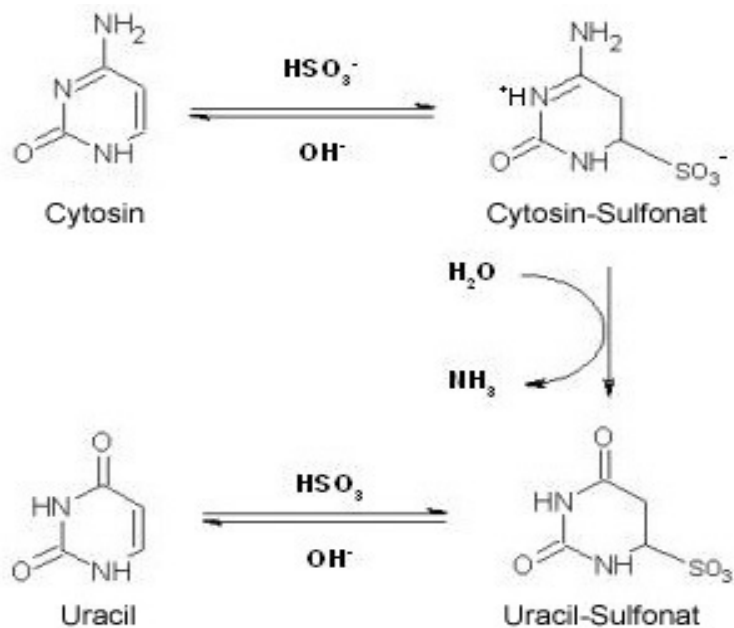
3.5.3 Schneiden der DNA mit Restriktionsenzymen

Zum Schneiden mit Restriktionsenzymen wird 0,75 µg vorher ankonzentrierte DNA mit 18,4 µl Wasser, 2,1 µl EcoR1 Puffer von Fermentas und 0,5 µl EcoR1 Schnitteinzym von Fermentas (10 units/µl) bei 37°C für mindestens 16 Stunden in Heizblock inkubiert. Der genannte EcoR1 Puffer wird vor der Zugabe auf 37°C vorerwärmt.

Zur Materialeinsparung wird EcoR1 Puffer in den Deckel und das EcoR1 Schnitteinzym an die Wand des Sterilgefäßes pipettiert. Danach wird das Gemisch in der Tischzentrifuge kurz zentrifugiert und die Inkubation gestartet. EcoR1 erkennt die Sequenz 5'-GAATTC-3' und spaltet die Phosphorsäurediester-Bindungen beider Stränge zwischen G und A. Die für die optimale Wirkung von EcoR1 notwendige Temperatur von 37°C wird für mindestens 16, höchstens aber 20 Stunden, beibehalten.

3.5.4 Bisulfit-Modifikation

Die Bisulfit-Modifikation erhielt ihren Namen durch Natriumhydrogensulfit, das im festen Zustand als Natriummetahydrogendisulfit ($\text{Na}_2\text{O}_5\text{S}_2$) vorliegt. In Wasser hydratisiert es zu NaHSO_3 . In verschiedenen Studien (41, 95) wird 1970 die durch Natriumhydrogensulfit katalysierte Desaminierung von Cytosin beschrieben. Im selben Jahr erfolgen auch Publikationen über die mutagenen Eigenschaften von Natriumhydrogensulfit („Bisulfit“), das die Umwandlung von Desoxycytidin zu Desoxyuridin in einzelsträngiger DNA hervorruft (41). Diese Reaktion vollzieht sich in drei Schritten. Zu Beginn addiert sich das in leicht saurer Lösung (pH 5) größtenteils als HSO_3^- -Ion vorliegende Bisulfit an die Position 6 des Pyrimidinrings, wobei 5,6-Dihydrodesoxycytidin-6-sulphonat entsteht. Im zweiten Schritt desaminiert dieses unter Beteiligung von SO_3^{2-} zu 5,6-Dihydrodesoxyuridin-6-sulphonat (94). Der dritte Schritt besteht in einer Elimination des Bisulfits mittels Alkalibehandlung, wodurch Desoxyuridin entsteht (41). Im Endeffekt wird durch die Bisulfit-Modifikation das normalerweise nicht in der DNA vorkommende Desoxyuridin aus Desoxycytidin erzeugt. Die folgende Polymerasekettenreaktion (PCR) komplementiert das Desoxyuridin dann mit Desoxyadenosin, wodurch sich letztendlich als Endergebnis der Modifikation die Umwandlung von Desoxycytidin in Desoxythymidin ergibt (siehe Abb. 3.1).



1. Addition des Bisulfitions an das Kohlenstoffatom C-6 des Cytosinrings.
2. Cytosin-Sulfonat wird durch hydrolytische Desaminierung in Uracil-Sulfonat umgewandelt.
3. Uracil-Sulfonat wird im alkalischen Schritt zu Uracil desulfoniert.

Abb. 3.1: Schematische Darstellung der Bisulfitbehandlung von DNA, leicht verändert (41)

Die oben beschriebene Umwandlung in Desoxythymidin erfolgt nur für nicht-methyliertes Desoxycytidin, das eine Methylgruppe tragende 5-Methyl-Desoxycytidin reagiert nicht mit Bisulfit (31, 41). 5-Methyl-Desoxycytidin liegt nach der PCR als Desoxycytidin vor. Dieser Unterschied lässt auf die Zusammensetzung der DNA im Hinblick auf den Methylierungszustand schließen. Es kann zwischen methylierten und nicht-methylierten Desoxycytidin in der Ursprungs-DNA unterschieden und eine Quantifizierung vorgenommen werden. Das Auftreten von Desoxycytidin im Gegenstrang weist auf das Vorhandensein von 5-Methyl-Desoxycytidin in der Ursprungs-DNA hin, während Desoxythymidin für ein nicht-methyliertes Desoxycytidin in der ursprünglichen DNA steht (siehe Abb. 3.2).

Die Erläuterung der PCR erfolgt in 3.5.5, die Darstellung der nachfolgenden Sequenzierung in 3.5.7. Nach dem Schneiden der DNA mit EcoR1 wird die DNA zentrifugiert und fünf Minuten lang bei 95°C im Heizblock denaturiert, danach wird sie nochmals zentrifugiert und dann auf Eis gekühlt (28, 35).

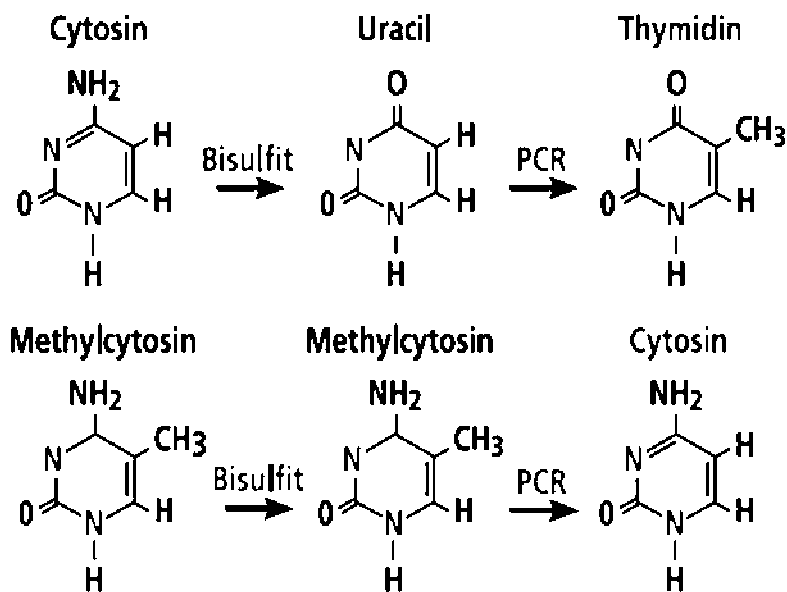


Abb. 3.2: Bisulfit-Modifikation eines methylierten und eines nicht-methylierten CpG

Die Bisulfit-Reagenzien Natriummetahydrogendisulfit ($\text{Na}_2\text{O}_5\text{S}_2$) und Hydrochinon ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$) werden gelöst, wobei für jeweils 4 DNA-Proben zu 1,9 g Natriummetahydrogendisulfit 2,5 ml Wasser und 720 μl 2 M NaOH und zu 55 mg Hydrochinon 500 μl Wasser gegeben werden. Die beiden Stoffe werden bei 50°C 30-40 Minuten unter Schütteln vollständig gelöst. Diese Arbeit erfolgt aufgrund der Lichtempfindlichkeit beider im Dunkeln.

Nachdem die Substanzen vollständig gelöst sind wird die Hydrochinon-Lösung in das Gefäß mit der Bisulfit-Lösung überführt und darauf folgend zu je 1 ml in 2 ml-Gefäße aliquotiert und lichtgeschützt auf Eis gekühlt. Derweil wird 2%ige GTG-Agarose im Schüttler bei 95°C erhitzt und dann bei 50°C gewärmt.

Die DNA wird danach erneut für fünf Minuten bei 95°C im Heizblock erhitzt, zentrifugiert, auf Eis gekühlt und ein weiteres Mal zentrifugiert, bis dann 4 μl 2 M NaOH zur DNA zugegeben werden und sie 15 Minuten bei 50°C inkubiert wird.

Nach Ablauf der 15 Minuten werden 50 μl GTG-Agarose zur DNA pipettiert und anschließend Beats zu 12 μl auf eisgekühltem Parafilm geformt. Die Beats werden zur Bisulfit/Hydrochinon-Lösung zugegeben und 30 Minuten ohne Lichteinstrahlung auf Eis gekühlt. Im Anschluss daran werden die sich in der Lösung befindlichen Beats für dreieinhalb Stunden bei 50°C im Heizblock lichtgeschützt erwärmt.

Danach erfolgen nach einem kurzen Zentrifugieren die Waschschrte mit viermal 15 Minuten in 1 ml 1xTBE-Puffer (pH 8,0), zweimal für 15 Minuten in 500 μl 0,2 M NaOH und nochmals für dreimal 10 Minuten in 1 ml 1xTBE-Puffer (pH 8,0). Nach dem Entfernen des

1xTBE-Puffers werden die nunmehr freiliegenden Beats für fünf Minuten bei 95°C aufgeheizt und geschmolzen, sodass eine Verwendung für die PCR möglich ist.

3.5.5 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) liefert die Möglichkeit einzelne DNA-Sequenzen aus einem komplexen Gemisch direkt zu vermehren. Die beiden spezifischen Primer-Moleküle werden in großem Überschuss zu dem vorliegenden Gemisch, welches den zu amplifizierenden Abschnitt beinhaltet gegeben.

Ebenfalls im Überschuss werden Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTP-Moleküle), also dATP, dGTP, dCTP und dTTP zugegeben. Dies gilt auch für die ebenfalls in den Ansatz beigefügte hitzestabile Taq-Polymerase. Diese wurde ursprünglich aus einem in heißen Quellen vorkommenden Bakterium gewonnen, beispielsweise aus *Thermus aquaticus*.

Zu Beginn des ersten Zyklus wird die noch doppelsträngige DNA bei hohen Temperaturen aufgeschmolzen, so dass dann auf einer niedrigeren Temperatur die Primer angelagert werden können. Die Taq-Polymerase führt dann die Verlängerung der Primersequenzen durch, wobei hier die dNTP-Moleküle beginnend am 3'-Ende des Primers polymerisiert werden. Das 5'-Ende der nun entstandenen neusynthetisierten DNA-Stränge entspricht dem 5'-Ende des Primers, das 3'-Ende ist unbekannt, da die Polymerisation hier nicht durch einen Endpunkt limitiert wurde, sondern nur durch die zeitliche Beschränkung beendet wurde.

Nach dem zweiten Zyklus, der mit dem Aufschmelzen, der Stränge beginnt und wiederum Primeranlagerung und Polymerisation umfasst, liegen praktisch nur noch die DNA-Bereiche vor, die es zu amplifizieren galt. Bei den weiteren Zyklen kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung. Die jeweiligen Einstellungen für die PCR, je nach zu amplifizierendem Genabschnitt, werden im Folgenden aufgeführt. Zur weiteren Vermehrung der Sequenz wird hier eine weitere, sog. nested PCR, angeschlossen (62). Eine weitere Funktion der nested PCR ist die Bildung von biotinilierten DNA-Abschnitten, die durch die Verwendung biotinilierter Primer erfolgt. Dies ist für die spätere Herstellung von einzelsträngigen DNA-Vorlagen notwendig, die für die Pyrosequenzierung benötigt werden.

Die Benutzung eines unüblich großen Ansatzvolumens von 80 µl ist auch durch die Anforderungen der Pyrosequenzierung bedingt, da pro Sequenzierung ein Volumen von 30 µl nested-PCR-Produkt verwendet werden muss.

3.5.5.1 PCR des p66^{Shc}-Gens

A. 1.PCR (108)

Primer H METP 66F: 5'-TTA GAT TAT TAG TTG TTT GTA TAG GGT GA-3'

(auf 10 pmol/ μ l verdünnt)

Primer H METP 66B: 5'-AAA AAC CAA ACA AAA AAT ATC CCC AAA CCC-3'

(auf 10 pmol/ μ l verdünnt)

25 μ l Ansatz:	PCR-Reaktionspuffer (10x konz.+MgCl ₂)	2,5 μ l
	dNTP-Mix (2,5 mM)	2,5 μ l
	Primer 66F (10 pmol/ μ l)	1,25 μ l
	Primer 66B (10 pmol/ μ l)	1,25 μ l
	Wasser, steril	15,0 μ l
	Taq DNA Polymerase (1 U/ μ l)	0,5 μ l
	DNA-Gemisch (nach Bisulfit-Modifikation)	2,0 μ l

Zyklus 1	96°C – 2 min	Aufschmelzung der Stränge
	54°C – 1 min	Primeranlagerung
	72°C – 1 min	Polymerisation
	18°C - 0 min	Abkühlen
Zyklus 2-34	96°C – 1 min	
	54°C – 1 min	
	72°C – 1 min	
Zyklus 35	96°C – 1 min	
	54°C – 1 min	
	72°C – 7 min	
	6°C – 0 min	

B. Nested PCR (108)

Primer P66-Nested-US: 5'-TTT GTA TAG GGT AGG GGA GAG-3'

(auf 10 pmol/μl verdünnt)

Primer P66-Nested-DS: Biotin-5'-CAA CTC AAA CCC AAA CAA TT-3'

(auf 10 pmol/μl verdünnt)

80 μl Ansatz:	PCR-Reaktionspuffer (10x konz.+MgCl ₂)	8,0 μl
	dNTP-Mix (2,5 mM)	8,0 μl
	Glycerin (KIKI)	0,72 μl
	Primer US (10 pmol/μl)	3,2 μl
	Primer DS (10 pmol/μl)	3,2 μl
	Wasser, steril	51,81 μl
	Taq DNA Polymerase (1 U/μl)	2,4 μl
	DNA-Gemisch (nach 1. PCR)	2,67 μl

Zyklus 1	96°C – 2 min	Aufschmelzung der Stränge
	54°C – 1 min	Primeranlagerung
	72°C – 1 min	Polymerisation
	18°C - 0 min	Abkühlen

Zyklus 2-34	96°C – 1 min
	54°C – 1 min
	72°C – 1 min

Zyklus 35	96°C – 1 min
	54°C – 1 min
	72°C – 7 min
	6°C – 0 min

3.5.5.2 PCR der LINE-1-DNA-Abschnitte

A. 1.PCR (46)

Primer Methyl 1: 5'-TTT TTT GAG TTA GGT GTG GG-3'

(auf 10 pmol/ μ l verdünnt)

Primer Methyl 2: 5'-GGG ACA CCG CTG ATC GTT TAT CTC ACT AAA AAA

TAC CAA ACA A-3'

(auf 10 pmol/ μ l verdünnt)

25 μ l Ansatz:	PCR-Reaktionspuffer (10x konz.+MgCl ₂)	2,5 μ l
	dNTP-Mix (2,5 mM)	2,5 μ l
	Primer 1 (10 pmol/ μ l)	0,5 μ l
	Primer 2 (10 pmol/ μ l)	0,5 μ l
	Wasser, steril	17,25 μ l
	Taq DNA Polymerase (1 U/ μ l)	0,5 μ l
	DNA-Gemisch (nach Bisulfit-Modifikation)	1,25 μ l

Zyklus 1-36	96°C – 2 min	Aufschmelzung der Stränge
	50°C – 45 sec	Primeranlagerung
	72°C – 30 sec	Polymerisation
Zyklus 37	72°C – 10 min	
	6°C – 0 min	Abkühlen

B. Nested PCR (46)

Primer Methyl 1: 5'-TTT TTT GAG TTA GGT GTG GG-3'

(auf 10 pmol/μl verdünnt)

Primer Met-Universal 3: Biotin-5'-GGG ACA CCG CTG ATC GTT TA-3'

(auf 10 pmol/μl verdünnt)

70 μl Ansatz:	PCR-Reaktionspuffer (10x konz.+MgCl ₂)	7,0 μl
	dNTP-Mix (2,5 mM)	7,0 μl
	MgCl ₂	1,4 μl
	Primer 1 (10 pmol/μl)	2,8 μl
	Primer 3 (10 pmol/μl)	2,8 μl
	Wasser, steril	45,5 μl
	Taq DNA Polymerase (1 U/μl)	1,4 μl
	DNA-Gemisch (nach 1. PCR)	2,1 μl

Zyklus 1-36	96°C – 2 min	Aufschmelzung der Stränge
	50°C – 45 sec	Primeranlagerung
	72°C – 30 sec	Polymerisation
Zyklus 37	72°C – 10 min	
	6°C – 0 min	Abkühlen

3.5.6 Gelelektrophorese zur Kontrolle der PCR-Effizienz

Das für die Elektrophorese benötigte zweiprozentige Gel wird aus 2 g Universal-Agarose und 100 ml 1xTBE-Puffer hergestellt. Die in einem Erlenmeyerkolben gemischten Bestandteile werden mit einem Magnetrührstäbchen auf der Magnetheizplatte unter Rühren aufgekocht. Sobald das Gel kocht und ein klares Aussehen besitzt, wird der Erlenmeyerkolben von der Magnetheizplatte genommen und in einem wassergefüllten Becherglas auf 60°C abgekühlt. Das Magnetrührstäbchen wird mit einem Magnetrührstäbchenentferner herausgenommen, danach 12 µl einprozentige Ethidiumbromidlösung zugefügt und durch Schwenken gemischt. Das Gel wird nun in die bereits zusammengebaute Kammer gegossen, entstehende Luftblasen mit einer Kanüle entfernt und so für ca. 20 Minuten unter einem Abzug abgekühlt. Nachdem das Gel fest geworden ist werden die Kammerwände entfernt und das fertige Gel in die mit 1xTBE-Puffer gefüllte Gelelektrophoresekammer überführt.

Es werden dann 12 µl des aus 2,5 µl Stop-Mix und 10 µl PCR-Produkt bestehenden Gemischs in die im Gel befindlichen Geltaschen (sog. „Slots“) pipettiert.

Auf der äußersten Position (Abb. 3.3: ganz rechts) des Gels werden 12 µl 1-KB-Längenmarker eingefüllt um die Beurteilung zu ermöglichen. Die Position der anderen Proben wird schriftlich festgehalten. Anhand eines Vergleiches mit dem Marker kann die Länge der zu messenden Probe ermittelt oder verglichen werden. Nun wird 125 V Spannung bei einer Stromstärke im Milliampèrebereich angelegt und die DNA-Stränge trennen sich im elektrischen Feld auf. Nach maximal 30 Minuten wird die Elektrophorese beendet. Zur Dokumentation wird das Gel nun in der Dunkelkammer durch einen UV-Transilluminator durchleuchtet und abfotografiert. Ein Beispiel zeigt Abb. 3.3.

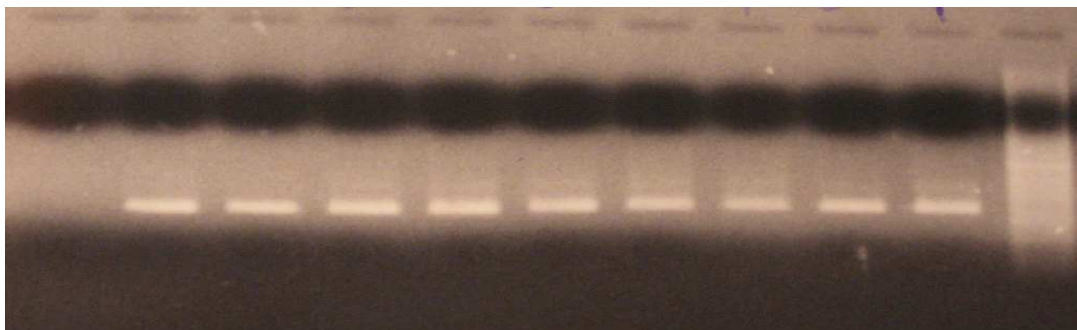


Abb. 3.3: PCR-Kontrolle im Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel

3.5.7 Pyrosequenzierung

Für die Durchführung der Pyrosequenzierung müssen die doppelsträngigen PCR-Produkte in eine einzelsträngige DNA-Vorlage, ein sogenanntes DNA-Template, umgewandelt werden. Ein Einzelstrang ist notwendig, weil nur an einen Einzelstrang Sequenzierprimer binden können. Die einfachste und zugleich robusteste Methode wird von Rhonagi et al. beschrieben (89). Das PCR-Produkt, das einen 5'-biotinilierten Strang besitzt, wird an Streptavidin-beschichteten Sepharose-Beats gebunden. Der nicht-biotinilierte Strang wird durch Behandlung mit NaOH abgelöst und vom am Streptavidin gebundenen Strang getrennt. Durch einen Waschvorgang wird der pH-Wert wieder neutral. Dann werden die Beats mit gebundenem Einzelstrang in eine Pufferlösung transferiert, in der nun der Sequenzierprimer an den Einzelstrang gebunden wird. Diese Anlagerung vollzieht sich unter Erhitzen auf 70°C und anschließendes Abkühlen auf Zimmertemperatur (89). Das zugrunde liegende Prinzip der real-time-Sequenzierung beinhaltet wie bereits oben erläutert, die Hybridisierung des Sequenzierprimers mit dem einzelsträngigen DNA-Template und weiterhin noch der Inkubation mit den Enzymen DNA-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luziferase und Apyrase, sowie den Substraten Adenosin-5'-Phosphosulfat (APS) und Luziferin (114). Da das Reaktionsgemisch noch keine Nukleotide enthält, bildet sich der DNA-Protein-Komplex aus, allerdings kommt es noch nicht zu einer Elongation. Entsprechend der bekannten DNA-Sequenz wird die Pipettierreihenfolge programmiert. Das erste der vier Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP) wird zum Reaktionsansatz pipettiert.

Die Bezeichnung dNTP dient der vereinfachten Erklärung des Reaktionsablaufes. Es werden Desoxycytosintriphosphat, Desoxythymidintriphosphat und Desoxyguanosintriphosphat verwendet. An der Stelle von Desoxyadenosintriphosphat wird Desoxyadenosin- α -Thio-5'-Triphosphat (dATP α S) benutzt, da dieses Nukleotid-Analogon von der DNA-Polymerase eingebaut, aber nicht von der Luziferase benutzt werden kann.

Durch die Verwendung von dATP α S statt dATP wird sichergestellt, dass die Luziferase nur diejenigen ATP umsetzt, die in der Sulfurylase-katalysierten Reaktion entstanden sind. Bei dieser Reaktion findet auch die Umwandlung von Luziferin zu Oxoluziferin statt. Dies ermöglicht, dass nur die aus der Sulfurylase-katalysierten Reaktion entstehenden ATP zur Quantifizierung beitragen und es nicht zu Überlagerungseffekten kommt.

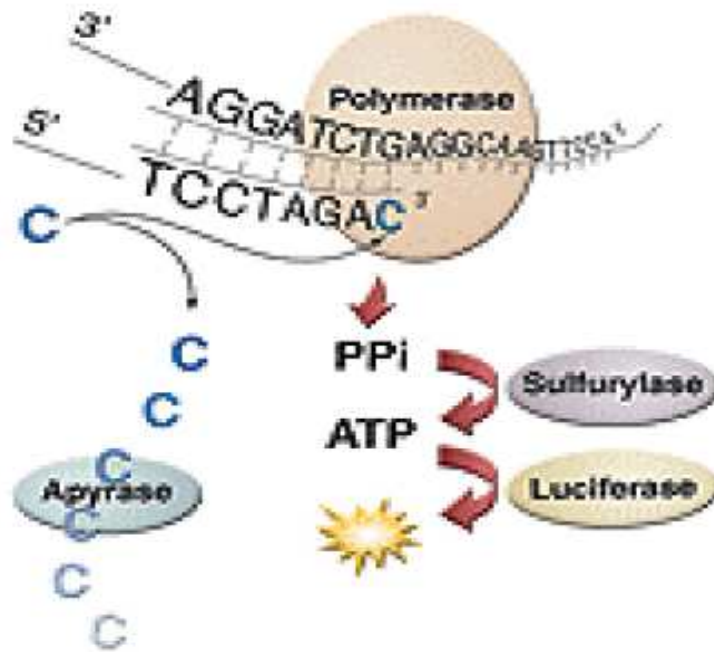
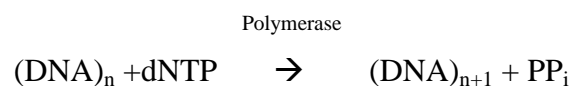
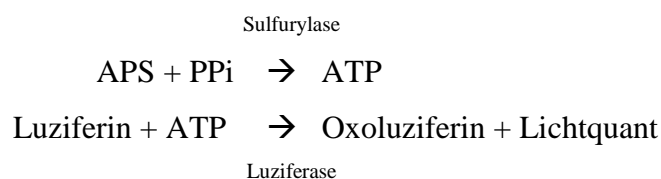


Abb. 3.4: Pyrosequenzierung (Quelle: Biotage)

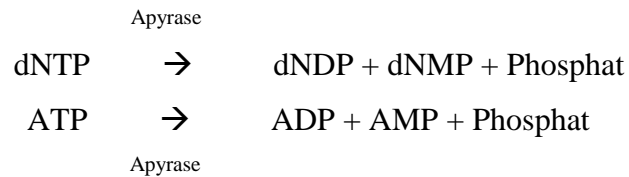
Wie Abb. 3.4 schematisch zeigt, katalysiert die DNA-Polymerase den Einbau des dNTPs, wenn es komplementär zu der Base auf dem DNA-Template ist. Da bei jedem Einbau Pyrophosphat (PPi) freigesetzt wird, ist die Menge an PPi direkt proportional zu der Menge an eingebauten dNTPs. Ist die Menge von PPi doppelt so hoch wie bei einem einfachen Ausschlag kann man davon ausgehen, dass im DNA-Template zwei zum gerade aktuell zugesetzten dNTP komplementäre Basen direkt aufeinander folgen.



Die ATP-Sulfurylase katalysiert jetzt in Gegenwart des APS die quantitative Umwandlung des Pyrophosphates zu Adenosin-5'-Triphosphat (ATP). Dieses ATP ist wiederum für die enzymatische Umwandlung von Luziferin zu Oxoluziferin durch das Enzym Luziferase notwendig. Bei der Reaktion von Luziferin zu Oxoluziferin wird ein Lichtquant im sichtbaren Bereich des Lichts freigesetzt, welches mit einer Kamera registriert werden kann.



Die Menge der gemessenen Lichtquanten ist direkt proportional zur Menge der umgesetzten ATP und da deren Zahl wiederum direkt proportional zur Menge von Pyrophosphat und damit auch zur Zahl der eingebauten dNTP ist, kann man die Anzahl der eingebauten Nukleotide auf diesem indirekten Weg bestimmen. Die nicht eingebauten dNTP und die überschüssigen ATP werden durch die Apyrase kontinuierlich degradiert. Ist diese abgeschlossen, kann das nächste der vier dNTP zugesetzt werden.



Nachdem nun alle dNTP einzeln und in der entsprechenden Reihenfolge zu dem Reaktionsgemisch gegeben wurden, erhält man ein sogenanntes Pyrogramm (pyrogramTM).

Die praktische Durchführung der Pyrosequenzierung ist für die Bestimmung der CpG-Methylierung in p66^{Shc} und für LINE-1 identisch. Es werden die Reagenzien von Biotage, Uppsala, Schweden benutzt, die für die quantitative Analyse der CpG-Methylierung erhältlich sind. Die Enzymmischung, die Substratmischung und die Nukleotide werden in die Kartusche des Sequenziergerätes gefüllt. Die notwendige Menge kann vor dem Versuchslauf durch die Software des Pyrosequenzierers berechnet werden.

Für eine Reaktion werden 37 µl Bindungspuffer, 3 µl Sepharosebeads und 10 µl destilliertes Wasser benötigt. Je nach Anzahl zu untersuchender Proben wird ein entsprechender Ansatz hergestellt. Dieser Ansatz wird auf die Kammern einer Reaktionsplatte (PCR-Platte) verteilt und je 30 µl nested-PCR-Produkt hinzugefügt. Die Platte wird mit einer Klebefolie verschlossen und bei Raumtemperatur und 1400 rpm für 5 Minuten geschüttelt.

In der Zwischenzeit erfolgt die Verteilung der Sequenzierprimer zu je 40 µl auf die Kammern einer weiteren Reaktionsplatte (PSQ-Platte). Für die Analyse der CpG-Methylierung in p66^{Shc} wird hier der Sequenzierprimer S1 für die +16- und +23-Position und Sequenzierprimer S2 für die -78-Position verwendet. Um die CpG-Methylierung in LINE-1 zu bestimmen, wird der Sequenzierprimer S5 benutzt (Basensequenz siehe 3.1 Primer für die Sequenzierung). Ist das fünfminütige Schütteln abgeschlossen, werden beide Platten in der Vacuum Prep Workstation platziert (s. Abb. 3.5).



Abb. 3.5: Vacuum Prep Workstation (Quelle: Biotage)

Das sich an die Sepharose gebundene nested-PCR-Produkt wird mittels einer Vakuumpumpe aufgesaugt. Die beladenen Sepharosebeats bleiben in einer kleinporigen Membran des Gerätes hängen und werden dort im ersten Schritt 2 - 3 Sekunden mit Ethanol behandelt, danach folgt die Denaturierung mit NaOH für weitere 2 – 3 Sekunden und dann eine Waschphase mit Waschpuffer, die 5 - 6 Sekunden dauert. Die Vakuumpumpe wird abgestellt und die beladenen Beats durch kräftiges Schütteln in die PSQ-Platte befördert, in der sich die Sequenzierprimer anlagern können. Die folgende Reinigung des Vakuumpumpkopfes mit dem vorhandenen Wasser wird in Schale 4 durchgeführt.

Die PSQ-Platte wird dann für 3 Minuten auf 70°C erwärmt und danach für 3 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt. Nach Ablauf dieser Zeit wird die PSQ-Platte im Sequenziergerät eingesetzt und die Analyse gestartet.

3.5.7.1 Methylierung p66^{Shc}

Die zu analysierenden Sequenzen sind hier:

- für die Positionen +16 und +23:

5'-AGA GGT TTT AC/T(+16)G TTG GGC/T(+23) GGG GAT-3'

- für die Position -78:

5'-TTG TTT TTA C/T(-78)GA TT-3'

Für die quantitative Auswertung sind die Desoxycytidine und Desoxythymidine an Stelle -78, +16 und +23 der Basensequenz von p66^{Shc} relevant. Die Positionen +16 und +23 werden über den Sequenzierprimer S1, die Position -78 über den Sequenzierprimer S2 analysiert. Die CpG-Methylierung wird durch die Ermittlung der prozentualen Anteile von Desoxycytidin an allen drei Positionen und die darauffolgende Bildung des Mittelwertes bestimmt.

3.5.7.2 Methylierung LINE-1

Die zu analysierende Sequenz lautet hier:

5'-TTC/T(+329) GTG GTG C/T(+322)GT C/T(+319)GT TTT TTA AGT
C/T(+307)GG TTT GAA AAG-3'

Hier sind die prozentualen Anteile der Desoxycytidine im Vergleich mit Desoxythymidin an den Stellen +329, +322, +319 und +307 relevant.

Die Höhe der Peaks wird in eine Exceldatei umgewandelt und der Mittelwert berechnet. Im Gegensatz zur Berechnung für p66^{Shc} muss bei LINE-1 die Basenabfolge beachtet werden. Da sich unmittelbar vor den ausgewerteten Positionen ebenfalls Desoxythymidine befinden, muss dies in der Berechnung berücksichtigt werden, indem die Summe durch die Anzahl der voranstehenden Desoxythymidine +1 geteilt wird. Die weitere Berechnung erfolgt dann für p66^{Shc} und LINE-1 analog. Der Mittelwert der Desoxycytidin-Peakhöhe entspricht der Anzahl

methylierter Desoxycytidine und kann als Maß für die CpG-Methylierung in p66^{Shc}, bzw. LINE-1 angenommen werden. In Abb. 3.6 wird zur Veranschaulichung eine Quantifizierung der prozentualen Anteile von Desoxycytidin in der p66^{Shc}-Promotorregion durchgeführt.

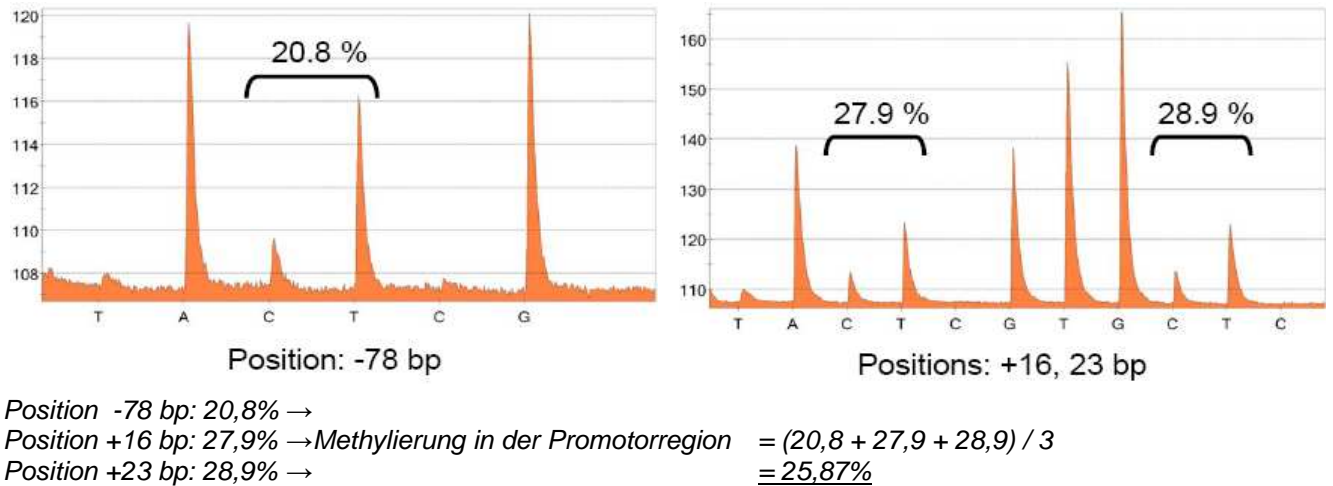


Abb. 3.6: Quantifizierung der prozentualen Anteile von Desoxycytidin am Beispiel p66^{Shc}

3.5.8 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten erfolgt computerunterstützt mit dem Programm SPSS 14.0 (Release 14.0.0) von LEADTOOLS LEAD Technologies (Lizenz 9836115). Die Ergebnisse werden anhand eines T-Tests für unverbundene Stichproben, bzw. beim Vergleich mehrerer Stichproben mittels einer ANOVA (Analysis of Variation) ausgewertet. Die Voraussetzung für die Durchführung dieser beiden Tests, Normalverteilung und Gleichheit der Varianzen werden durch den Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest und durch den Levene-Test auf Varianzgleichheit gesichert. Bei nicht vorliegender Normalverteilung einer Variablen erfolgt die Logarithmierung der betreffenden Werte zur Basis e. Die Feststellung von Korrelationen zwischen den Variablen und der Methylierung wird zusätzlich über eine rückwärtsgerichtete Regressionsanalyse getroffen. Weitere Korrelationen der Werte untereinander werden mittels einer Spearman-Rho-Analyse bestimmt. Zur Bestätigung der Strukturgleichheit der Gruppen werden die vorbekannten Serumwerte in einer Tabelle gegenübergestellt und die Merkmalsverteilung auf gleiche Voraussetzungen für beide Stichproben untersucht. Alle Auswertungen legen ein Signifikanzniveau von 0,05 zugrunde, als hochsignifikant gelten Korrelationen mit einem Signifikanzniveau von 0,01.

4. Ergebnisse

4.1 Homogenität der Stichproben

In der vorliegenden Arbeit wurden 40 Patienten mit klinisch nachgewiesener Koronarer Herzerkrankung (KHK) und 40 Kontrollen auf das Vorliegen von Unterschieden hinsichtlich der Methylierung in den Promotorabschnitten von p66^{Shc} und, als Marker für die Methylierung des Gesamtgenoms, LINE-1 untersucht.

Die Prüfung der Hypothesen setzt den statistischen Vergleich zwischen den Gruppen voraus. Nach der Prüfung auf Einhaltung von Ein- und Ausschlusskriterien wird nun die Ausprägung weiterer Einflussfaktoren gegenübergestellt, um die Strukturgleichheit beider Stichproben nachzuweisen. Für die Altersverteilung zeigt sich, genauso wie für die Geschlechterverteilung, kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

	Kontrollgruppe	KHK-Patienten	Gesamt
männlich	29	28	57
weiblich	11	12	23
Gesamt	40	40	80

Tab. 4.1: Geschlechterverteilung in der KHK- und Kontrollgruppe

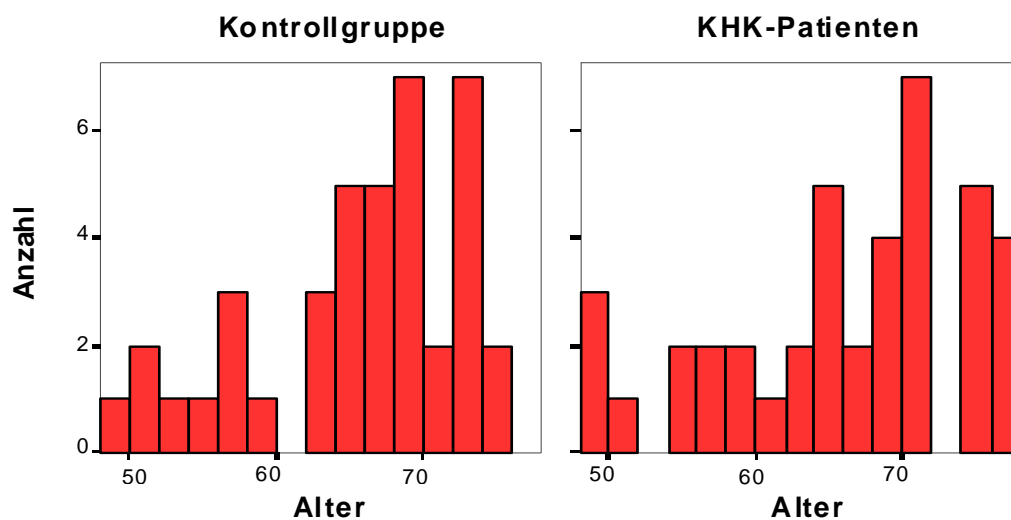


Abb. 4.1: Altersverteilung in der KHK- und Kontrollgruppe

Den Median der Serumwerte für Folsäure, Vitamin B12, C-reaktives Protein (CRP), Kreatinin, LDL, HDL und Gesamtcholesterin zeigt Tabelle 4.2. Im Vergleich zwischen KHK-

Patienten und Kontrollgruppe sind keine signifikanten Unterschiede vorhanden. Dies gilt auch für die Verteilung der MTHFR-Genotypen.

Für die Gruppe der KHK-Patienten konnten im Vergleich mit der Kontrollgruppe signifikant höhere Homocysteinwerte ermittelt werden. Diese Erkenntnis konnte bereits in der vorhergehenden Arbeit gewonnen werden, aus der Patienten und Kontrollen konvertiert wurden. Gerade im Hinblick auf die mögliche Auswirkung des Homocysteins auf die DNA-Methylierung ist dieser Unterschied interessant und wird in Abschnitt 4.3.6 untersucht. Innerhalb der Gruppe der KHK-Patienten wurden die Ejektionsfraktion und der KHK-Grad in die Betrachtung einbezogen, wobei der KHK-Grad die angiographisch gesicherte Diagnose hinsichtlich der Zahl der betroffenen Koronararterien beschreibt.

(Labor-)parameter	Einheit	Median (5.Perzentile; 95.Perzentile)	
		Kontrollgruppe	KHK-Patienten
Folsäure	ng/ml	7,7 (3,36; 22,5)	7,55 (3,73; 14,66)
Homocystein	µmol/l	11,4 (6,94; 20,43)	15,42* (5,26; 41,2)
Kreatinin	mg/dl	0,95 (0,6; 1,49)	0,845 (0,6; 2,26)
HDL-Cholesterin	mg/dl	46,5 (30; 85)	41,5 (24,15; 64)
LDL-Cholesterin	mg/dl	150,5 (97,15; 228,15)	140 (82,2; 246,5)
Gesamtcholesterin	mg/dl	236 (166; 290,9)	209 (127,75; 325,1)
Vitamin B12	pg/ml	368,5 (229,8; 738,15)	385,5 (204,5; 982,15)
C-reaktives Protein	mg/l	4,65 (0,12; 12,38)	6,6 (0,015; 109,26)
Alter	Jahre	67,5 (52; 74,95)	68 (50; 77,95)

Tab. 4.2: In die Untersuchung einbezogene Laborparameter und Alter in der KHK-Patienten-Gruppe und der Kontrollgruppe. *Signifikanz auf 5%-Niveau

Die Beobachtungsgleichheit wird durch die maschinelle Auswertung im Pyrosequenziergerät und durch exakte Gleichbehandlung der Proben durch Beachtung einer konstant bleibenden Arbeitsvorschrift gesichert. Die Arbeitsvorschrift wurde im Rahmen der Studie formuliert.

Für die Sicherstellung einer ausreichenden Präzision wurde bei jedem Probenlauf eine Präzisionskontrolle mitgeführt. Aufgrund des hohen Bedarfs an Material erfolgten im Laufe der Studie Wechsel auf andere Präzisionskontrollen. Durch die geringen Streuungen der Werte kann von ausreichender Präzision ausgegangen werden. Zur Verminderung zufälliger Fehler wurden die ermittelten Ergebnisse für die Methylierung mit einem Wichtungsfaktor multipliziert. Dieser Wichtungsfaktor errechnet sich aus der Division der Werte für die mit dem jeweiligen Lauf mitgeführte Präzisionskontrolle durch den Mittelwert für alle Werte

dieser Präzisionskontrolle. Der Wichtungsfaktor gilt dann nur für die Proben, deren Methylierungsgrad gleichzeitig mit der zugeordneten Präzisionskontrolle ermittelt wurde.

	Variationskoeffizient	Methylierung p66 ^{Shc}	Bisulfit-Modifikation vom:
Kontrolle 1	5,931	18,49	22.09.05
Kontrolle 1		17,69	28.10.05
Kontrolle 1		17,72	04.11.05
Kontrolle 1		20,33	11.11.05
Kontrolle 1		19,18	25.11.05
Kontrolle 2	0,571	19,73	28.10.05
Kontrolle 2		19,89	23.12.05
Kontrolle 3	9,372	18,59	22.09.05
Kontrolle 3		21,76	23.02.06
Kontrolle 3		18,50	24.02.06
Kontrolle 3		17,70	20.04.06
Kontrolle 4	6,445	19,73	26.07.05
Kontrolle 4		18,01	20.04.06
Kontrolle 5	15,970	15,20	25.08.05
Kontrolle 5		19,07	20.04.06

Tab. 4.3: Präzisionskontrollen für die Messung der Promotormethylierung von p66^{Shc}

Variationskoeffizient = Standardabweichung x 100 / Mittelwert

	Variationskoeffizient	Methylierung LINE-1	Bisulfit-Modifikation vom:	Zuordnung zum jeweiligen Lauf (geordnet n. 1. PCR)
Kontrolle 1	4,801	83,525	25.11.05	1. PCR vom 25.05.06 I
Kontrolle 1		77,9	22.09.05	1. PCR vom 25.05.06 II
Kontrolle 1		81,875	04.11.05	1. PCR vom 06.06.06 I
Kontrolle 1		79,975	11.11.05	1. PCR vom 06.06.06 I
Kontrolle 1		89,725	25.11.05	1. PCR vom 26.06.06 I
Kontrolle 1		79,175	25.11.05	1. PCR vom 26.06.06 II
Kontrolle 1		80,625	25.11.05	1. PCR vom 26.06.06 III
Kontrolle 2	6,309	78,15	23.12.05	1. PCR vom 26.06.06 II
Kontrolle 2		71,475	23.12.05	1. PCR vom 25.05.06 II
Kontrolle 3	1,319	79,775	23.02.06	1. PCR vom 26.06.06 III
Kontrolle 3		77,3	24.02.06	1. PCR vom 26.06.06 IV
Kontrolle 3		78,675	20.04.06	1. PCR vom 28.06.06 I
Kontrolle 3		78,15	12.07.06	1. PCR vom 14.07.06 I
Kontrolle 5	4,241	79	20.04.06	1. PCR vom 28.06.06 I
Kontrolle 5		74,4	20.04.06	1. PCR vom 25.05.06 I
Kontrolle 6	2,403	79,01	26.07.05	1. PCR vom 25.05.06 I
Kontrolle 6		76,37	26.07.05	1. PCR vom 14.07.06 I
Kontrolle 7	0,085	74,95	28.10.05	1. PCR vom 25.05.06 II
Kontrolle 7		74,86	28.10.05	1. PCR vom 28.06.06 I

Tab. 4.4: Präzisionskontrollen für die Messung der Methylierung in LINE-1

Variationskoeffizient = Standardabweichung x 100 / Mittelwert

Die ebenfalls mitgeführten Negativkontrollen zeigten bei allen Auswertungen auch ein negatives Ergebnis.

4.2 Voraussetzungen für den T-Test bzw. ANOVA

4.2.1 Kontrollgruppe

Der Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest zeigt das Vorliegen einer Normalverteilung für:

- Methylierung LINE-1
- Methylierung p66^{Shc}
- Homocystein
- Alter
- Kreatinin
- LDL-Cholesterin
- HDL-Cholesterin
- Gesamtcholesterin
- Vitamin B12
- CRP

Nicht normalverteilt sind die Serumwerte für Folsäure. Zur Herstellung einer Normalverteilung werden die Werte in der zur Basis e logarithmierten Form angegeben, in welcher dann von einer Normalverteilung ausgegangen werden kann.

(Labor-)parameter	Kolmogorov-Smirnov-Z Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Homocystein	0,292
Folsäure	0,038*
Alter	0,469
Methylierung LINE-1	0,994
Kreatinin	0,671
HDL	0,052
LDL	0,840
Gesamtcholesterin	0,586
Vitamin B12	0,219
CRP	0,855
Methylierung p66 ^{Shc}	0,400
IgKreatinin	0,770
IgHDL	0,434
IgVitamin B12	0,786
IgCRP	0,795

Tab. 4.5: Prüfung der Normalverteilung innerhalb der Kontrollgruppe. *Signifikanz auf 5%-Niveau

4.2.2 KHK-Patienten

In der Gruppe der KHK-Patienten können als normalverteilt angenommen werden:

- Methylierung LINE-1
- HDL-Cholesterin
- Methylierung p66^{Shc}
- LDL-Cholesterin
- Homocystein
- Gesamtcholesterin
- Folsäure
- Vitamin B12
- Alter
- Ejektionsfraktion

Nicht normalverteilt sind die Werte für Kreatinin und CRP. Zur Herstellung einer Normalverteilung werden auch hier die Werte in der zur Basis e logarithmierten Form angegeben, in welcher dann ebenfalls von einer Normalverteilung ausgegangen werden kann.

(Labor-)parameter	Kolmogorov-Smirnov-Z Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Homocystein	0,140
Folsäure	0,401
Alter	0,453
Methylierung LINE-1	0,971
Kreatinin	0,004**
HDL	0,794
LDL	0,633
Gesamtcholesterin	0,889
Vitamin B12	0,361
CRP	<0,001**
Ejektionsfraktion	0,740
Methylierung p66 ^{Shc}	0,553
IgKreatinin	0,092
IgHDL	0,707
IgVitamin B12	0,987
IgCRP	0,511

Tab. 4.6: Prüfung auf Normalverteilung innerhalb der KHK-Gruppe. **Signifikanz auf 1%-Niveau

Zur Anwendbarkeit im T-Test werden also Kreatinin, CRP und Folsäure in der zur Basis e logarithmierten Form verwendet.

Die Varianzgleichheit wird in Form eines Levene-Tests ermittelt, der für die Stichproben im Zuge des T-Tests durch SPSS durchgeführt wird. Der Nachweis der Varianzgleichheit erfolgt also in Kombination mit dem T-Test und wird bei jedem Test einzeln aufgeführt.

4.3 Statistische Bewertung der Ergebnisse

4.3.1 Methylierung in den LINE-1 als Maß für die Gesamtmethylierung

Zur Bestimmung der Gesamtmethylierung werden vier CpG-Dinukleotide aus den repetitiven LINE-1-Elementen untersucht. In der durchgeführten Pyrosequenzierung wird die Methylierung über den Anteil von nach Bisulfit-Modifikation unverändert vorliegendem Cytosin an den Positionen +307, +319, +322 und +329 bestimmt. Der aus diesen vier Stellen gebildete Mittelwert kann als Surrogatmarker für die Methylierung des gesamten Genoms herangezogen werden. Den errechneten Median zeigt Tabelle 4.7. Die Methylierung in LINE-1 liegt im Vergleich zwischen der KHK-Gruppe und der Kontrollgruppe auf ähnlich hohem Niveau.

Laborparameter	Einheit	Median (5.Perzentile; 95.Perzentile)	
		KHK-Patienten	Kontrollgruppe
Methylierung LINE-1	%	78,545 (71,63; 86,99)	80,04 (74,82; 86,54)

Tab. 4.7: Methylierung von LINE-1 in den untersuchten Populationen

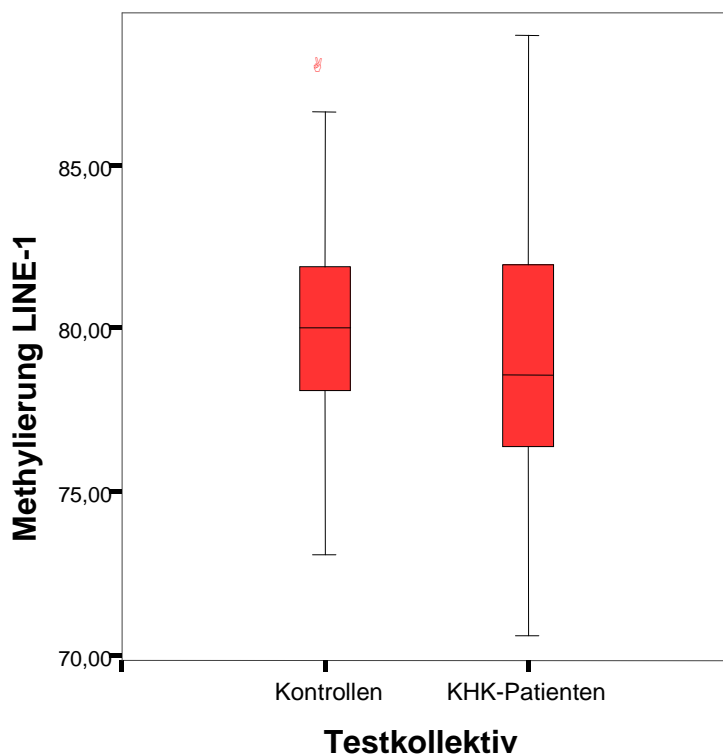


Abb. 4.2: Methylierung in LINE-1 in der KHK-Patienten-Gruppe und der Kontrollgruppe

In Abbildung 4.2 werden die ermittelten Werte als Boxplot dargestellt. Die zur Durchführung eines T-Tests notwendige Varianzgleichheit wird mittels Levene-Test bestätigt. Der sich anschließende T-Test auf Mittelwertgleichheit ergibt einen p-Wert von 0,252 (Tab. 4.8). Es besteht demnach kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen im Hinblick auf die Methylierung in LINE-1.

	Levene-Test der Varianzgleichheit	T-Test für die Mittelwertgleichheit			
	Signifikanz	T	95%-Konfidenzintervall der Differenz		Signifikanz
			Untergrenze	Obergrenze	
Methylierung LINE-1	0,080	1,15	-	2,6407	0,252

Tab. 4.8: Übersicht über Levene-Test und T-Test für die Mittelwertgleichheit im Bezug auf die Methylierung in LINE-1

4.3.2 Promotormethylierung des p66^{Shc}-Gens

Zur Quantifizierung der Promotormethylierung des p66^{Shc}-Gens wird die Methylierung der CpG-Dinukleotide an Position -78, +16 und +23 mittels Pyrosequenzierung bestimmt. Der Mittelwert der an diesen drei Positionen gemessenen Methylierung wird zur Einschätzung der Promotormethylierung von p66^{Shc} herangezogen. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe ist für die KHK-Patienten kein unterschiedliches Methylierungsniveau zu erkennen. Der Median liegt für die KHK-Patienten bei einem Methylierungsgrad von 18,57% und bei den Kontrollen bei 18,51% (Tab. 4.9).

Laborparameter	Einheit	Median (5.Perzentile; 95.Perzentile)	
		KHK-Patienten	Kontrollgruppe
Methylierung p66 ^{Shc}	%	18,57 (9,86; 24,91)	18,51 (11,48; 29,83)

Tab. 4.9: Promotormethylierung des p66^{Shc}-Gens in den untersuchten Populationen

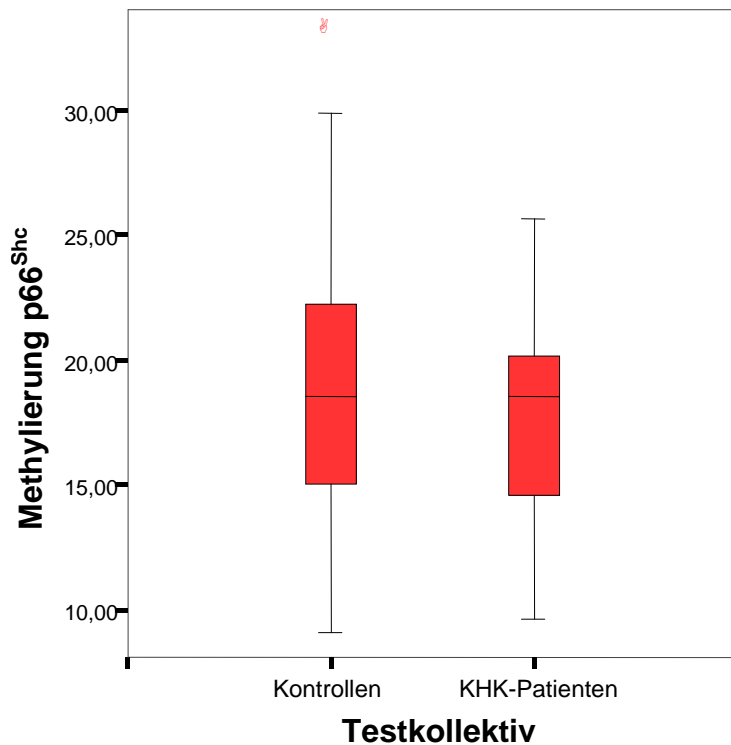


Abb. 4.3: Promotormethylierung von $p66^{Shc}$ bei KHK-Patienten und Kontrollen

Die graphische Darstellung in Abb. 4.3 verdeutlicht das ähnlich hohe Methylierungsniveau in KHK- und Kontrollgruppe. Durch eine Signifikanz von 0,19 im Levene-Test auf Varianzgleichheit sind die Voraussetzungen für einen T-Test erfüllt. Die Durchführung des T-Tests ergibt einen p-Wert von 0,217.

	Levene-Test der Varianzgleichheit	T-Test für die Mittelwertgleichheit			
	Signifikanz	T	95%-Konfidenzintervall der Differenz		Signifikanz
			Untergrenze	Obergrenze	
Methylierung $p66^{Shc}$	0,19	1,24	-	3,4368	0,217

Tab. 4.10: Übersicht über Levene-Test und T-Test für die Mittelwertgleichheit im Bezug auf die Promotormethylierung von $p66^{Shc}$

Im Vergleich des Methylierungsniveaus in der $p66^{Shc}$ -Promotorregion ist somit kein signifikanter Unterschied zwischen KHK-Patienten und Kontrollen nachweisbar.

4.3.3 Einfluss der Anzahl der beteiligten Gefäße im Rahmen der Methylierung

Zusätzlich wird die berechnete Methylierung nach Korrelationen mit dem KHK-Grad untersucht. Abbildung 4.4 zeigt die Methylierung in LINE-1 in Abhängigkeit von der Anzahl der betroffenen Koronargefäße. Dabei steht 0 für die Angehörigen der Kontrollgruppe (n=40), 1 für KHK-Patienten mit einem beteiligten Koronargefäß und dementsprechend 2 und 3 für Patienten mit 2- bzw. 3-Gefäß-KHK. 15 Patienten leiden an einer 1-Gefäß-KHK, 11 Patienten an einer 2-Gefäß-KHK und 14 Patienten an einer 3-Gefäß-KHK. In der Oneway ANOVA ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen mindestens zwei Gruppen (Tab. 4.11). Zur genaueren Spezifizierung wird eine Untersuchung mittels Scheffé-Prozedur durchgeführt.

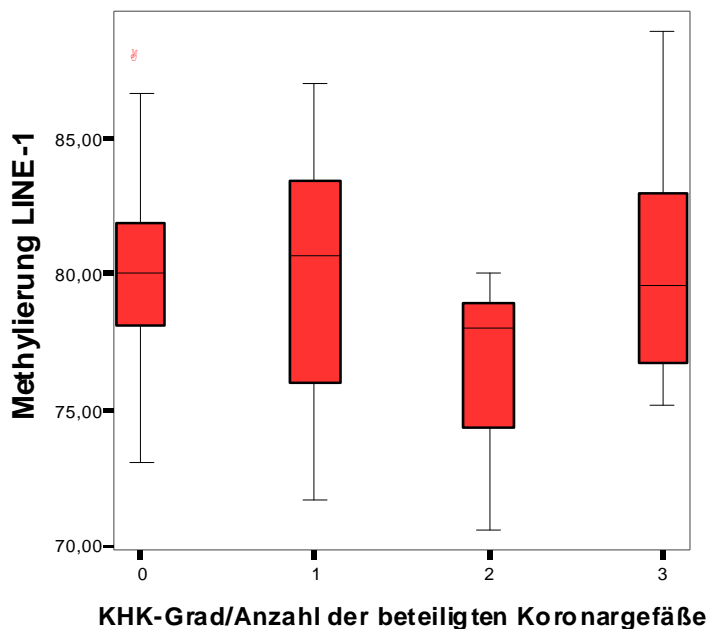


Abb. 4.4: Methylierung in LINE-1 in Abhängigkeit von der Anzahl der betroffenen Koronargefäße

Zwischen den Gruppen:	Signifikanz
Methylierung LINE-1/KHK-Grad	0,027*
Mögliche Ausprägung	
Methylierung LINE-1	stetige Variable
KHK-Grad	0, 1, 2 oder 3 beteiligte Koronargefäße

Tab. 4.11: Abhängigkeit der Methylierung in LINE-1 vom KHK-Grad. *Signifikanz auf 5%-Niveau

Die dabei berechneten Ergebnisse zeigt Tabelle 4.12. Im Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe der KHK-Patienten mit zwei beteiligten Koronargefäßen ergibt sich ein signifikant niedrigeres Methylierungsniveau in den LINE-1-Elementen.

KHK-Grad	KHK-Grad	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
				Untergrenze	Obergrenze
0	1	1,0943	0,987	-	3,530
	2	1,2305	0,046*	0,0464	7,083
	3	1,1224	0,982	-	2,745
1	0	1,0943	0,987	-	2,727
	2	1,4348	0,192	-0,9390	7,265
	3	1,3431	0,937	-	2,975
2	0	1,2305	0,046*	-	-0,464
	1	1,4348	0,192	-	0,9390
	3	1,4563	0,062	-	0,1353
3	0	1,1224	0,982	-	3,673
	1	1,3431	0,937	-	4,705
	2	1,4563	0,062	-0,1353	8,192

Tab. 4.12: Übersicht Scheffé-Prozedur. Abhängige Variable ist die Methylierung in LINE-1.

*Signifikanz auf 5%-Niveau

Eine so unterschiedliche Methylierung lässt sich hingegen im Bereich des p66^{Shc}-Promotors nicht nachweisen. In Abb. 4.5 werden die ähnlichen Methylierungsniveaus anschaulich dargestellt. In der durchgeführten Oneway ANOVA (Tab. 4.13) errechnet sich ein p-Wert von 0,616.

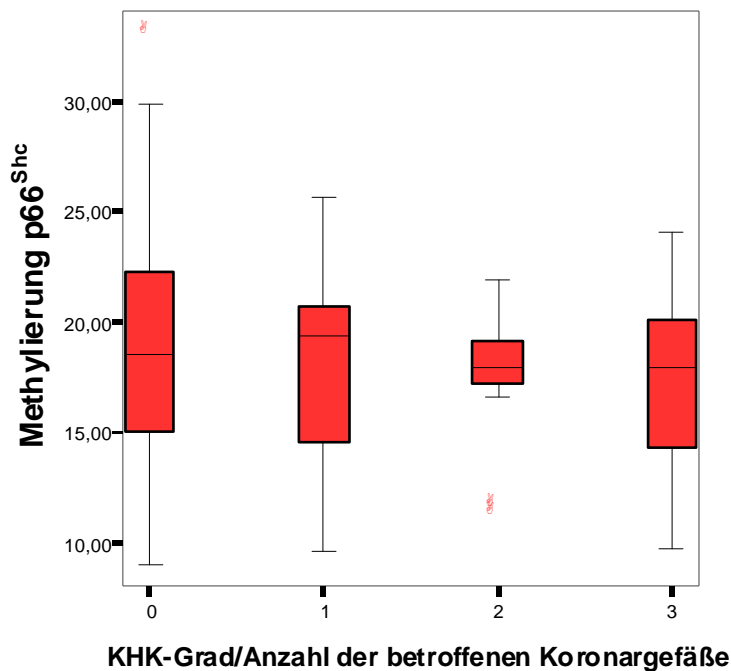


Abb. 4.5: Promotormethylierung von p66^{Shc} in Abhängigkeit von der Anzahl der betroffenen Koronargefäße

Zwischen den Gruppen:	Signifikanz
Methylierung p66 ^{Shc} /KHK-Grad	0,616
Mögliche Ausprägung	
Methylierung p66 ^{Shc}	stetige Variable
KHK-Grad	0, 1, 2 oder 3 beteiligte Koronargefäße

Tab. 4.13: Abhängigkeit der Promotormethylierung von p66^{Shc} vom KHK-Grad

Für weitere Analysen wird eine Spearman-Rho-Korrelationsanalyse durchgeführt, bei der die Korrelationen zwischen allen Variablen überprüft werden (siehe Tabelle 4.18).

4.3.4 Korrelation zwischen der Promotormethylierung von p66^{Shc} und der Methylierung in den LINE-1

Bei der direkten Gegenüberstellung der Promotormethylierung p66^{Shc} und der Methylierung LINE-1 konnte keine erkennbare Abhängigkeit nachgewiesen werden. Im Vergleich beider Methylierungsraten zeigt sich eine Korrelation mit Korrelationskoeffizient = -0,107 und Signifikanz (2-seitig) von 0,345. (siehe Tabelle 4.18). Die durchgeführte Regressionsanalyse ergibt eine Regressionsgerade mit R-Quadrat < 0,01 und somit keine starke Regression.

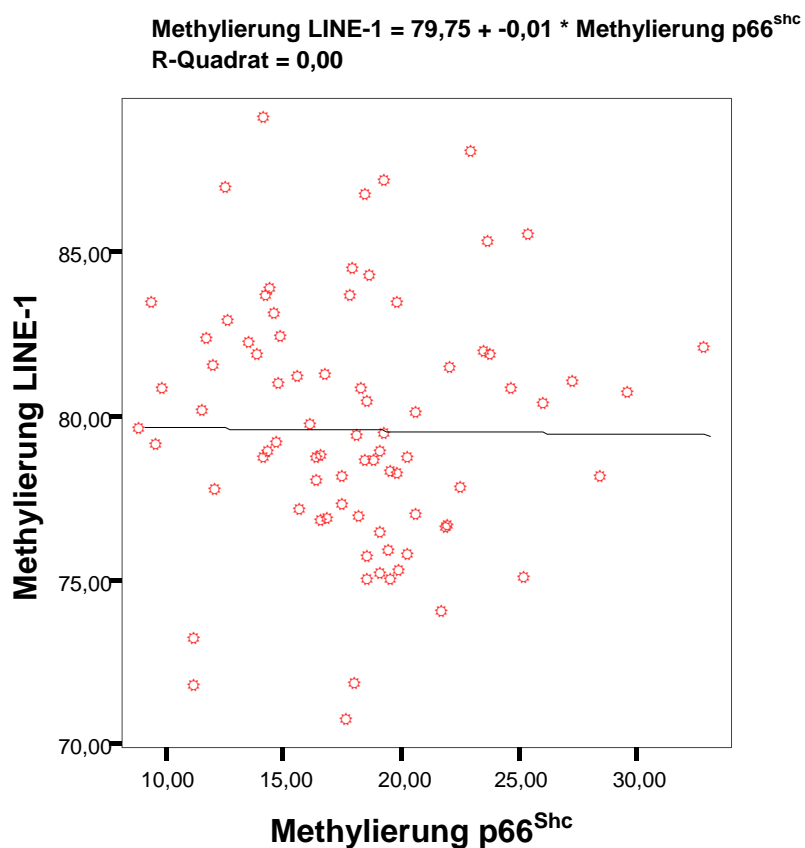


Abb. 4.6: Korrelationsanalyse zwischen der Methylierung LINE-1 und der Promotormethylierung von p66^{Shc} (beide Gruppen)

4.3.5 Homocystein und Methylierung

Die Annahme, dass höhere Homocysteinspiegel mit einer Verminderung der Methylierung in der p66^{Shc}-Promotorregion einhergehen würden, kann nach Auswertung der Ergebnisse nicht bekräftigt werden. So ist eine negative Regression nachzuweisen, die aber nicht die notwendige Signifikanz besitzt.

Bei der Regressionsanalyse der Werte aller Probanden für die Methylierung von p66^{Shc} und Homocystein ergibt sich eine lineare Regressionsgerade mit R-Quadrat < 0,01 und somit keine starke Regression. Die schwach negative Korrelation lässt eine Minderung der Methylierung bei einem hohen Homocysteinspiegel nur vermuten (Korrelationskoeffizient = -0,011 und Signifikanz (2-seitig) = 0,925, siehe Tabelle 4.18).

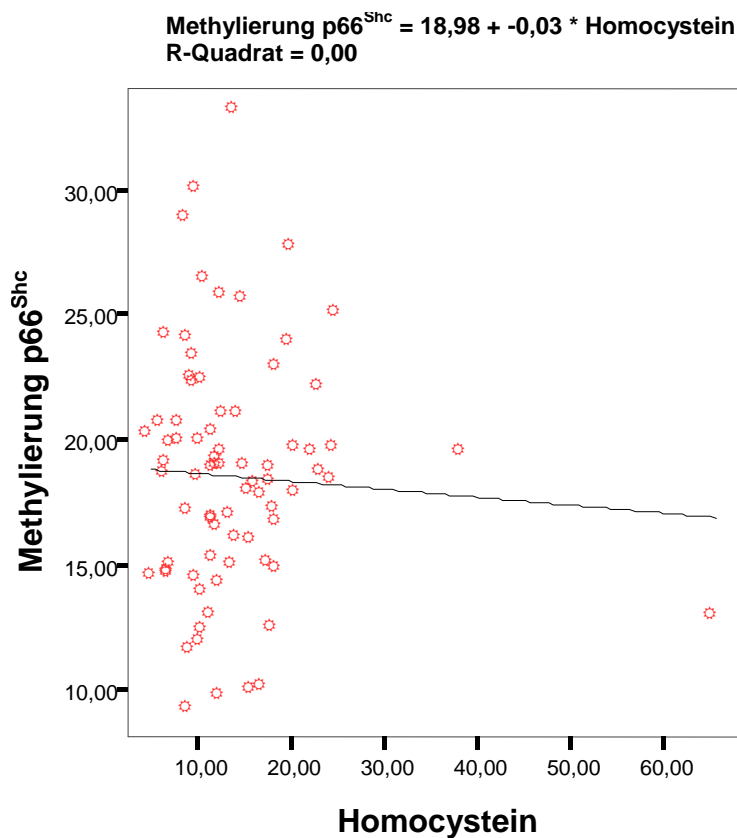


Abb. 4.7: Korrelationsanalyse zwischen Homocystein und der Promotormethylierung von p66^{Shc} (beide Gruppen)

Auch für die Methylierung von LINE-1 ist keine Signifikanz nachzuweisen. Für eine Abhängigkeit der Methylierung des Gesamtgenoms vom Homocysteinspiegel kann kein Beweis erbracht werden. Die Regressionsanalyse der Methylierung in LINE-1 und dem Homocysteinspiegel zeigt ein R-Quadrat von $< 0,01$. Es kann somit auch hier nicht von einer starken Regression ausgegangen werden (siehe Tabelle 4.18).

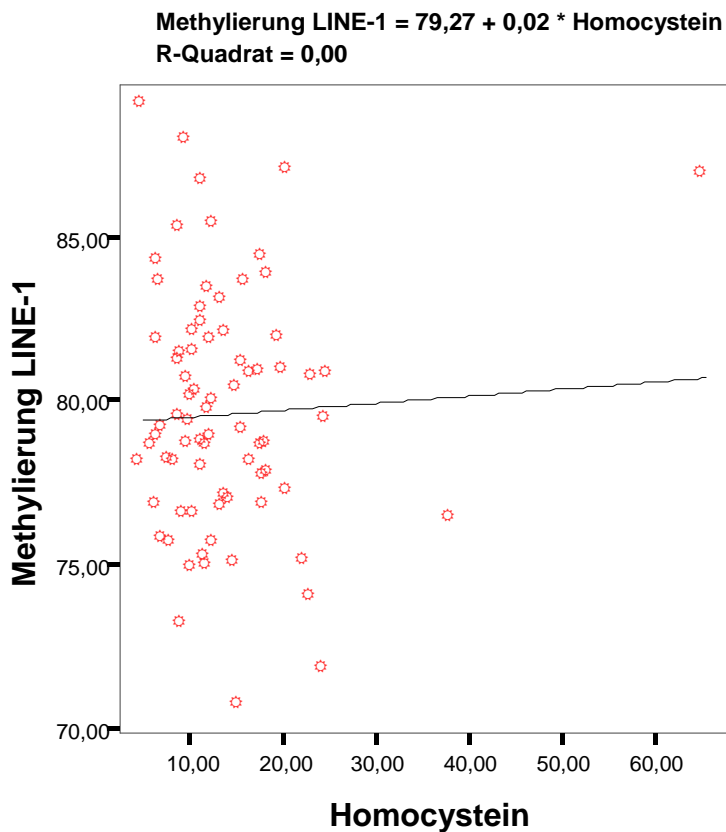


Abb. 4.8: Korrelationsanalyse zwischen Homocystein und der Methylierung LINE-1 (beide Gruppen)

4.3.6 Homocystein und Atherosklerose

Für Homocystein war bereits in der Studie, aus der die DNA-Proben stammen ein signifikanter Unterschied zwischen KHK-Patienten und Kontrollen ermittelt worden (33).

In dem nun untersuchten Subkollektiv kann im Vergleich zwischen KHK-Patienten und Kontrollen ebenfalls ein signifikant höherer Homocysteinspiegel bei den KHK-Patienten nachgewiesen werden. So liegt der Median für das Homocystein bei den KHK-Patienten bei 15,42 und bei den Kontrolle bei 11,4.

Laborparameter	Einheit	Median (5.Perzentile, 95.Perzentile)	
		KHK-Patienten	Kontrollgruppe
Homocystein	µmol/l	15,42* (5,26; 41,2)	11,4* (6,93; 20,43)

Tab. 4.14: Homocysteinserumkonzentration im Vergleich zwischen KHK- und Kontrollgruppe.

*Signifikanz auf 5%-Niveau

Auch die Korrelationsanalyse bestätigt dies. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,239. Die Signifikanz (2-seitig) liegt bei 0,036.

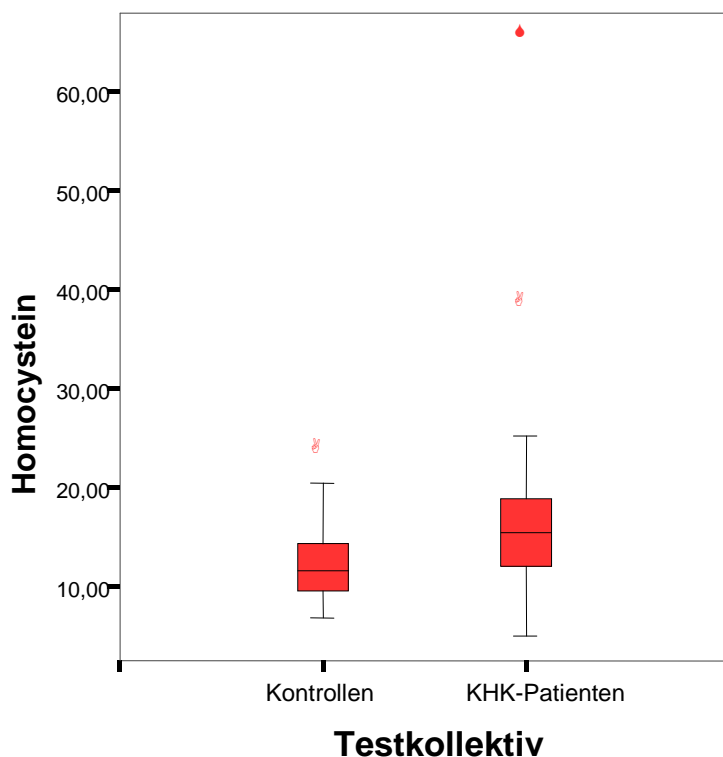


Abb. 4.9: Serumhomocysteinwerte bei KHK-Patienten und Kontrollen

4.3.7 Homocystein und Kreatinin

Für die Analyse werden alle Proben aus KHK-Gruppe und Kontrollgruppe zusammen untersucht. Es zeigt sich eine signifikante positive Korrelation zwischen den Laborwerten für Homocystein und Kreatinin.

So sind höhere Serumkreatininwerte mit höheren Homocysteinwerten vergesellschaftet. Der Korrelationskoeffizient liegt bei 0,464. Die Signifikanz liegt bei 0,0005.

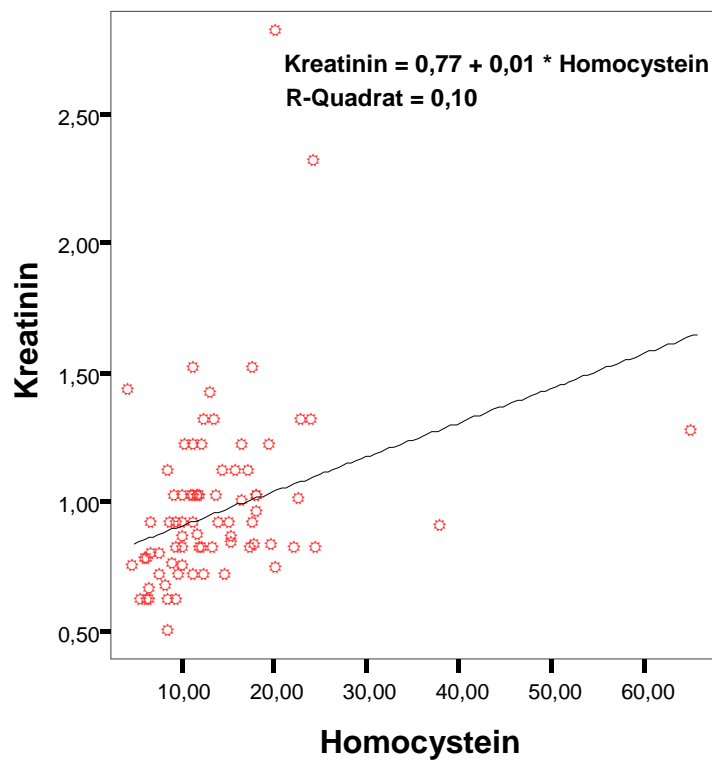


Abb. 4.10: Korrelationsanalyse zwischen Homocystein und Kreatinin (beide Gruppen)

4.3.8 Homocystein und Lipoproteine

Auch für die Werte der Lipoproteine und des Homocysteins ergeben sich bei der gemeinsamen Untersuchung von KHK- und Kontrollgruppe Korrelationen. So besteht eine signifikante negative Korrelation der Werte für HDL-Cholesterin mit den Werten für Homocystein. Ein hoher HDL-Cholesterinspiegel geht also mit einem niedrigen Homocystein einher. Der Korrelationskoeffizient ist -0,368. Die Signifikanz liegt bei 0,02.

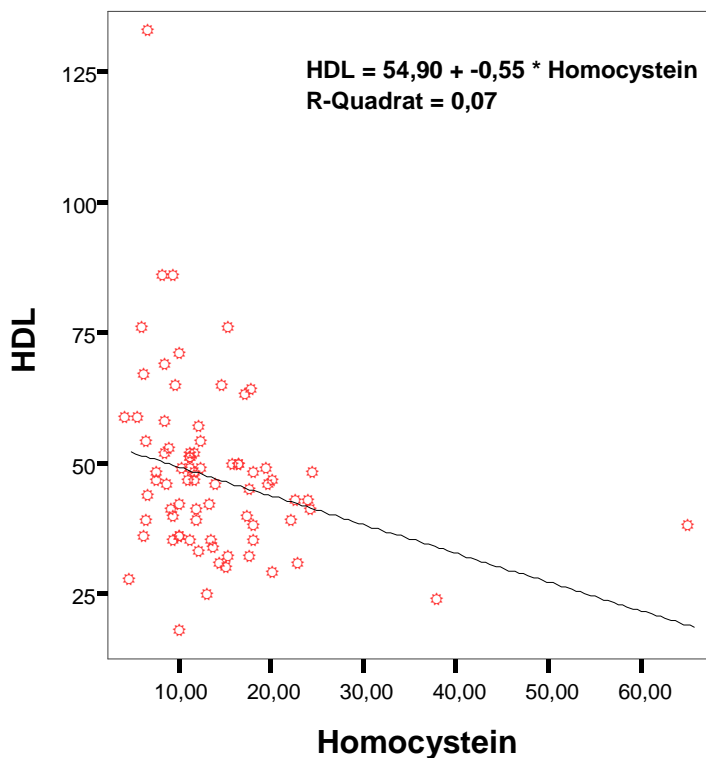


Abb. 4.11: Korrelationsanalyse zwischen Homocystein und dem HDL-Cholesterin (beide Gruppen)

Ebenfalls signifikant negativ ist die Korrelation zwischen Gesamtcholesterin und Homocystein. Hier zeigt die Korrelationsanalyse einen Korrelationskoeffizient von -0,236. Die Signifikanz beträgt 0,039. Hohe Homocysteinspiegel korrelieren also mit niedrigen Werten für Gesamtcholesterin.

Bei beiden Korrelationsanalysen zwischen Lipoproteinkonzentration und Homocystein fallen einige wenige Extremwerte auf, die die Analyse beeinflussen könnten.

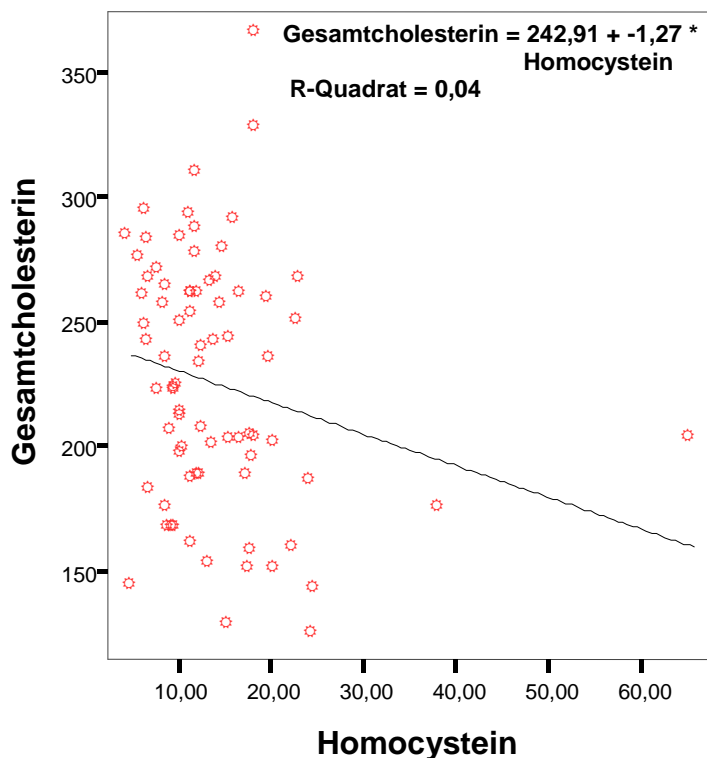


Abb. 4.12: Korrelationsanalyse zwischen Homocystein und Gesamtcholesterin (beide Gruppen)

4.3.9 MTHFR-Polymorphismus und Methylierung

Da in besonderer Weise für den MTHFR-Genotypen TT eine Erhöhung des Atheroskleroserisikos diskutiert wird und MTHFR über eine Verstärkung des Homocysteineffektes eine verminderte Remethylierung bewirken könnte, erfolgt die Auswertung der Ergebnisse mit einer Gruppeneinteilung, bei der die Genotypen CC und CT dem Genotypen TT in Bezug auf die Methylierung gegenübergestellt wurden. Eine unterschiedliche Methylierungsrate konnte weder für die Promotormethylierung von p66^{Shc} noch für die Methylierung von LINE-1 aufgezeigt werden.

Die Analyse der Promotormethylierung von p66^{Shc} in Abhängigkeit vom MTHFR-Genotyp ergab in der Oneway ANOVA keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen MTHFR-Genotyp CC/CT (Median 18,67 [5.Perzentile 9,99; 95.Perzentile 27,96]) und TT (Median 16,44 [11,97; 24,05]). Abbildung 4.13 verdeutlicht das ähnliche

Methylierungsniveau in beiden Subkollektiven. Die Signifikanz beträgt 0,365 bei 31 Personen mit Genotyp CC, 41 Personen mit Genotyp CT und 7 Personen mit Genotyp TT.

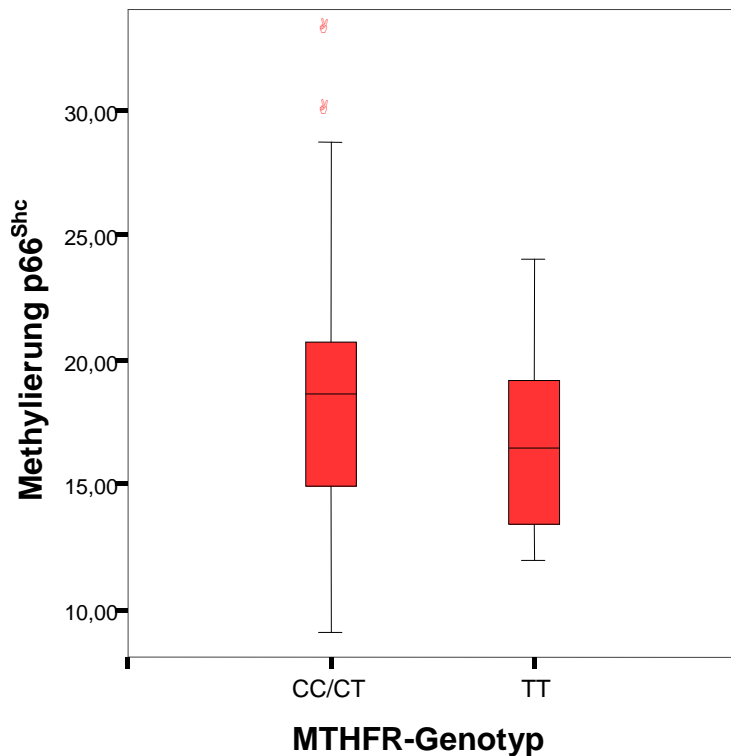


Abb. 4.13: Promotormethylierung von $p66^{Shc}$ in Abhängigkeit vom MTHFR-Genotyp

Abbildung 4.14 zeigt die Werte für die Methylierung in LINE-1 in Abhängigkeit vom MTHFR-Genotyp als Boxplot. Beim Vergleich zwischen den MTHFR-Genotypen CC/CT und TT kann auch für die als Surrogatmarker der Gesamtmethylierung analysierten LINE-1 keine signifikante Abweichung der Werte festgestellt werden. Der Median der Methylierung in LINE-1 liegt in der Gruppe der MTHFR-Genotypen CC und CT (n=72) bei 79,14 (72,56; 86,88). Im Subkollektiv mit Genotyp TT (n=7) liegt der ermittelte Median bei 81,38 (75,01; 84,13). Hier beträgt die Signifikanz 0,554.

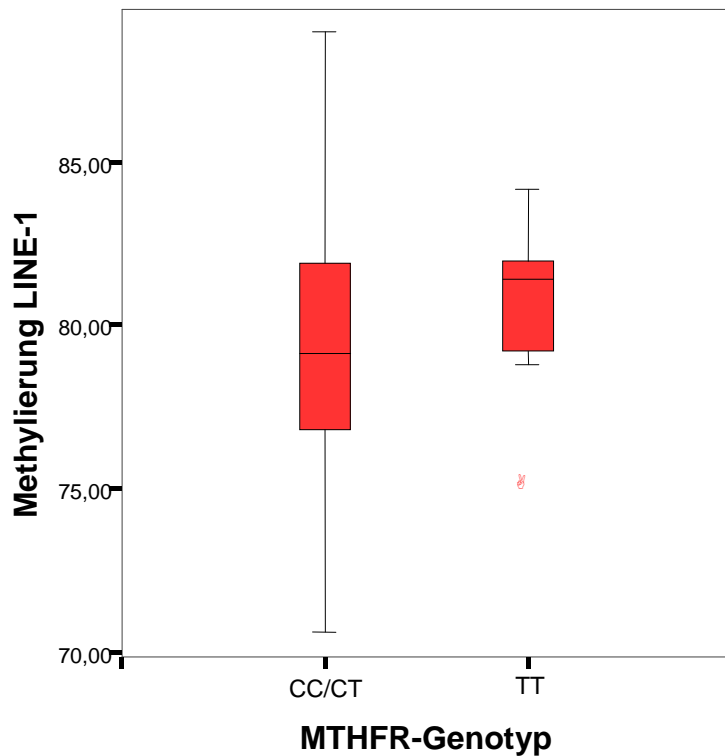


Abb. 4.14: Methylierung in LINE-1 in Abhängigkeit vom MTHFR-Genotyp

Zwischen den Gruppen:		Signifikanz
Methylierung LINE-1/ MTHFR-Genotyp		0,554
Methylierung p66 ^{Shc} / MTHFR-Genotyp		0,365
Mögliche Ausprägung		
Methylierung LINE-1	stetige Variable	
Methylierung p66 ^{Shc}	stetige Variable	
MTHFR-Genotyp	CC/CT o. TT	

Tab. 4.15: Abhängigkeit der Methylierung LINE-1 und der Promotormethylierung von p66^{Shc} vom MTHFR-Genotyp

Vergleicht man die Subkollektive MTHFR-Genotyp CC/CT und TT hinsichtlich des Homocysteins miteinander, zeigen beide Gruppen eine in etwa gleiche Serumhomocysteinkonzentration. Der durchgeführte Levene-Test ermöglicht die Annahme gleicher Varianzen als Voraussetzung für einen T-Test. Die im T-Test ermittelte Signifikanz liegt bei 0,301. In der TT-Gruppe liegt somit keine Homocysteinserumkonzentration vor, die sich signifikant von der CC/CT-Gruppe unterscheiden würde.

	Levene-Test der Varianzgleichheit	T-Test für die Mittelwertgleichheit			
	Signifikanz	T	95%-Konfidenzintervall der Differenz		Signifikanz
			Untergrenze	Obergrenze	
Homocystein	0,722	1,042	-3,34830	10,69372	0,301

Tab. 4.16: Übersicht über Levene-Test und T-Test auf Mittelwertgleichheit im Bezug auf den Serumhomocysteinwert in der Gruppe MTHFR-Genotyp TT gegenüber MTHFR-Genotyp CC/CT.

Abbildung 4.15 veranschaulicht die Verteilung der Serumhomocysteinkonzentration in Abhängigkeit vom MTHFR-Genotyp. Dabei liegt der Median im CC/CT-Subkollektiv bei 12,87 (5.Perzentile 6,5; 95.Perzentile 25,05) und im TT-Subkollektiv bei 8,99 (6,92; 22,76).

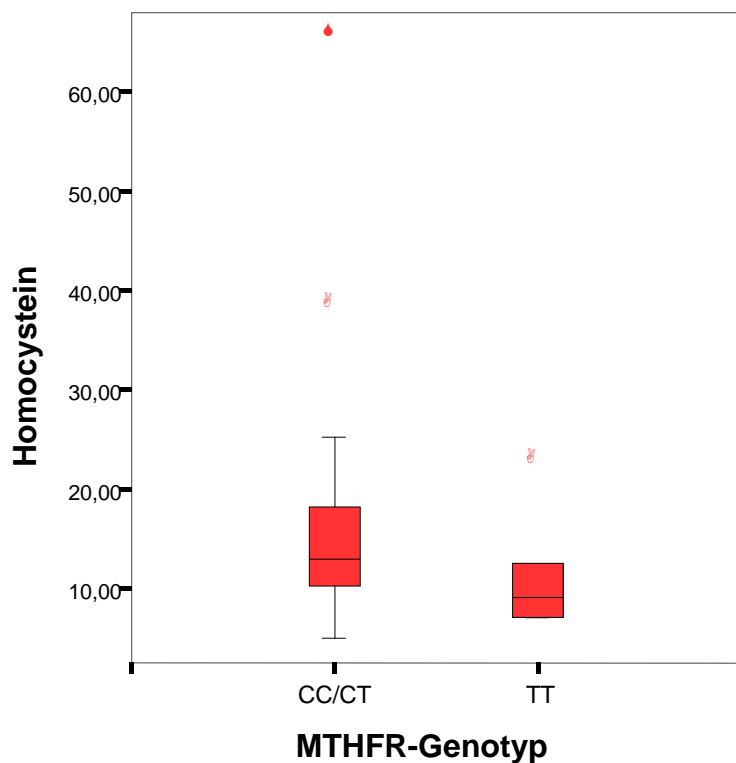


Abb. 4.15: Homocysteinserumkonzentration in Abhängigkeit vom MTHFR-Genotyp

4.3.10 Korrelation zwischen HDL und CRP

Bei der Spearman-Rho-Analyse zeigt sich eine signifikant negative Korrelation zwischen HDL-Cholesterin und CRP. Der hier berechnete Korrelationskoeffizient beträgt -0,452. Die Signifikanz (2-seitig) liegt mit einem Wert von kleiner 0,0005 im 1%-Signifikanzniveau. In der linearen Regressionsanalyse errechnet sich ein R-Quadrat von 0,12 (Abb. 4.16).

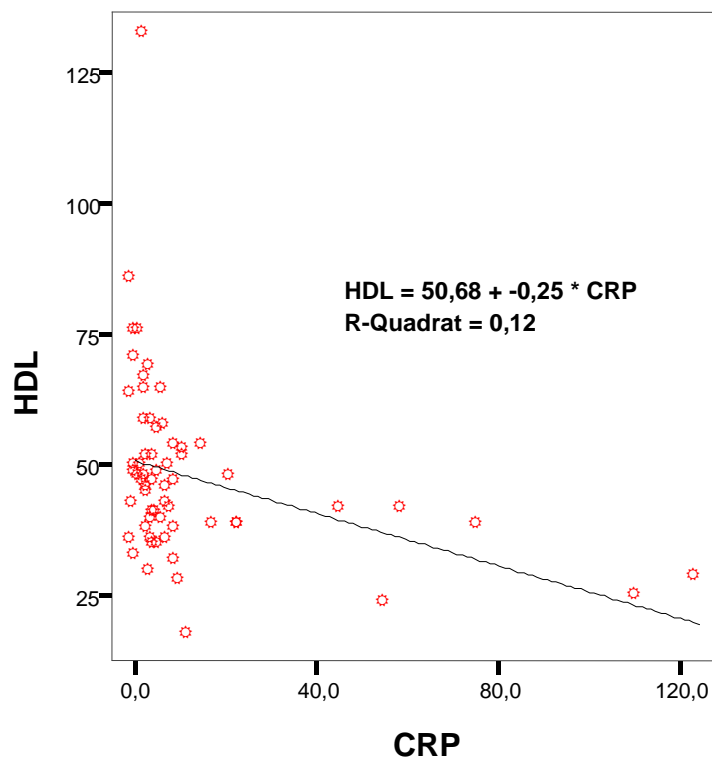


Abb. 4.16: Korrelationsanalyse zwischen CRP und HDL-Cholesterin (beide Gruppen)

4.3.11 Korrelation von HDL mit der Methylierung des p66^{Shc}-Gens

Bei der Spearman-Rho-Analyse lässt sich auch eine signifikante Korrelation zwischen den Werten für HDL und der Methylierung in p66^{Shc} ermitteln. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,248 und die Signifikanz 0,026. Die durchgeführte lineare Regressionsanalyse verdeutlicht den Zusammenhang mit einer Regressionsgeraden mit R-Quadrat=0,04 (Abb. 4.17).

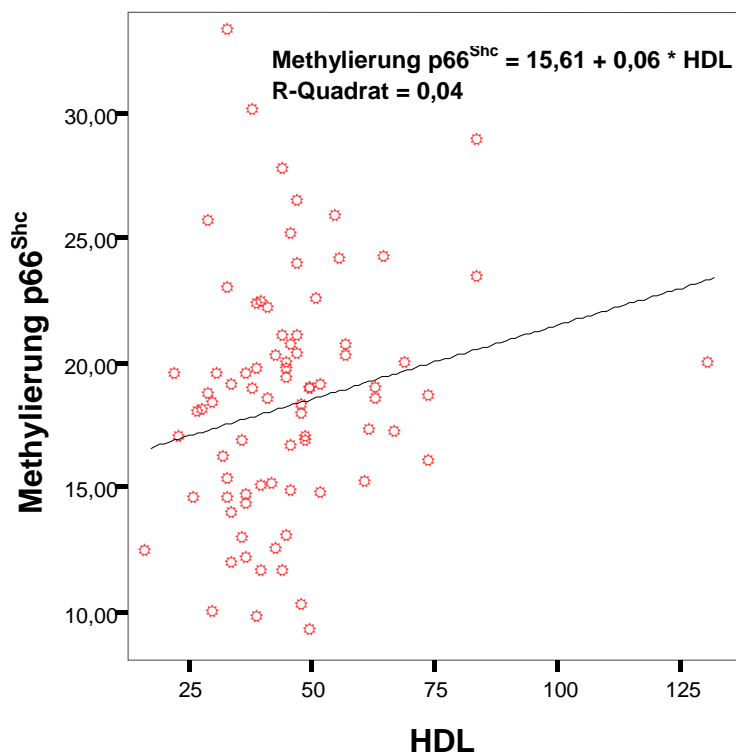


Abb. 4.17: Korrelationsanalyse zwischen HDL-Cholesterin und der Promotormethylierung von p66^{Shc} (beide Gruppen)

4.3.12 Durchführung einer rückwärts gerichteten Regressionsanalyse (Backward-regression)

Um Einflüsse aus direkten Korrelationen zu reduzieren, wurden nur die Werte für LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin, Vitamin B 12, Homocystein, Folsäure und Alter in die Analyse einbezogen.

Bei der Durchführung einer rückwärts gerichteten Regressionsanalyse für die Methylierung in der Promotorregion von p66^{Shc} als abhängige Variable verbleiben letztendlich die zur Basis e logarithmierten Werte für HDL-Cholesterin. Die Signifikanz liegt bei 0,08.

Führt man eine rückwärts gerichtete Regressionsanalyse für die Methylierung von LINE-1 als abhängige Variable durch, verbleibt keine der unabhängigen Variablen im Berechnungsmodell.

Abh. Variable/ Kollektiv	Modell	Parameter	Standardkoeffizient β	R-Quadrat	p-Wert
Promotormethylierung p66 ^{Shc}					
Gesamtkollektiv	6	HDL-Cholesterin (lg)	0,205	0,042	0,08
Methylierung LINE-1					
Gesamtkollektiv	7	-	-	-	-

Tab. 4.17: Backward regression-Analyse mit den abhängigen Variablen Promotormethylierung p66^{Shc} und Methylierung in LINE-1.

Einbezogene Variablen: LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin, Vitamin B 12, Homocystein, Folsäure, Alter

4.3.13 Weitere signifikante Zusammenhänge nach Korrelationsanalyse

Ebenfalls signifikante Korrelationen zeigen sich für die Werte von:

- Alter und Kreatinin (Korrelationskoeffizient= 0,346, Signifikanz (2-seitig) = 0,002)
- HDL und Folsäure (Korrelationskoeffizient= 0,339, Signifikanz (2-s.) = 0,002)
- Ejektionsfraktion und Folsäure (Korrelationskoeffizient= 0,381, Signifikanz (2-s.) = 0,018)

Negativ korrelieren die Werte von

- Alter und Folsäure (Korrelationskoeffizient= -0,249, Signifikanz (2-seitig)= 0,026)
- Kreatinin und Folsäure (Korrelationskoeffizient= -0,232, Signifikanz (2-s.)= 0,038)
- HDL und Kreatinin (Korrelationskoeffizient= -0,367, Signifikanz (2-s.)= 0,001)
- Alter und Gesamtcholesterin (Korrelationskoeffizient= -0,283, Signifikanz (2-s.)= 0,011)
- CRP und Folsäure (Korrelationskoeffizient= -0,302, Signifikanz (2-s.)= 0,017).

Auf einen 5%-Signifikanzniveau ergeben sich rechnerisch für 12 miteinander verglichene Werte vier rein zufallsbedingte signifikante Korrelationen.

		Alter	Methylierung p66 ^{S_{hc}}	Homocystein	Folsäure	Kreatinin	HDL	LDL	Gesamt- cholesterin	Vitamin B12	CRP	Ejektions- fraktion	Methylierung LINE-1
Alter	K	1	-,098	,199	-,249*	,346**	-,219	-,103	-,283*	-,216	-,032	-,319	,127
	Sig.	-	,388	,083	,026	,002	,051	,371	,011	,056	,803	,051	,263
	N	80	80	77	80	80	80	77	80	80	62	38	80
Methylierung p66 ^{S_{hc}}	K	-,098	1	-,011	,108	-,129	,248*	-,078	,018	,034	-,187	,082	-,107
	Sig.	,388	-	,925	,339	,253	,026	,502	,876	,767	,145	,625	,345
	N	80	80	77	80	80	80	77	80	80	62	38	80
Homocystein	K	,199	-,011	1	-,185	,464**	-,332**	-,058	-,236*	-,201	,152	-,047	-,058
	Sig.	,083	,925	-	,108	,000	,003	,626	,039	,079	,249	,790	,615
	N	77	77	77	77	77	77	74	77	77	59	35	77
Folsäure	K	-,249*	,108	-,185	1	-,232*	,339**	,036	,216	,091	-,302*	,381*	,015
	Sig.	,026	,339	,108	-	,038	,002	,754	,054	,423	,017	,018	,895
	N	80	80	77	80	80	80	77	80	80	62	38	80
Kreatinin	K	,346**	-,129	,464**	-,232*	1	-,367**	,110	-,042	-,083	,052	-,109	-,007
	Sig.	,002	,253	,000	,038	-	,001	,343	,713	,466	,688	,514	,954
	N	80	80	77	80	80	80	77	80	80	62	38	80
HDL	K	-,219	,248*	-,332**	,339**	-,367**	1	-,013	,270*	,022	-,452**	,281	,006
	Sig.	,051	,026	,003	,002	,001	-	,914	,015	,845	,000	,088	,955
	N	80	80	77	80	80	80	77	80	80	62	38	80
LDL	K	-,103	-,078	-,058	,036	,110	-,013	1	,901**	,257*	-,021	,125	,111
	Sig.	,371	,502	,626	,754	,343	,914	-	,000	,024	,874	,474	,338
	N	77	77	74	77	77	77	77	77	77	59	35	77
Gesamt- cholesterin	K	-,283*	,018	-,236*	,216	-,042	,270*	,901**	1	,225*	-,140	,197	,095
	Sig.	,011	,876	,039	,054	,713	,015	,000	-	,045	,278	,236	,401
	N	80	80	77	80	80	80	77	80	80	62	38	80
Vitamin B12	K	-,216	,034	-,201	,091	-,083	,022	,257*	,225*	1	,043	,147	,029
	Sig.	,055	,767	,079	,423	,466	,845	,024	,045	-	,740	,380	,796
	N	80	80	77	80	80	80	77	80	80	62	38	80
CRP	K	-,032	-,187	,152	-,302*	,052	-,452**	-,021	-,140	,043	1	-,307	,029
	Sig.	,803	,145	,249	,017	,688	,000	,874	,278	,740	-	,061	,822
	N	62	62	59	62	62	62	59	62	62	62	38	62
Ejektions- fraktion	K	-,319	,082	-,047	,381*	-,109	,281	,125	,197	,147	-,307	1	-,271
	Sig.	,051	,625	,790	,018	,514	,088	,474	,236	,380	,061	-	,100
	N	38	38	35	38	38	38	35	38	38	38	38	38
Methylierung LINE-1	K	,127	-,107	-,058	,015	-,007	,006	,111	,095	,029	,029	-,271	1
	Sig.	,263	,345	,615	,895	,954	,955	,338	,401	,796	,822	,100	-
	N	80	80	77	80	80	80	77	80	80	62	38	80

Tab. 4.18: Spearman-Rho-Korrelationsanalyse (K: Korrelationskoeffizient, Sig.: Signifikanz (2-seitig), N: Anzahl der vorhandenen Werte).

*Korrelation auf 5%-Signifikanzniveau. **Korrelation auf 1%-Signifikanzniveau

5. Diskussion

5.1. Homocystein, globale DNA-Methylierung und Atherosklerose

Ein erhöhter Homocysteinspiegel wird als Risikofaktor für die Entstehung von Atherosklerose diskutiert. Zahlreiche Fall-Kontroll-Studien konnten bei Atherosklerosepatienten signifikant höhere Homocysteinspiegel nachweisen (24, 49, 82). Für Homocystein wird ein Einfluss bei Entzündungsreaktionen, bei der Vermittlung von oxidativem Stress und bei der Apoptose diskutiert. Unter anderem konnte Homocystein eine Rolle bei der Bildung von Sauerstoffradikalen und für die Funktion von Monozyten und Makrophagen nachgewiesen werden. Bis heute wird diskutiert, ob Homocystein selbst eine direkte Wirkung auf die Atherosklerose besitzt, oder ob es einen indirekten Marker für andere biochemische Prozesse darstellt, die mit der Atherosklerose in Zusammenhang stehen (61). Während von der DACH-LIGA Homocystein eine Risikoerhöhung ab einem Plasmahomocystein von über 12 $\mu\text{mol/l}$ angegeben wird (100), stellen einige in letzter Zeit veröffentlichte Studien dies in Frage. Die Untersuchungen von VISP (103), NORVIT (11) und HOPE-2 (64) untersuchten in der Vergangenheit die Auswirkungen einer homocysteinsenkenden Therapie auf die Inzidenz atherosklerotischer Erkrankungen. Als Ergänzung der medikamentösen Therapie verabreichten alle Untersucher B-Vitamine an Atherosklerosepatienten. Keine der Studien, die 3749, 3860 und 5522 Patienten umfassten, konnte einen Nutzen einer solchen Zusatztherapie nachweisen. Bei genauer Betrachtung weisen alle drei Untersuchungen methodische Schwächen auf, die die negativen Ergebnisse fraglich erscheinen lassen. Eine durch Wang et al. durchgeführte Metaanalyse, die acht randomisierte Studien mit insgesamt 16841 Patienten umfasst, konnte eine 18%ige Verminderung des Risikos für Schlaganfälle durch Senkung des Plasmahomocysteinspiegels über Folsäuresupplementation ermitteln (111). Weiterhin zeigt sich eine geringere Inzidenz für Schlaganfälle in Ländern mit erhöhter nutritiver Folsäurezufuhr, wie in den USA und Kanada (116).

Alles in Allem scheint eine Erhöhung der Homocysteinwerte bei Atherosklerosepatienten sicher zu sein. In einer epidemiologischen Studie konnten bei 20% der dort untersuchten KHK-Patienten erhöhte Homocysteinwerte ermittelt werden, während nur 5% der gesunden, altersentsprechend gleichverteilten Kontrollen erhöhte Werte aufwiesen (109). Das Vorliegen erhöhter Serumhomocysteinspiegel konnte in der durchgeführten Untersuchung nachvollzogen werden. In der KHK-Gruppe lag der Median mit 15,42 $\mu\text{mol/l}$ signifikant höher als bei den Kontrollpatienten, bei denen ein Median von 11,4 $\mu\text{mol/l}$ berechnet wurde

(s. Tabelle 4.2). Bereits in der vorausgegangenen Untersuchung des gleichen Subkollektivs durch Geisel et al. (33) konnten für die KHK-Patienten signifikant höhere Homocysteinwerte gemessen werden. Das aus diesem Patientenkreis selektierte Probenmaterial zeigt also im Vergleich zu den ebenfalls aus dieser Studie stammenden Kontrollen erwartungsgemäß eine erhöhte Serumhomocysteinkonzentration.

Die Auswirkungen dieser Erhöhung der Homocysteinkonzentration sind weitgehend unbekannt. Der in diesem Zusammenhang wichtige Einfluss auf die Genfunktion lässt sich durch regulatorische Einflüsse von S-Adenosylhomocystein (SAH) und S-Adenosylmethionin (SAM) erklären (96).

Da Homocystein entweder durch Transsulfurierung abgebaut oder zu Methionin remethyliert wird, kommt es bei Mangel der beteiligten Vitamine zu einem erhöhten Homocysteinspiegel und nachfolgend zu einer Überforderung der Transsulfurierungs- und Remethylierungsreaktionen. Unter anderem entsteht dann eine Umkehrung der Hydrolyse von SAH zu Homocystein und die Konzentration von SAH steigt an. SAH und SAM spielen eine wichtige Rolle bei Methylierungsprozessen und bei epigenetischen Modifikationen. Während SAH die scheinbar bedeutsamere Rolle als starker Inhibitor von Methylierungsprozessen zukommt, ist SAM Methylgruppendonator im Rahmen vieler Methylierungsvorgänge (14, 118). In einer Arbeit von Liu et al. wird SAH als eigenständiger Marker für die Atherosklerose diskutiert. Im Versuch mit Knock-Out-Mäusen für Apolipoprotein E konnten Liu et al. für SAH sogar eine stärkere Aussagekraft im Hinblick auf den Gefäßstatus ermitteln, als für Homocystein (61).

Auch für SAH und SAM sind die genauen Wirkmechanismen nicht eindeutig geklärt. Unter der Annahme einer starken Hemmung der Methylierung durch SAH scheint der Zusammenhang zur Atherosklerose über die DNA-Methylierung hergestellt werden zu können. Die DNA-Methylierung könnte der Mechanismus sein, über den Homocystein und SAH auf die Atherosklerose wirken. Eine Untersuchung von Castro et al. analysiert den Zusammenhang zwischen globaler DNA-Methylierung und Homocystein. So sinkt in vitro die DNA-Methylierung bei höheren Homocysteinwerten ab. Unter Zugabe des Hydrolaseinhibitors Adenosin-2,3-dialdehyd (ADA) sinken die Homocysteinwerte und die DNA-Methylierung nimmt ab (15).

Eine weitere Untersuchung von Castro et al. zur Pathophysiologie der Atherosklerose legt den Schwerpunkt auf die oben genannten vermuteten epigenetischen Wirkungen von Homocystein und zusätzlich der im Homocysteinstoffwechsel beteiligten SAH und SAM (14).

In der Studie von Castro et al. konnte erstens die Hypothese einer pathologischen Wirkung von SAH aufgestellt und zweitens eine DNA-Hypomethylierung bei hohen Homocysteinwerten nachgewiesen werden. Während bei Castro et al. 17 männliche Atherosklerosepatienten, bei denen sich ein Schlaganfall oder Myokardinfarkt ereignet hat, und 15 gesunde männliche Kontrollen verglichen werden, erfolgte aktuell ein Vergleich zwischen 40 an Koronarer Herzerkrankung leidenden Atherosklerosepatienten und 40 gesunden Kontrollen. Für die aktuelle Studie konnte also bei einer größeren Anzahl an Patienten und Kontrollen genetisches Material untersucht werden.

Im Gegensatz zur Untersuchung von Castro et al. erfolgte keine Ermittlung von SAH oder SAM. Da es sich bei SAH und SAM theoretisch nur um zwischengeschaltete Moleküle im Regulationsweg Homocystein-SAH/SAM-Methylierung handelt und Homocystein und SAH in der Regel parallel erhöht sind, kann darauf verzichtet werden (118).

Während die Studie von Castro et al. die oben genannte Theorie bestätigt, kann dies in der aktuellen Untersuchung nicht nachvollzogen werden. Die untersuchten KHK-Patienten wiesen, im Vergleich mit den gesunden Kontrollen, kein signifikant niedrigeres globales Methylierungsniveau auf. Eine weitergehende Untersuchung der Zusammenhänge von Homocystein, SAH und DNA-Methylierung scheint geboten, da auch andere Autoren entsprechende Daten publizieren konnten. Im Jahr 2000 konnten von Yi et al. (118) ähnliche Ergebnisse, wie bei Castro et al. vorgelegt werden. Auch hier zeigten sich mit einer DNA-Hypomethylierung in lymphozytärer DNA einhergehende erhöhte Plasmaspiegel an Homocystein und SAH. Im Gegensatz dazu konnte eine Studie von Kok et al. bei gesunden Probanden keinen Zusammenhang zwischen der Serumhomocysteinkonzentration und der globalen DNA-Methylierung ermitteln (55), was auch mit den aktuell ermittelten Ergebnissen übereinstimmt.

Die Wahl verschiedener Methoden könnte ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse von Castro et al. in Bezug auf die Messung der Methylierung des Gesamtgenoms sein. Das bei Castro et al. und Yi et al. festgestellte Ergebnis für die Methylierung des Gesamtgenoms beruht auf Einsatz der Endonuklease HpaII, während hier die DNA-Methylierung anhand der Methylierung in den LINE-1 gemessen wird. Die LINE-1 umfassen mit rund 500.000 repetitiven Elementen circa 21% der gesamten DNA und liegen in einer Länge von einigen Hundert bis zu ungefähr 9000 Basenpaaren vor (52).

Der große Anteil dieser repetitiven Elemente an der Gesamt-DNA erlaubt die Methylierung in den LINE-1 als repräsentativ für die Methylierung des gesamten Genoms zu betrachten. Die

Bisulfit-Modifikation und anschließende Pyrosequenzierung sind einfach durchzuführende und aussagekräftige Methoden zu ihrer Quantifizierung (114, 115).

Ein weiteres im Homocysteinestoffwechsel wichtiges Enzym, dem ebenfalls eine schwache, aber nachgewiesene Rolle bei der Atheroskleroseentstehung zuzukommen scheint, ist die Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR). Die MTHFR ist an der Remethylierung von Homocystein beteiligt. Homocystein wird in Methionin umgewandelt. Der Polymorphismus des MTHFR-Gens an Position 677 (C→T) konnte mit einer reduzierten Enzymaktivität und erhöhten Homocysteinwerten assoziiert werden, vor allem dann, wenn niedrige Folsäurespiegel vorliegen (13). Es besteht eine mit dem Genotypen TT einhergehende Erhöhung der Homocysteinwerte um durchschnittlich 2,5 µmol/l im Vergleich zum Genotypen CC. Untersuchungen von Perna et al. diskutieren eine durch Homocystein verursachte DNA-Hypomethylierung, die auch bei der MTHFR-Mutation auftreten könnte (78, 79). Den Trägern des Genotypen TT sollte also eine DNA-Hypomethylierung aufgrund einer gestörten Remethylierung nachweisbar sein, um diese Studien zu bestätigen.

Eine mit dem Genotypen TT einhergehende Erhöhung der Homocysteinwerte konnte im Rahmen meiner Untersuchung allerdings nicht dargestellt werden. Die Untersuchung des Methylierungsgrades in den LINE-1-Elementen ergab ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen TT und CT/CC-Genotypen.

Während eine Metaanalyse von Klerk et al. (54) für den Genotypen TT an Position 677 ein signifikant höheres KHK-Risiko berechnen konnte, war dies in der aktuellen Untersuchung nicht zu verifizieren. Wie Klerk et al. allerdings ausführen lassen sich signifikante Risikoerhöhungen nur bei einem ausreichend großem Stichprobenumfang erwarten. Zurückzuführen ist dies wohl auf eine starke Heterogenität der ermittelten Risikoerhöhungen. Die Prävalenz des Genotypen TT liegt bei etwa 10%. In allen von Klerk et al. einbezogenen Studien zusammen wurden fast 24.000 Proben untersucht. Die hier betrachteten 80 Patienten stellen möglicherweise einen zu geringen Stichprobenumfang dar, um Unterschiede sicher detektieren zu können. Ein signifikanter Unterschied liegt nicht vor und kann, die Erkenntnisse von Klerk et al. einbeziehend, auch nicht als zu erwarten angesehen werden.

5.2. Methylierung von p66^{Shc} und Atherosklerose

Neben vielen Risikofaktoren für die Atheroskleroseentstehung, die in der Ernährung, der Lebensweise oder dem sozialen Umfeld begründet sind, konnten auch genetische Faktoren bestimmt werden. Nur ein kleiner Prozentsatz der Erkrankungen kann monogenetischen Veränderungen zugeschrieben werden. Während diese monogenetischen Veränderungen direkt zu atherosklerotischen Läsionen führen und in der Regel den Gesamtgefäßstatus eines Patienten betreffen, können davon Veränderungen von Suszeptibilitätsgenen unterschieden werden. Diese Suszeptibilitätsgene schaffen bei entsprechendem Genotyp ein Umfeld, in dem die Atherosklerose begünstigt wird. Das Vorliegen eines veränderten Suszeptibilitätsgens erhöht die Wahrscheinlichkeit für entsprechende lokale Läsionen oder für eine generalisierte Atherosklerose. Eine atherosklerotische Gefäßveränderung kann aber nicht allein durch das Vorliegen eines einzigen proatherosklerotischen Suszeptibilitätsgens erklärt werden. Die Forschung auf diesem Gebiet ist umfangreich, lieferte aber bisher keine eindeutigen Ergebnisse. Vielmehr könnte die epigenetische Modifikation der Genfunktion eine wichtige Rolle spielen. Die DNA-Methylierung ist eine epigenetische Modifikation, die in der Lage ist die Genexpression zu beeinflussen (10). Es konnte gezeigt werden, dass eine Stilllegung von Genen über die Methylierung in deren Promotorregion möglich ist. Epigenetische Mechanismen sind bei der X-chromosomalen Inaktivierung, der genomischen Prägung, der Zelldifferenzierung durch differentielle Genexpression und die Repression von retroviralen oder parasitären DNA-Sequenzen im Genom von Bedeutung. Zunehmend werden epigenetische Veränderungen auch mit pathologischen Zuständen in der Zelle in Verbindung gebracht. Die epigenetische Forschung steht noch am Anfang und soll einen Beitrag zur Ermittlung von weiteren, bislang unbekanntem Einflussfaktoren auf die Pathophysiologie darstellen. Hierbei ist zwischen der epigenetischen Modifikation des Gesamtgenoms und der Promotormethylierung einzelner Gene zu unterscheiden. Während die Methylierung im Gesamtgenom eher allgemeinen Informationsgehalt besitzt, zeigt die Methylierung in der genspezifischen Promotorregion den Aktivitätszustand dieses Gens an und hat direkte Auswirkungen auf die Expression des Gens. Beide epigenetischen Mechanismen zeigen, dass Umweltfaktoren in der Lage sind unser Genom zu modifizieren. Die Genexpression ist nicht statisch, sondern passt sich an die unterschiedlichen Voraussetzungen an.

Ein Beispiel für ein durch epigenetische Einflüsse modifizierbares Gen ist das für den Östrogenrezeptor α kodierende Gen $ER\alpha$. In der Vergangenheit wurde es bereits intensiv untersucht. $ER\alpha$ wird eine Rolle bei der Entstehung der Atherosklerose zugeschrieben (27).

Es ist ein wirksames Wachstumssuppressorgen. Über eine Promotormethylierung im ER α -Gen kann die Östrogenwirkung vermindert werden. Durch diese verminderte Östrogenwirkung werden weniger proliferationsfördernde Mediatoren ausgeschüttet. Im Zuge dessen kommt es auch zu einer Verminderung der Proliferation glatter Muskelzellen (SMCs) (43).

Im Jahre 1999 wurde erstmals die Hypothese aufgestellt, die einen Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung im ER α -Gen und dem Auftreten von Koronarer Herzerkrankung postuliert (80). Das Beispiel ER α zeigt, wie epigenetische Modifikationen einen Einfluss auf die Atheroskleroseentstehung haben können. Darauf basierend ist es sinnvoll weitere Gene in die Untersuchungen mit einzubeziehen. Erfolgversprechend scheinen vor allem Untersuchungen an Genen, denen eine die Gefäßfunktion beeinflussende Wirkung zukommt. Chronischer und oxidativer Stress stellt einen viel diskutierten kausalen Risikofaktor für eine verstärkte Atherosklerose dar. Die Gefäßfunktion wird hier unter anderem durch Faktoren beeinflusst, die in körpereigene Signaltransduktionskaskaden eingreifen oder einen Teil von ihnen darstellen. Dies geschieht als eine Reaktion auf äußere oder innere Reize. Die epigenetischen Einflüsse bei dieser Signalübertragung bestehen in einer Über- oder Unterexpression von regulatorisch wirkenden Genprodukten. Mehrere Gene sind hier beteiligt. Von den Kandidatengenen wurde der Wirkung von p66^{Shc} in den letzten Jahren viel Aufmerksamkeit gewidmet (71). Bei Studien mit Knock-Out-Mäusen für p66^{Shc} konnte eine Unempfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress ermittelt werden. Außerdem zeigten diese Mäuse eine um 30% verlängerte Lebensdauer im Vergleich zu Wildtypmäusen.

Für p66^{Shc} werden zwei alternative Pathomechanismen diskutiert. Der erste Mechanismus schreibt p66^{Shc} einen Einfluss in der Signaltransduktionskaskade über Forkhead-Transkriptionsfaktoren zu, der zu einer verminderten Expression antioxidant wirkender Enzyme führt. Der zweite Mechanismus wird in einer direkten Stimulation mitochondrialer H₂O₂-Produktion gesehen (36, 37). Bereits 2002 war durch Ventura et al. nachgewiesen worden, dass epigenetische Modifikationen zu einer Abschaltung der Genaktivität von p66^{Shc} führen können. So ist die Expression von p66^{Shc} vom Methylierungsgrad in seiner Promotorregion abhängig.

Die p66^{Shc}-Promotorregion umfasst acht CpG-Dinukleotide, die auf eine Gesamtlänge von 200 bp verteilt sind. Diese acht CpG-Dinukleotide liegen an Position -138, -127, -78, -53, -30, +16, +23 und +30. Bei von Ventura et al. aus dem Vollblut isolierten Lymphozyten erscheinen vor allem die Positionen -78, +16 und +23 durch ihren Methylierungsgrad im Bereich zwischen 29% und 67% interessant. Ventura et al. konnte bei 21 untersuchten Proben

eine Methylierung in 29% der Fälle an Position -78 und Position +16 messen. Die Position +23 war bei 14 von 21 Proben, also bei 67%, methyliert (108). Ein durchschnittlich höherer Methylierungsgrad könnte epigenetische Modifikationen verschleiern, während geringere Methylierungsgrade zu einer Überbewertung führen könnten.

Die Ermittlung der Promotormethylierung basiert auf der Messung an den Positionen -78, +16 und +23. Für KHK-Patienten und Kontrollen zusammengefasst beträgt der nicht über die Präzisionskontrollen gewichtete Mittelwert für die Methylierung an Position -78 15,0%, an Position +16 11,5% und an Position +23 28,4%. Die Promotormethylierung errechnet sich als das arithmetische Mittel dieser drei Positionen. In der Auswertung der Messungen ergibt sich eine Methylierung von 19,0% in der Kontrollgruppe und von 17,7% in der Gruppe der KHK-Patienten. Eine signifikante DNA-Hypomethylierung in der p66^{Shc}-Promotorregion von KHK-Patienten liegt nicht vor.

Bei einer Untersuchung von Post et al. zur Methylierung von ER α konnte dort eine Promotormethylierung von 10 \pm 2% bei Atherosklerosepatienten im Vergleich zu 4 \pm 1% (p<0,01) bei gesunden Kontrollen ermittelt werden (80). Während in der Untersuchung von Post et al. die Quantifizierung mittels Southern Blot Analyse durchgeführt wird, kann hier eine Pyrosequenzierung nach vorausgegangener Bisulfit-Modifikation durchgeführt werden. Auch die Wahl unterschiedlichen Probenmaterials, nämlich betroffenes Gewebe im Gegensatz zu Blutproben, stellt einen wichtigen Unterschied dar (s. u.).

Während im direkten Vergleich zur Arbeit von Post et al. die unterschiedliche Vorgehensweise die Vergleichbarkeit einschränkt, bedient sich eine Studie von Geisel et al. der exakt gleichen Methoden. Hier wird die Methylierung von aus peripheren mononuklearen Zellen isolierter DNA bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz (end stage renal disease=ESRD) gemessen. Die Kontrollgruppe zeigt eine Promotormethylierung von 27,2% und die Patientengruppe eine Promotormethylierung von 18,4% (34).

So scheinen die bei ESRD-Patienten gefundenen Unterschiede nicht auf die KHK-Patienten übertragbar. Für ESRD-Patienten spezifische Veränderungen, wie die Erhöhung der SAH-Konzentration auf das 25fache im Vergleich mit den Kontrollen, kommen bei KHK-Patienten nicht vor. Diese Besonderheit von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz kann die gefundene DNA-Hypomethylierung gut erklären. Im Gegensatz dazu mag der Grund für die nicht nachweisbare genspezifische DNA-Hypomethylierung bei KHK-Patienten in der Vielfältigkeit der zur Erkrankung führenden Faktoren zu finden sein. Die Gewichtung der Risikofaktoren ist höchst komplex. Je höher die Zahl der Einflussfaktoren, desto schwieriger scheint die Etablierung eines weiteren Faktors durch Fall-Kontroll-Studien zu sein.

Ein epigenetischer Einfluss von p66^{Shc} konnte auch bei Betrachtung des Zusammenhanges zwischen Krankheitsausprägung und Methylierung nicht ausgemacht werden. Die DNA-Methylierung in p66^{Shc} konnte nicht als altersabhängig ermittelt werden und es bestand ebenfalls kein erklärbarer Unterschied zwischen Patienten mit 1-Gefäß-KHK und Patienten mit 3-Gefäß-KHK. Patienten mit zwei betroffenen Koronargefäßen zeigen eine abweichende Methylierung, die am ehesten durch die geringe Fallzahl zu erklären ist.

Ein besonders wichtiger Unterschied zur Arbeit von Post et al. ist die Tatsache, dass dort die Messung an direkt betroffenem Material vorgenommen wurde. Die Untersuchung analysiert u. a. Material aus rechtem Vorhof, Aorta, mittelgroßen Arterien und Venen, sowie aus Zellkulturen stammende Gefäßmuskelzellen und aortale Endothelzellen. Im Gegensatz dazu erfolgt hier die Ermittlung des Methylierungsniveaus aus Blutproben. Dies mag eine Erklärung dafür liefern, dass Post et al. ein Nachweis von epigenetischen Einflüssen bei Atherosklerose eher möglich gewesen ist. Die Ergebnisse von Geisel et al. bestätigen allerdings die Aussagekraft von Analysen bei aus peripheren mononuklearen Zellen isolierter DNA (34).

Obwohl zu Blutanalysen epigenetischer Veränderungen noch weitere Forschung notwendig sein wird, bieten sie die einzige Möglichkeit in diesem Zusammenhang Screeninguntersuchungen durchführen zu können (93), wie es bereits beim Screening auf das colorektale Karzinom möglich ist (s. u.) (63).

Während die Epigenetik im Rahmen der Atherosklerose einen großen Beitrag zum Verständnis der pathophysiologischen Abläufe liefern kann, ist der Einsatz der Erkenntnisse im therapeutischen Sinne noch nicht denkbar. Die zukünftigen Möglichkeiten werden allerdings erkennbar, wenn man sich die Studien zur Behandlung von Neoplasien betrachtet. Die Behandlung mit den Methylierungsinhibitoren Azacytidin und Decitabin zeigen erfolgversprechende Ergebnisse. Durchgeführte Phase II-Studien bei Patienten mit CML und auch bei Prostatakarzinom, Bronchialkarzinom und Ovarialkarzinom sind bereits erfolgt. Im Rahmen dieser Studien konnte die Wirksamkeit der eingesetzten Therapeutika bei einem geringen Nebenwirkungsspektrum gezeigt werden (92).

Die Untersuchungen bei Neoplasien zeigten eher gegenläufige Reaktionen von globaler DNA-Methylierung und Promotormethylierung. Während die globale DNA-Methylierung herabgesetzt scheint, führt eine vermehrte Methylierung im Promotorbereich von Tumorsuppressorgenen zu neoplasiebegünstigenden Veränderungen. Speziell bei colorektalen Karzinomen kann ein Einfluss von Einzelgenen angenommen und diagnostisch genutzt werden. Eine epigenetische Modifikation über Methylierung in der Promotorregion dieser

Gene führt zu einer Risikoerhöhung. Dies macht eine gezielte Diagnostik möglich. So konnten Lofton-Day et al. eine Untersuchung vorlegen, die die DNA-Methylierung von drei spezifischen Genabschnitten in ein erfolgreiches Screening zu colorektalen Karzinomen einbezieht. Diese epigenetischen Modifikationen werden neben vielen weiteren Faktoren untersucht (63). Weitere fünf epigenetische Biomarker konnten durch Han et al. beschrieben werden. Eine Entdeckung von colorektalen Karzinomen beruht hier auf der Messung von erhöhter oder verminderter Genexpression. Die Sensitivität von 94% und die Spezifität von 77% sind für eine diagnostische Anwendung ausreichend hoch (40).

Es sollte allerdings beachtet werden, dass wie bei Lofton-Day et al. gezeigt wurde, nur ein kleiner Teil der Pathogenese bei Karzinomen epigenetischen Einflüssen zugeordnet werden kann. Aber auch von solchen, die Epigenetik einbeziehenden, Risikoanalysen ist man bei der Atherosklerose noch weit entfernt.

Gerade im Rahmen der Atherosklerose bestehen immer noch zu wenige gesicherte Erkenntnisse. Die aktuelle Forschung dient in erster Linie der Klärung pathophysiologischer Zusammenhänge (72) und liefert Erkenntnisse zum Verständnis der Beeinflussung unseres Genoms durch Umwelteinflüsse. Die Versorgung, der Bedarf und die Sensitivität des Organismus wirken sich über DNA-Methylierung, Histon-Modifikation und Veränderung der Chromatinstruktur auf unser Genom aus. Die Vorstellung einer starren Basenstruktur gehört bereits lange der Vergangenheit an. Ein Beispiel für die Auswirkung von Umweltfaktoren zeigten Sinclair et al. in einer Untersuchung an Schafen. Die Nachkommen von bei der Konzeption im Bezug auf Folsäure mangelernährten Schafen zeigten nach Austragung der Blastozyste durch gesunde Tiere nach zwei Jahren ein höheres Gewicht mit größerem Fettanteil, eine veränderte Immunantwort, vermehrt Insulinresistenz, häufiger Hypertonie und einen veränderten Methylierungsstatus (97). In Zukunft besteht also die Chance diese Umwelt-Gen-Interaktion analysieren und besser verstehen zu können.

5.3. Methylierung in p66^{Shc}, Lipoproteinstoffwechsel und CRP

Wie in den beiden vorangegangenen Abschnitten der Diskussion bereits dargestellt, sind Homocystein und auch p66^{Shc} in die Regulation bzw. Vermittlung von oxidativem Stress und inflammatorischen Signalen eingebunden. Homocystein wird neben einer direkten Wirkung über die Entstehung von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) eine indirekte Wirkung über die epigenetische Herabregulation von antioxidativ wirkenden Genen zugeschrieben (78). Im Blutkreislauf kann es zur Autooxidation von Homocystein in Homocystin und H₂O₂ kommen. Es entsteht also oxidativer Stress. Die indirekte Wirkung scheint über die hemmende Wirkung auf Enzyme wie z. B. Glutathionperoxidase oder Superoxiddismutase zu verlaufen. Außerdem wird u. a. eine Verminderung der Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) diskutiert (96). Eine weitere Wirkung, die Homocystein zugeschrieben wird, ist die Förderung der Wirkung von 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase). HMG-CoA-Reduktase fördert die Cholesterinbiosynthese (60). Dies findet allerdings keine Bestätigung im Ergebnis meiner Analysen. Hier konnten erhöhte Homocysteinwerte sogar mit niedrigeren Werten für das Gesamtcholesterin korreliert werden, die aber mit einigen extremhohen Homocysteinwerten erklärt werden können.

Weitere Erkenntnisse zeigen für Homocystein auch eine epigenetische Herabregulation von PPARs (Peroxisome proliferators-activated receptors). Es handelt sich dabei um eine Gruppe von Rezeptoren, die eine Schlüsselrolle im Glukose- und Lipidstoffwechsel spielen. PPAR-Agonisten wie Fibrate können an diese Rezeptoren binden und anti-inflammatorische Effekte auslösen. Diese Agonist-Rezeptor-Bindung wird von Homocystein kompetitiv gehemmt, da es mit einer 10fach höheren Affinität an den PPARs binden kann (44). Diese Wirkung führt zur Dysregulation des Lipoproteinstoffwechsels. Es werden höhere Werte für LDL und niedrigere Werte für HDL gemessen (99). Diese Erkenntnisse sind im Einklang mit den Ergebnissen der aktuellen Untersuchung. Es besteht ein umgekehrt proportionaler Zusammenhang zwischen Homocystein und HDL-Cholesterin.

Im Bezug auf die H₂O₂-Produktion haben Homocystein und p66^{Shc} eine ähnliche Wirkung. Auch p66^{Shc} stimuliert direkt die mitochondriale H₂O₂-Produktion (36, 37). Eine weitere Wirkung von p66^{Shc} ist ein negativer Effekt auf die Signaltransduktionskaskade über die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK). Die MAPK-Kaskade führt bei übermäßigem zytotoxischem oder oxidativem Stress zur Apoptose der Zelle (71).

Ein anderer Faktor, der im Zusammenhang mit oxidativem Stress gesehen wird ist das HDL-Cholesterin. Auch für HDL ist eine Wirkung in der MAPK-Kaskade bekannt. Die Apoptose

wird durch HDL-Cholesterin allerdings begünstigt (38). In dieser speziellen Signaltransduktionskaskade scheinen p66^{Shc} und HDL entgegengesetzte Wirkungen zu haben. Diese Annahme konnte aus den Auswertungen meiner Ergebnisse nachvollzogen werden. Für HDL-Cholesterin konnte ein proportionaler Zusammenhang mit der Promotormethylierung von p66^{Shc} ermittelt werden. Dies bedeutet niedrige p66^{Shc}-Expression bei hohen HDL-Konzentrationen. Eine Erklärung für diese Korrelation kann allerdings nicht sicher gegeben werden. Die Regulation und Wirkungsvermittlung zwischen oxidativem Stress, HDL-Cholesterin und p66^{Shc}-Genexpression sind zu wenig untersucht um klare Schlüsse ziehen zu können. Sicher ist, dass es sich nicht um einen direkten Zusammenhang mit gegenseitiger Einflussnahme handelt, sondern wohl eher um die Einflüsse eines Systems von Signalen, in die p66^{Shc} und HDL eingebunden sind.

So beschreibt eine von Yasunari et al. eine Relation von oxidativem Stress zum CRP. Das CRP wird als Maß für den momentanen oxidativen Stress in Betracht gezogen (117) und ist ein Zeichen für Entzündungsaktivität. In der durchgeführten Untersuchung sinkt die HDL-Konzentration bei steigendem CRP, so dass sich bei hohen Entzündungswerten ein niedriges HDL zeigt.

Diese Korrelation zwischen HDL und CRP konnte bereits öfter beschrieben werden. So gelangten auch Kazumi et al. (53) zu vergleichbaren Ergebnissen. Folgt man der Überlegung, dass p66^{Shc} ein Gen mit fördernder Wirkung im Rahmen von oxidativem Stress und Entzündungsaktivität sein kann, so ist die nachgewiesene Korrelation zwischen hoher p66^{Shc}-Promotormethylierung, also geringer Genaktivität, und hoher HDL-Konzentration gut nachvollziehbar. Eine direkte Korrelation zwischen CRP, als Maß für den oxidativen Stress und der p66^{Shc}-Genaktivität besteht allerdings nicht, obwohl im Kontext der vorausgegangenen Diskussion ein solcher Zusammenhang durchaus plausibel wäre.

Bei all diesen Erkenntnissen sind die eigentlichen Mechanismen unbekannt. Ihre Erforschung könnte auch die Möglichkeit einer therapeutischen Beeinflussung bieten (5). Ungeachtet vieler offener Fragen besteht durchaus Potential für Interventionen, die ihre Wirkung über HDL-Cholesterin oder p66^{Shc}-Expression entfalten.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Ahuja N, Li Q, Mohan AL, Baylin SB, Issa JP (1998) Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. *Cancer Res* 58:5489-94
- 2 Antequera F, Bird A (1993) Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:11995-11999
- 3 Assmann G, Schulte H (1993) Results and conclusions of the Prospective Cardiovascular Münster (PROCAM) Study. In: Assmann G (ed) *Lipid Metabolism Disorders and Coronary Heart Disease*. MMV Medizin Verlag München. pp 19-68
- 4 Assmann G, Cullen P, Schulte H (2002) Simple Scoring scheme for Calculating the Risk of Acute Coronary Events Based on the 10-Year Follow-Up of the Prospective Cardiovascular Münster (PROCAM) Study. *Circulation* 105:310-315
- 5 Barter PJ, Brewer HB Jr, Tall AR (2003) Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 23:160-7
- 6 Baylin SB, Hoppener JW, de Bustros A, Steenbergh PH, Lips CJ, Nelkin BD (1986) DNA methylation patterns of the calcitonin gene in human lung cancers and lymphomas. *Cancer Res* 46:2917-22
- 7 Baylin SB, Hermann JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP (1998) Alteration in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res* 72:141-96
- 8 Bender CM, Gonzalgo ML, Gonzales FA, Nguyen CT, Robertson KD, Jones PA (1999) Roles of cell division and gene transcription in the methylation of CpG islands. *Mol Cell Biol* 19:6690-8

- 9 Biggs W.H. 3rd (2001) Identification and characterization of members of the FKHR (FOX O) subclass of winged-helix transcription factors in the mouse. *Mamm Genome* 12:416-425
- 10 Bird A (1992) The essentials of DNA methylation. *Cell* 70:5-8
- 11 Bonna KH, Njolstad I, Ueland PM, Schirmer H, Tverdal A, Steigen T (2006) Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 354:1578-88
- 12 Bonfimi L (1996) Not all Shc's roads lead to Ras. *Trends Biochem Sci* 21:257-261
- 13 Brattström L, Wilcken DE, Ohrvik J, Brudin L (1998) Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis. *Circulation* 98:2520-2526
- 14 Castro R (2003) Increased Homocysteine and S-Adenosylhomocysteine Concentrations and DNA Hypomethylation in Vascular Disease. *Clinical Chemistry* 49:1292–1296
- 15 Castro R, Rivera I, Martins C, de Almeida IT (2005) Intracellular S-adenosylhomocysteine increased levels are associated with DNA hypomethylation in HUVEC. *J Mol Med* 83:831-6
- 16 Cattaneo E, Pelicci PG (1998) Emerging roles for SH2/PTB-containing Shc adapter proteins in the developing mammalian brain. *Trends Neurosci* 21: 476-481
- 17 Chappey O, Dosquet C, Wautier MP, Wautier JL (1997) Advanced glycation end products, oxidant stress and vascular lesions. *Eur J Clin Invest* 27:97-108

- 18 Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M (1994) High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res* 22:2990-2997
- 19 Conti L (2001) Shc signaling in differentiating neural progenitor cells. *Nat Neurosci* 4:579-586
- 20 Cooper DN, Krawczak M (1989) Cytosine methylation and the fate of CpG dinucleotides in vertebrate genomes. *Hum Genet* 83:81-188
- 21 Cross SH, Bird AP (1995) CpG islands and genes. *Curr Opin Genet Dev* 5:309-314
- 22 Cupples LA, D'Agostino RB, Kiely D (1988) The Framingham Heart Study, Section 35: An epidemiological investigation of cardiovascular disease survival following cardiovascular events: 30 year follow-up. Bethesda, MD, National Heart, Lung, and Blood Institute
- 23 Dahlen GH, Guyton JR, Attar M (1986) Association of levels of lipoprotein Lp(a), plasma lipids, and other lipoproteins with coronary artery disease documented by angiography. *Circulation* 74:758-765
- 24 Danesh J, Lewington S (1998) Plasma homocysteine and coronary heart disease: systematic review of published epidemiological studies. *J Cardiovasc Risk* 5:229-32
- 25 Delgado S, Gomez M, Bird A, Antequera F (1998) Initiation of DNA replication at CpG islands in mammalian chromosomes. *EMBO J* 17:2426-2435
- 26 Djurovic S, Berg K (1997) Epidemiology of Lp(a) lipoprotein: Its role in atherosclerotic/thrombotic disease. *Clin Genet* 52:281-292
- 27 Dong C, Yoon W, Goldschmidt-Clermont PJ (2002) DNA Methylation and Atherosclerosis, *J Nutr* 132:2406-2409

- 28 El-Maarri O (2003) Methods: DNA methylation, *Adv Exp Med Biol* 544:194-204
- 29 El-Maarri O (2007) Gender specific differences in levels of DNA methylation at selected loci from human total blood: a tendency toward higher methylation levels in males. *Hum Genet* 122:505-14
- 30 Farrall M, Green FR, Peden JF, Olsson PG, Clarke R (2006) Genome-wide mapping of susceptibility to coronary artery disease identifies a novel replicated locus on Chromosome 17. *PLoS Genet* 2:e72
- 31 Frommer M (1992) A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1827
- 32 Gama-Sosa MA, Wang RY, Kuo KC, Gehrke CW, Ehrlich M (1983) The 5-methylcytosine content of highly repeated sequences in human DNA. *Nucleic Acids Res* 11:3087-3095
- 33 Geisel J, Hennen B, Hübner U, Knapp JP, Herrmann W (2003) The impact of Hyperhomocysteinemia as a Cardiovascular Risk Factor in the Prediction of Coronary Heart Disease. *Clin Chem Lab Med* 41:1513-1517
- 34 Geisel J, Schorr H, Heine G, Bodis M, Hübner U, Herrmann W (2007) Decreased p66Shc promoter Methylation in patients with end-stage renal disease. *Clin Chem Lab Med* 45:1764-70
- 35 Geisler JP, Manahan KJ, Geisler HE (2004) Evaluation of the DNA methylation in the human genome: Why examine it and what method to use. *Eur J Gynaec Oncol* 25:19-24

- 36 Giorgio M, Migliaccio E, Pelicci PG (2005) Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell* 122:221-33
- 37 Gresham J, Margiotta P, Wasilenko WJ (1998) Involvement of Shc in the signaling response of human prostate tumor cell lines to epidermal growth factor. *Int J Cancer* 77:923-7
- 38 Grewal T, de Diego I, Enrich C (2003) High density lipoprotein-induced signaling of the MAPK pathway involves scavenger receptor type BI-mediated activation of Ras. *J Biol Chem* 278:16478-81
- 39 Guevara NV, Kim HS, Antonova EI, Chan L (1999) The absence of p53 accelerates atherosclerosis by increasing cell proliferation in vivo. *Nat Med* 5:335-339
- 40 Han M, Liew CT, Zhang HW, Chao S, Zheng R, Yip KT, Song ZY, Li HM, Geng XP, Zhu LX, Lin JJ, Marshall KW, Liew CC (2008) Novel blood-based, five-gene biomarker set for the detection of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 14:455-60
- 41 Hayatsu H, Wataya Y (1970) Reaction of sodium bisulphite with uracil, cytosine and their derivatives. *Biochemistry* 9:2858
- 42 Herman JG, Latif F, Wenig Y, Lerman MI, Zbar B, Liu S (1994) Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:9700-4
- 43 Huang Y, Peng K, Wang S (2007) Different effects of homocysteine and oxidized low density lipoprotein on methylation status in the promoter region of the estrogen receptor alpha gene. *Acta Biochim Biophys Sin* 39:19-26

- 44 Hunt MJ, Tyagi SC (2002) Peroxisome proliferators compete and ameliorate Hcymediated endocardial endothelial cell activation. *Am J Physiol Cell Physiol* 283:1073-1079
- 45 Issa JP, Baylin SB, Hermann JG (1997) DNA methylation changes in hematologic malignancies: biologic and clinical implications. *Leukemia* 11:7-11
- 46 Issa JP (2005) Phase II Study of Low-Dose Decitabine in Patients with Chronic Myelogenous Leukemia Resistant to Imatinib Mesylate. *Journal of Clinical Oncology* 23:3948-56
- 47 Jones PA, Wolkowicz MJ, Rideout WM 3rd, Gonzales FA, Marziasz CM, Coetzee GA (1990) De novo methylation of MyoDI CpG islands during the establishment of immortal cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:6117-21
- 48 Jones PA, Laird PW (1999) Cancer epigenetics come of age. *Nat Genet* 21:163-7
- 49 Kalra DK (2004) Homocysteine and cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep* 6:101-6
- 50 Kanai Y, Ushijima S, Hui AM, Ochiai A, Tsuda H, Sakamoto M (1997) The E-cadherin gene silenced by CpG methylation in human hepatocellular carcinomas. *Int J Cancer* 71:355-9
- 51 Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H (1997) Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res* 57:808-11
- 52 Kazazain HH Jr, Goodier JL (2002) LINE drive. Retrotransposition and genome instability. *Cell* 110:277-280

- 53 Kazumi T, Kawaguchi A, Hirano T, Yoshino G (2003) C-reactive protein in young, apparently healthy men: associations with serum leptin, OTc interval, and high-density lipoprotein-cholesterol. *Metabolism* 52:1113-6
- 54 Klerk M, Verhoef P, Clarke R (2002) MTHFR 677C→T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *JAMA* 288: 2023–2031
- 55 Kok RM, Smith DE, Barto R (2007) Global DNA methylation measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: analytical technique, reference values and determinants in healthy subjects. *Clin Chem Lab Med* 45:903-911
- 56 Kullo IJ, Gau GT, Tajik AJ (2000) Novel risk factors for atherosclerosis. *Mayo Clin Proc* 75:369-80
- 57 Laukkanen MO, Mannermaa S, Hiltunen MO, Aittomaki S, Airenne K, Janne J, Yla-Herttuala S (1999) Local hypomethylation in atherosclerosis found in rabbit ec-sod gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:2171-2178
- 58 Li E, Bestor TH, Jaenisch R (1992) Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69:915-926
- 59 Li E, Beard C, Jaenisch R (1993) Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 366:362-365
- 60 Li H, Lewis A, Brodsky S, Rieger R, Iden C, Goligorsky MS (2002) Homocysteine Induces 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase in Vascular Endothelial Cells. *Circulation* 105:1037-1043
- 61 Liu C, Wang Q, Guo H, Xia M, Yuan Q, Hu Y, Zhu H, Hou M, Ma J, Tang Z, Ling W (2008) Plasma S-Adenosylhomocysteine Is a Better Biomarker of Atherosclerosis Than Homocysteine in Apolipoprotein E-Deficient Mice Fed High Dietary Methionine. *J Nutr* 138:311-315

- 62 Lodish H (eds) (2001) Molekulare Zellbiologie, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg-Berlin Gustav Fischer, 4. Auflage, pp 269-271
- 63 Lofton-Day C, Model F, Devos T, Tetzner R, Distler J, Schuster M, Song X, Lesche R, Liebenberg V, Ebert M, Molnar B, Grüntzmann R, Pilarsky C, Sledziewski A (2008) DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening. *Clin Chem* 54:414-23
- 64 Lonn E, Yusuf S, Arnold MJ, Sheridan P, Pogue J, Micks M (2006) Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. *N Engl J Med* 354:1567-77
- 65 Luzi L (2000) Evolution of Shc functions from nematode to human. *Curr Opin Genet Dev* 10:668-674
- 66 Malinow MR (1995) Plasma Homocyst(e)ine and Arterial Occlusive Diseases: A Mini-Review. *Clinical Chemistry* 41:173-176
- 67 Marenberg ME, Risch N, Berkman LF, Floderus B, de Faire U (1994) Genetic Susceptibility to Death from Coronary Heart Disease in a Study of Twins. *N Engl J Med* 330:1041-6
- 68 Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC (1995) 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumor suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med* 1:686-92
- 69 Migliaccio E (1997) Opposite effects of the p52^{Shc}/p46^{Shc} and p66^{Shc} splicing isoforms on the EGF receptor-MAP kinase-fos signalling pathway. *EMBO J* 16:706-716
- 70 Migliaccio E (1999) The p66^{Shc} adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature* 402:309-313

- 71 Migliaccio E, Giorgio M, Pelicci PG (2006) Apoptosis and aging: role of p66Shc redox protein. *Antioxid Redox Signal* 8:600-8
- 72 Miller DT, Ridker PM, Libby P, Kwiatkowski DJ (2007) Atherosclerosis-The Path From Genetics to Therapeutics. *J Am Coll Cardiol* 49:1589-99
- 73 Napoli C, Martin-Padura I, Pelicci PG (2003) Deletion of the p66^{Shc} longevity gene reduces systemic and tissue oxidative stress, vascular cell apoptosis, and early atherogenesis in mice fed a high-fat diet. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 2112-2116
- 74 Nemoto S, Combs CA, Finkel T (2006) The Mammalian Longevity-associated Gene Product p66Shc Regulates Mitochondrial Metabolism, *J Biol Chem* 281:10555-60
- 75 Okada S (1997) The 66 kDA Shc isoform is a negative regulator of the epidermal growth factor-stimulated mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 272:28042-28049
- 76 Orsini F, Migliaccio E, Pelicci PG (2004) The Life Span Determinant p66Shc Localizes to Mitochondria where It Associates with Mitochondrial Heat Shock Protein 70 and Regulates Trans-membrane Potential. *J Biol Chem* 279:25689-25695
- 77 Panning B, Jaenisch R (1998) RNA and the epigenetic regulation of X chromosome inactivation. *Cell* 93:305-308
- 78 Perna AF, Ingrosso D, De Santo NG (2003) Homocysteine and oxidative stress. *Amino Acids* 25:409-17
- 79 Perna AF, Luciano MG, Pulzella P, Capasso R, Lombardi C, Ingrosso D, De Santo NG (2008) Is homocysteine toxic in uremia? *J Ren Nutr* 18:12-17

- 80 Post WS, Goldschmidt-Clermont PJ, Wilhide CC, Heldman AW, Sussman MS, Ouyang P, Milliken EE, Issa JPJ (1999) Methylation of the estrogen receptorgene is associated with aging and atherosclerosis in the cardiovascular system. *Cardiovascular Research* 43:985-991
- 81 Purdom S, Chen M (2003) p66^{Shc}: at the crossroad of oxidative stress and the genetics of aging. *TRENDS in Molecular Medicine* 9:206-210
- 82 Refsum H, Ueland PM, Nygard O, Vollset SE (1998) Homocysteine and cardiovascular disease. *Ann Rev Med* 49:31-62
- 83 Renz-Polster H, Krautzig S, Braun J (eds) (2004) *Basislehrbuch Innere Medizin*, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag München Jena, 3. Auflage, pp 65-75
- 84 Richardson B (2003) Impact of aging on DNA methylation. *Aging Res Rev* 2:245-61
- 85 Rideout WMI, Coetzee GA, Olumi AF, Jones PA (1990) 5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes. *Science* 249:1288
- 86 Ridker PM (1999) Evaluating novel cardiovascular risk factors: Can we better predict heart attacks? *Ann Intern Med* 130:933-937
- 87 Ridker PM, Strampfer M, Rifai N (2001) Novel risk factors for systematic atherosclerosis: a comparison of c-reactive protein, fibrinogen, homocystein, lipoprotein(a) and standard cholesterol screening. *JAMA* 285:2481-5
- 88 Rodriguez-Campos A, Ruiz-Enriquez P, Faraudo S, Badimon L (2001) Mitogen-induced p53 downregulation precedes vascular smooth muscle cell migration from healthy tunica media and proliferation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:214-219

- 89 Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlen M, Nyren P (1996) Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release, *Anal Biochem* 242:84-89
- 90 Ross R, Glomset JA, Harker L (1977) Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol* 86:675-84
- 91 Sakai T, Toguchida J, Ohtani N, Yandele DW, Rapaport JM, Dryja TP (1991) Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Am J Hum Genet* 48:880-8
- 92 Santini V, Kantarjian HM, Issa JP (2001) Changes in DNA Methylation in Neoplasia: Pathophysiology and Therapeutic Implications. *Ann Intern Med* 134:573-586
- 93 Seo D, Ginsburg GS, Goldschmidt-Clermont PJ (2006) Gene Expression Analysis of Cardiovascular Diseases - Novel Insights Into Biology and Clinical Applications. *J Am Coll Cardiol* 48:227-35
- 94 Shapiro R, DiFate V, Welcher M (1974) Deamination of cytosine derivatives by bisulphite. Mechanism of the reaction. *J Am Chem Soc* 96:906-12
- 95 Shapiro R, Cohen BI, Servis RE (1970) Specific deamination of RNA by sodium bisulphite. *Nature* 227:1047-8
- 96 Sharma P, Senthilkumar RD, Brahmachari V, Sundaramoorthy E, Mahajan A, Sharma A, Sengupta S (2006) Mining literature for a comprehensive pathway analysis: A case study for retrieval of homocysteine related genes for genetic and epigenetic studies. *Lipids in Health and Disease* 5:1
- 97 Sinclair KD (2007) DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptional B vitamin and methionine status. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:19351-6

- 98 Song Y, Stampfer MJ, Liu S (2004) Meta-analysis: apolipoprotein E genotypes and risk for coronary heart disease. *Ann Intern Med* 141:137-47
- 99 Staels B, Dallongeville J, Auwerx J, Schoonjans K, Leitersdorf E, Fruchart JC (1998) Mechanism of Action of Fibrates on Lipid and Lipoprotein Metabolism. *Circulation* 98:2088-2093
- 100 Stanger O, Herrmann W, Pietrzik K, Fowler B, Geisel J, Dierkes J, Weger M (2003) DACH-LIGA Homocystein e.V., DACH-LIGA homocystein (german, austrian and swiss homocystein society): consensus paper on the rational clinical use of homocysteine, folic acid and B-vitamins in cardiovascular and thrombotic diseases: guidelines and recommendations. *Clin Chem Lab Med* 41:1392-403
- 101 Statistisches Bundesamt (2005) Todesursachen in Deutschland – Fachserie 12 Reihe 4
- 102 Tazi J, Bird A (1990) Alternative chromatin structure at CpG islands. *Cell* 60:909-920
- 103 Toole JF, Malinow MR, Chambless LE, Spence JD, Petigrew LC, Howard VJ (2004) Lowering homocysteine in patients with ischemic stroke to prevent recurrent stroke, myocardial infarction, and death: the Vitamin Intervention for Stroke Prevention (VISP) randomized controlled trial. *J Am Med Assoc* 291:565-75
- 104 Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP (1999) CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:8681-6
- 105 Ugi S (2002) Phosphatidylinositol 3-kinase is required for insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of Shc in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 277:18592-18597

- 106 Uhlmann K, Brinckmann A, Toliat MR, Ritter H, Nurnberg P (2002) Evaluation of a potential epigenetic biomarker by quantitative methyl-single nucleotide polymorphism analysis. *Electrophoresis* 23:4072-4079
- 107 van der Westhuyen J (1985) Methionine metabolism and cancer. *Nutr cancer* 7:179-83
- 108 Ventura A, Luzi L, Pacini S, Baldari CT, Pelicci PG (2002) The p66^{Shc} Longevity Gene is silenced through Epigenetic Modifications of an Alternative Promoter. *The Journal of Biological Chemistry* 227:22370-22376
- 109 Wald DS, Law M, Morris JK (2002) Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *Br Med J* 325:1202-8
- 110 Walsh CP, Chaillet JR, Bestor TH (1998) Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nat Genet* 20:116-117
- 111 Wang X, Qin X, Demirtas H, Li J, Mao G, Huo Y (2007) Efficacy of folic acid supplementation in stroke prevention: a meta-analysis. *Lancet* 369:1876-82
- 112 Worthley SG (2001) Coronary Artery Disease: Pathogenesis and Acute Coronary Syndromes. *The Mount Sinai Journal of Medicine* 68:167-81
- 113 Xiong Z, Laird PW (1997) COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res* 25:2532-2534
- 114 Yang AS, Estecio MRH, Doshi K, Kondo Y, Tajara EH, Issa JPJ (2004) A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Research* 32:e38
- 115 Yang AS, Doshi K, Choi SG, Mason JB, Mannari RK, Gharybian V, Luna R, Rashid A, Shen L, Estecio MRH, Kantarjian HM, Garcia-Manero G, Issa JP (2006) DNA Methylation Changes after 5-Aza-2'-Deoxycytidine Therapy in Patients with Leukemia. *Cancer Res* 66:5495-503

- 116 Yang Q, Botto LD, Erickson JD, Berry RJ, Sambell C, Johansen H (2006) Improvement in stroke mortality in Canada and the United States, 1990 to 2002. *Circulation* 113:1335-43
- 117 Yasunari K, Maeda K, Nakamura M, Yoshikawa J (2002) Oxidative Stress in Leukocytes Is a Possible Link Between Blood Pressure, Blood Glucose, and C-Reacting Protein. *Hypertension* 39:777-780
- 118 Yi P, Melnyk S, Pogribna M, Pogribny I, Jean Hine R, Jill James S (2000) Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation. *J Biol Chem* 275:29318-23

7. Danksagung

Die Fertigstellung dieser Arbeit hat mehr als vier Jahre gedauert. Trotz aller Mühen überwog immer der Stolz und die Freude über das Geleistete. Da dies ohne Hilfe Anderer nie möglich gewesen wäre, gebührt verschiedenen Personen Dank.

Ich bedanke mich bei Frau Marion Bodis, Frau Claudia Teunis, Herrn Dr. Ullrich Hübner und Herrn Prof. Dr. Jürgen Geisel für die Hilfe und die stete Bereitschaft zur konstruktiven Diskussion.

Ich danke darüber hinaus den Menschen, ohne die ich nicht wäre wie ich bin: meinen Eltern und Großeltern, denen diese Arbeit gewidmet ist.

Während meines Studiums kreuzten einige Menschen meinen Weg, deren Unterstützung ich fand, die mich beeinflusst und glücklich gemacht haben. Ich stehe nicht wenig in deren Schuld. Danke an alle von ihnen. Ich wünsche euch eine großartige Zukunft.

Steffen Roß

8. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Steffen Roß
geboren am 28. Mai 1980 in Pirmasens

Schulbildung:

1986-1990 Grundschule Wittelsbach Pirmasens
1990-1999 Leibniz-Gymnasium Pirmasens

Berufsausbildung:

1999-2002 Ausbildung zum Bankkaufmann bei der
 Stadtparkasse Kaiserslautern
Febr. -Sept. 2002 Bankkaufmann bei der Stadtparkasse
 Kaiserslautern

2002-2008 Studium der Humanmedizin an der
 Universität des Saarlandes Homburg/Saar
15.06.2005 Antrag auf Aufnahme in die
 Promotionsliste
18.11.2008 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03.12.2008 Erteilung der Approbation als Arzt

ab 01.01.2009 Assistenzarzt der Radiologie am
 Luzerner Kantonsspital (CH)
 Chefarzt: Prof. Dr. B. Allgayer

Pflegepraktika:

Städtisches Krankenhaus Pirmasens
Pädiatrische Station und Station für Innere Medizin mit
Schwerpunkt Kardiologie

Famulaturen:

Universitätskliniken des Saarlandes
Klinik für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie
Direktor: Prof. Dr. D. Kohn

Universitätskliniken des Saarlandes
Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie
Direktor: Prof. Dr. T. Pohlemann

Praxis für Diagnostische und Interventionelle Radiologie und
Nuklearmedizin Pirmasens
Prof. Dr. R. Kubale

Universitätskliniken des Saarlandes
Abteilung für Diagnostische und Interventionelle Radiologie
Direktor: Prof. Dr. A. Bücker

Praktisches Jahr:

Universitätskliniken des Saarlandes - Innere Medizin V
Robert-Koch-Klinik für Pneumologie
Direktor: Prof. Dr. G. W. Sybrecht

Universitätskliniken des Saarlandes – Innere Medizin III
Klinik für Kardiologie und Angiologie
Direktor: Prof. Dr. M. Böhm

Luzerner Kantonsspital (CH)
Röntgeninstitut
Chefarzt: Prof. Dr. B. Allgayer

Universitätskliniken des Saarlandes
Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie
Direktor: Prof. Dr. T. Pohlemann

Universitätskliniken des Saarlandes
Klinik für Thorax- und Herz-Gefäßchirurgie
Direktor: Prof. Dr. H.-J. Schäfers