

Funktionelle Auswirkungen des (T-159C)-Polymorphismus im Promotor des CD14-
Gens von Monozyten

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Mathias Reyher
aus Rheine

Gießen, im Jahr 2001

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik I

Leiter: Prof. Dr. H. Tillmanns
des Universitätsklinikums Gießen

Gutachter: Prof. Dr.W. Haberbosch

Gutachter: Prof. Dr.G. Bein

Tag der Disputation: 12. August 2002

Für Katja und Tim

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	2
1.1 Einführung in das Thema und Fragestellung	2
1.2 Genetik	3
1.3 Atherosklerose und akute Koronarsyndrome	6
1.4 Das CD14-Antigen	9
1.5 Lipopolysaccharid-aktivierte Genprodukte	13
2 Materialien und Methoden	16
2.1 Materialien, Chemikalien und Laborgeräte	16
2.2 Methoden	19
3 Ergebnisse	35
3.1 Verteilung der Genotypen und Merkmale	35
3.2 Meßergebnisse und statistische Analyse	37
4 Diskussion	58
5 Zusammenfassung	67
6 Abkürzungsverzeichnis	69
7 Literatur	71
Lebenslauf	90
Danksagung	91

1 Einleitung

1.1 Einführung in das Thema und Fragestellung

Monozyten reagieren als Effektorzellen der unspezifischen Immunabwehr [Kirchner 79] auf eine Stimulierung durch bakterielles Endotoxin (Lipopolysaccharid, LPS) mit einer Synthese proinflammatorischer und prokoagulatorischer Mediatoren [O'Brien und McVey 111, Wang 159]. Lipopolysaccharid wird im Rahmen dieser Aktivierungsreaktion über ein membranverankertes Rezeptorprotein (mCD14) auf Monozyten gebunden [Wright 163]. Die Expression von CD14 wird durch das CD14-Gen transkriptional kontrolliert. Im Promotor dieses Gens wurde kürzlich ein (T-159C)-Polymorphismus beschrieben. Homozygotie für das T-Allel konnte dabei als unabhängiger Risikofaktor für Myokardinfarkte identifiziert werden [Unkelbach 153].

Nachdem Saikko et al. aufgrund seroepidemiologischer Studien die Diskussion über Chlamydia pneumoniae-assoziiertes koronares Herzkrankheit (KHK) initiierten [Saikko 128] und Chlamydien in den Gefäßen von Herzkranken nachgewiesen werden konnten [Muhlestein 99], spekuliert man derzeit über einen Zusammenhang zwischen diesem gramnegativen Bakterium und KHK. Ergebnissen von In-Vitro-Untersuchungen zufolge paßt eine Gefäßläsion, bedingt durch C. pneumoniae, in das aktuelle Konzept der Atheroskleroseentstehung [Essig 42].

Proinflammatorische Mediatoren, die durch eine bakterieninduzierte Monozytenaktivierung freigesetzt werden, scheinen an der Atherogenese und den akuten Koronarsyndromen beteiligt zu sein [Kane und Havel 75]. Das Gerinnungsprotein Tissue Factor, das ebenfalls durch LPS-exponierte Monozyten vermehrt freigesetzt wird, ist im Rahmen dieser akuten Koronarsyndrome mit dem Erscheinungsbild der Koronarthrombose nach einer Plaqueruptur assoziiert [Fuster 52, Marmur 93, Toschi 152].

Dabei könnte die unterschiedliche Expression dieser möglicherweise proatherogenen bzw. prothrombotischen Substanzen durch die Zellen prädiktorisch wirken.

Die vorliegende Studie sollte klären, ob der (T-159C)-Genpolymorphismus im Promotor des CD14-Gens sich allelabhängig im Sinne einer stärkeren bzw. schwächeren proinflammatorischen und prokoagulatorischen Reaktion von Monozyten auf eine LPS-Stimulierung auswirkt. Dazu wurden die Sekretion der entzündungsfördernden Cytokine Tumornekrosefaktor- α und Interleukin-6 sowie die Expression des Gerinnungsproteins Tissue

Factor bei kultivierten, genotypisierten Monozyten in Ruhe und nach LPS-Stimulation gemessen.

1.2 Genetik

1.2.1 Polymorphismen im menschlichen Genom

Ein Gen kann polymorph sein, die verschiedenen Versionen nennt man Allele. Allele eines Gens weichen in ihrer Nucleotidsequenz nur minimal voneinander ab, können aber funktionelle Unterschiede ihrer Genprodukte zur Folge haben [Brown 27].

Alle autosomalen Gene liegen paarweise vor. Dies erklärt sich durch die Tatsache, daß die meisten Zellen diploid sind. Die homologen Chromosomen (23 väterliche und 23 mütterliche Chromosomen [Strachan und Read 148]) stimmen sowohl in Zahl und Anordnung ihrer Banden als auch in Zahl und Anordnung ihrer Gene überein [Murken und Cleve 105]. Das bedeutet, daß jede Zelle zwei Kopien eines jeden Chromosoms und damit zwei Kopien jedes Gens enthält [Brown 27]. Dadurch besitzt eine Person an jedem autosomalen Locus zwei Allele – eines vom Vater und eines von der Mutter [Stary 147]. Man bezeichnet den Träger eines Gens als heterozygot, wenn er zwei verschiedene Allele dieses Gens besitzt, als homozygot, wenn er zweimal das gleiche Allel besitzt [Brown 27].

Ein genetischer Polymorphismus ist durch das gleichzeitige Vorkommen verschiedener erblicher Formen eines Merkmals bei Gesunden definiert. Die dafür kodierenden Allele weisen Häufigkeiten auf, die durch rekurrierende Mutationen nicht erklärt werden können [Murken und Cleve 105].

1.2.2 Gen-Promotor

Der Promotor eines Gens ist eine kurze Nucleotidsequenz eines DNA-Moleküls, innerhalb derer zu Beginn des Transkriptionsvorganges als erster Schritt in der Genexpression von einer RNA-Polymerase eine DNA-Bindungsstelle erkannt wird [Brown 27]. Dieser Prozeß wird durch Transkriptionsfaktoren erleichtert, die ebenfalls Bindungsstellen im Bereich des Promotors haben. Der Promotor liegt am 5`-Ende eines Gens – oft weniger als 200

Basenpaare von der Transkriptionsstartstelle entfernt [Strachan und Read 148]. Promotoren regulieren durch ihre spezifische Sequenz das Ausmaß der Genexpression.

Auch im Promotorbereich wurden Genpolymorphismen gefunden. Solche Promotorpolymorphismen sind dann allerdings nicht mit Proteinpolymorphismen gekoppelt, das heißt, eine Änderung in der Promotorsequenz wirkt sich nicht auf die Struktur und die Funktion der zu synthetisierenden Proteine aus. Ein Promotorpolymorphismus aber kann sich auf die Frequenz der Genexpression und damit auf das Ausmaß der Proteinsynthese auswirken [Brown 27].

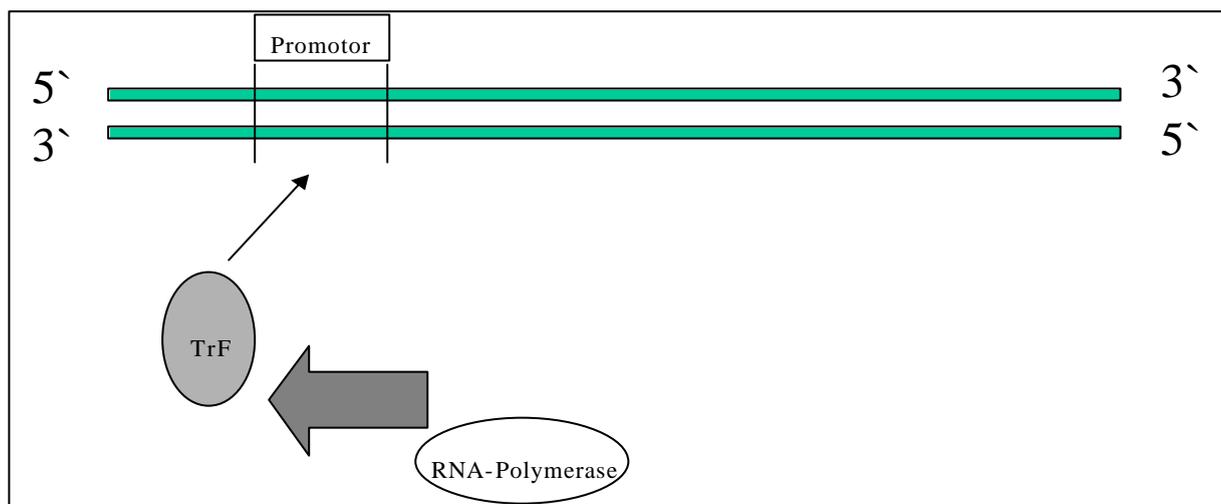


Bild 1.2.2: Transkriptionsfaktoren (TrF) müssen an eine Promotorsequenz direkt neben einem Gen binden, um die RNA-Polymerase, die das Gen transkribieren soll, anschließend an die richtige Stelle zu bringen und zu leiten.

1.2.3 Der (T-159C)-Polymorphismus im Promotor des CD14-Gens

Unkelbach und Koautoren [153] analysierten in ihrer Studie das CD14-Gen von 20 gesunden Blutspendern mittels einer SSCP- (single strand conformation polymorphism) Analyse. Bei dem Screening wurden dabei zwei Varianten in der Promotorsequenz des CD14-Gens identifiziert, die sich an Position -159 durch das Auftreten der Basen Thymin bzw. Cytosin unterschieden. Anschließend wurden 2228 Patienten der Gießener Universitätsklinik genotypisiert und in die Gruppen ⁻¹⁵⁹C (CC) bzw. ⁻¹⁵⁹T (TT) homozygot und C/T (CT) heterozygot eingeteilt. Diese Genotypisierung wurde den Koronarangiographieergebnissen der Patienten und ihrer Krankengeschichte bezüglich koronarer Ereignisse zugeordnet und damit eine mögliche Beziehung zwischen CD14-Polymorphismus und koronaren bzw.

myokardialen Ereignissen gesucht. Dabei konnte innerhalb einer Subgruppe (Patientenalter > 62 Jahre und niedriges Infarkttrisikoprofil) eine positive Assoziation zwischen homozygoter T-Allelie (TT) und Myokardinfarkten beobachtet werden. Der CD14-Polymorphismus wurde anschließend als unabhängiger Risikofaktor für Myokardinfarkte beschrieben [Unkelbach 153].

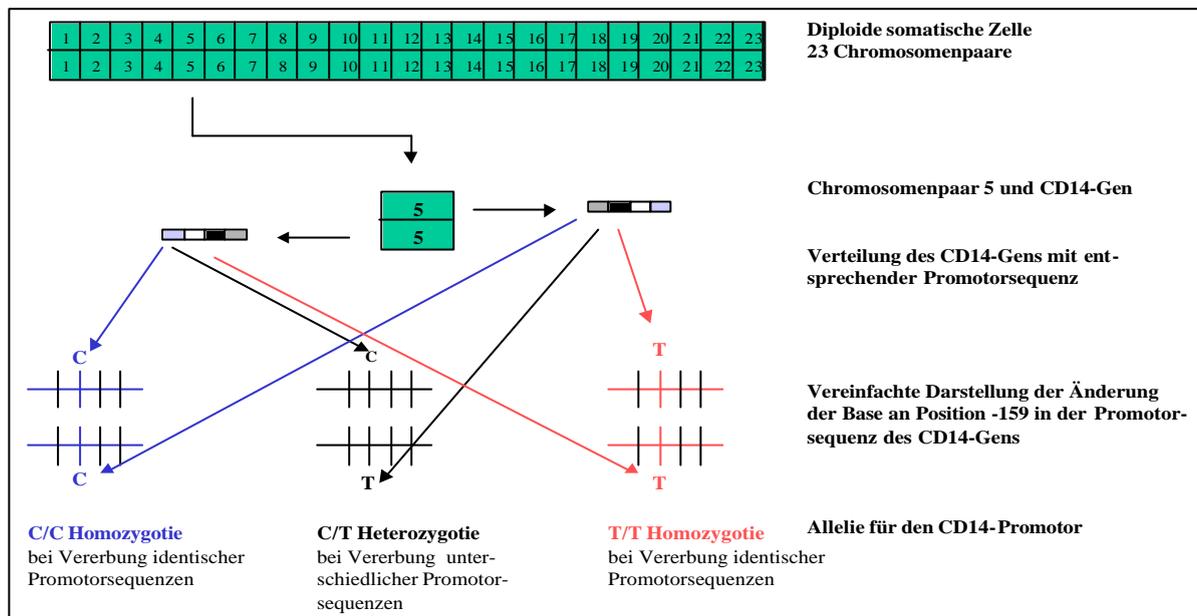


Bild 1.2.3: Vereinfachte Darstellung des (T-159C)-Polymorphismus im Promotor des CD14-Gens

Unabhängig von den bekannten Risikofaktoren für Myokardinfarkte wie Hyperlipidämie, Hypertension, Adipositas, Bewegungsmangel, Streß, Diabetes mellitus und Rauchen scheinen also weitere Faktoren bei der Ätiologie der Atherosklerose und der ischämischen Herzkrankheit eine Rolle zu spielen [Meier 98].

1.3 Atherosklerose und akute Koronarsyndrome

1.3.1 Pathogenese

Die koronare Atherosklerose ist ein über Jahrzehnte fortschreitender Prozeß, der durch die Bildung atherosklerotischer Plaques in der Gefäßintima zu strukturellen Veränderungen der Koronargefäße mit dem klinischen Bild der koronaren Herzkrankheit (KHK) führt.

In Anlehnung an das Komitee für Gefäßläsionen der American Heart Association (AHA) wird die Entstehung atherosklerotischer Plaques in fünf Phasen eingeteilt [Fuster 50, Fuster 51]. Jede Phase ist dabei durch morphologische Charakteristika gekennzeichnet [Fuster 50, Stary 147]. In der Phase 1 wird die Typ I-Läsion durch Schichten von Makrophagen oder Schaumzellen gebildet. Diese Zellen haben ihren Ursprung in aktivierten, zirkulierenden Monozyten, die über Adhäsionsmoleküle in die Gefäßwand migrieren und sich dort zunächst zu Makrophagen differenzieren [Fuster 52, Gerrity 56]. Geweberesidente Makrophagen nehmen an der Aufnahme und dem Metabolismus von Lipiden teil [Fuster 48], der die Zellen in Schaumzellen verwandelt [Fuster 52]. Diese Prozesse sind entscheidend für die Entwicklung von so- genannten „fatty streaks“, die bereits bei der Obduktion von Kindern gesehen werden können [Stary 146]. Dabei handelt es sich um Ansammlungen von lipidreichen Makrophagen und T-Lymphozyten innerhalb der Intima, die bei der Betrachtung der Gefäßinnenseite als gelbe Flecken imponieren. Aus diesen „fatty streaks“ entwickeln sich schließlich über fortgeschrittene Läsionen mit proliferierten glatten Muskelzellen und Makrophagen die sehr komplexen atherosklerotischen Plaques [Fuster 48, Gerrity 56]. Neben der Lipidaufnahme agieren Makrophagen nicht nur als antigenpräsentierende Zellen für T-Lymphozyten, sie sind auch zur Synthese verschiedener Mediatoren fähig, vor allem proinflammatorischer Cytokine [Ross 127] und prokoagulatorischer Faktoren [Eijnden van den 41]. Makrophagen sind die wichtigsten entzündungsmediatorproduzierenden Zellen in atheromatösen Plaques [Ross 127]. Die Typ II-Läsion in der Phase 1 der Atherosklerose besteht dann aus Makrophagen und glatten Gefäßmuskelzellen mit extrazellulärer Lipidablagerung. Typ III der Gefäßwandveränderung ist zum größten Teil aus glatten Gefäßmuskelzellen und Lipiden, die die Zellen extrazellulär umgeben, zusammengesetzt.

Die Phase 2 der Atherosklerose besteht aus einem Plaque, der nicht zwangsläufig stenotische Eigenschaften besitzt, der allerdings aufbrechen kann. Solch ein Plaque charakterisiert morphologisch die Läsionen Typ IV und Va. Aus der Phase 2 können sich dann die akuten Phasen 3 (Folge: Stabile Angina Pectoris) und 4 (Folge: Akutes Koronarsyndrom:

Myokardinfarkt, instabile Angina Pectoris, plötzlicher ischämischer Herztod) entwickeln. Phase 3 ist dabei durch einen muralen Thrombus bedingt, der das Gefäßlumen nicht komplett okkluiert. Phase 4 ist die Folge einer Plaqueruptur aufgrund von Einrissen in der bindegewebigen Plaquekapsel mit intramuralen Blutungen, Exposition von thrombogenen subendothelialen Substanzen zum Blutstrom und Bildung eines okkludierenden Thrombus durch Aktivierung zirkulierender Thrombozyten. Dies führt letztendlich zu einer völligen Verlegung des Gefäßlumens [Davies und Thomas 35]. Durch weiteres Wachsen des muralen Thrombus der Phase 3 kann es ebenfalls zu einer kompletten Verlegung des Arterienlumens kommen. Ein solcher Gefäßverschluß kennzeichnet die Phase 5 der Atherosklerose [Fuster 51].

1.3.2 Atherosklerose, koronare Herzkrankheit und Chlamydia pneumoniae

Bakterielle Infektionen scheinen eine Rolle bei der Initiierung, der Progression oder der Destabilisierung von atherosklerotischen Plaques zu spielen [Muhlestein 100].

Verschiedene epidemiologische und experimentelle Studien zeigen, daß ein Zusammenhang zwischen gramnegativen Chlamydien (*C. pneumoniae*) und gefäßverändernden Prozessen wahrscheinlich ist [Arbustini 6, Boer de 22, Fortini 47, Gurfinkel und Bozovich 60, Kaykov 77, Ouchi 120, Saikkun 128, Saikku 129, Saikku 130, Saikku 131, Saikku 132, Varveri 154].

Das vasotrope Bakterium führte in einem Tiermodell zu Atherosklerose und konnte in humanem Atherom nachgewiesen werden [Anderson 3, Jantos 73, Muhlestein 101, Muhlestein 103, Ramirez 124].

Für die chlamydiengetriggerte Atherogenese existieren zwei Denkmodelle:

1) *C. pneumoniae* kolonisiert direkt die Gefäßwand und führt dadurch direkt oder indirekt über immunologische Reaktionen zu einem Wandschaden. 2) Eine chronische Infektion erhöht zusätzlich die durch Standardrisikofaktoren (z.B. Hyperlipidämie) erhöhten inflammatorischen Reaktionsparameter [Muhlestein 100, Muhlestein 102].

Pathogenetisch würde eine *C. pneumoniae*-bedingte Gefäßläsion gut in das Konzept der Atheroskleroseentstehung passen, dem die sogenannte „response to injury“-Theorie von R. Ross [Ross 127] zugrunde liegt [Essig 42]. Demnach ist die Entstehung atherosklerotischer Läsionen die Folge einer chronisch-inflammatorischen Reaktion der Gefäßwand nach primärer Schädigung des Endothels und der glatten Muskelzellen durch verschiedene Noxen. In-Vitro-Untersuchungen belegen, daß *C. pneumoniae* mit Endothelzellen, glatten

Muskelzellen und Makrophagen prinzipiell alle relevanten Zelltypen humaner Gefäße infizieren kann und daß die betroffenen Zellen mit einer Freisetzung von proinflammatorischen Cytokinen, Wachstumsfaktoren und vermehrter Expression prothrombotischer Stimuli reagieren [Dechend 37, Heinemann 64, Netea 109]. Infizierte Monozyten werden als Carrier (Vehikel) angesehen, mit deren Hilfe sich Chlamydien theoretisch in Gefäßwänden absiedeln können [Essig 42]. Schließlich konnte gezeigt werden, daß *C. pneumoniae* eine Schaumzellbildung induzieren kann, was als Schlüsselereignis der frühen Atherosklerose gilt [Essig 42, Kalayoglu 74].

Ein geeigneter diagnostischer Marker, der eine extrapulmonale (vaskuläre) *C. pneumoniae*-Infektion zuverlässig erfaßt, fehlt allerdings bisher ebenso wie eine Empfehlung für die Antibiotikabehandlung der mit *C. pneumoniae* assoziierten KHK [Essig 42].

1.3.3 Atherosklerose, Tissue Factor und proinflammatorische Cytokine

Die akuten Koronarsyndrome sind auf eine Plaqueentstehung mit muralem Thrombuswachstum und eine Plaqueinstabilität und -ruptur mit folgender Thrombusformation zurückzuführen [Depre 38, Fuster 48, Fuster 51, Shah 143]. Sowohl für die Atherogenese als auch für die Plaqueinstabilität und -ruptur werden inflammatorische Prozesse via Entzündungsmediatoren verantwortlich gemacht [Biasucci 16, Biasucci 17, Boyle 25, Davies und Thomas 36, Fuster 49, Kane und Havel 75, Libby 83].

Interleukin-6 ist der Hauptinduktor der Akut-Phase-Reaktion in der Leber [Biasucci 18, Libby 84]. Erhöhte Konzentrationen von Mediatoren der Akut-Phase-Reaktion wie C-reaktives Protein und aktivierte zirkulierende Entzündungszellen konnten im Serum klinisch auffälliger Patienten mit akuten Koronarsyndromen ebenso identifiziert werden wie auch inflammatorische Zellen und Entzündungsmarker in atherosklerotischen Plaques [Biasucci 18, Liuzzo 86, Manton 89]. In den „fatty streaks“ atheromatöser Plaques exprimieren Makrophagen und glatte Muskelzellen IL-6, das die Aktivität der Lipoproteinlipase herabsetzt, wodurch die Lipidaufnahme durch Makrophagen gesteigert wird [Yudkin 167].

Durch Makrophagen freigesetzter Tumornekrosefaktor- α ist an der Migration und Apoptose von glatten Muskelzellen wesentlich beteiligt [Goetze 57, Obara 112]. Eine Apoptose glatter Muskelzellen kann das Gewebe der Deckplatte schwächen [Libby 81] und eine Plaqueruptur begünstigen [Bertrand 14]. Das Gerinnungsprotein Tissue Factor, das in Plaquematerial nachgewiesen werden konnte, bei Zerfall der Plaques mit dem Blutstrom in Kontakt kommt

und so die Blutgerinnungskaskade aktivieren kann, ist mit der Entstehung thrombotischer Koronararterienverschlüsse assoziiert [Fuster 52, Marmur 94, Toschi 152].

1.4 Das CD14-Antigen

CD14 ist ein 55 kDa [Antal-Szalmás 5] leucinreiches Oberflächenglykoprotein [Ferrero 44, Setoguchi 142], das aus 375 Aminosäuren besteht [Schumann 140] und durch ein Single-Copy-Gen kodiert wird [Goyert 59]. Dieses CD14-kodierende Gen ist auf dem langen Arm von Chromosom 5 [Ferrero 45] zwischen den Banden q23 bis q31 lokalisiert worden [Ferrero 43, Goyert 59] und besteht aus ca. 3900 Basenpaaren, die in zwei Exons organisiert sind [Schumann 140]. 75% bis 95% der Monozyten gesunder Individuen und Patienten sind CD14-positive Zellen [Birkenmaier 20]. Ein Monozyt exprimiert im ruhenden Zustand ca. 110.000 CD14-Moleküle auf seiner Oberfläche [Antal-Szalmás 5]. Lipopolysaccharid verstärkt diese CD14-Oberflächenexprimierung der Zellen [Birkenmaier 20].

Das CD14-Antigen ist über eine Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Verankerung auf der äußeren Monozytenzellmembran befestigt [Wang 160] und dient damit als Rezeptor für bakterielles Endotoxin (LPS) [Kirchner 79]. Die Bindung von LPS an diesen spezifischen Rezeptor wird durch das Lipopolysaccharid-bindende-Protein (LBP) katalysiert [Schletter 137]. LBP ist ein im Serum vorkommendes 60 kDa Glykoprotein [Wright 162], das im Rahmen einer Akut-Phase-Reaktion in Hepatozyten als 50 kDa Einzelketten-Polypeptid synthetisiert wird [Ramadori 123]. LBP agiert als Lipid-Transferprotein für LPS [Hailmann 61]. Es bindet LPS über die Lipid-A Region des Endotoxins [Schumann 139, Tobias 149] und komplexiert in dieser Verbindung mit mCD14. Die serumabhängige Bindung von LPS an CD14 erfolgt dabei über vier kleine Regionen innerhalb der 65 N-terminalen Aminosäuren von mCD14 [Viriyakosol 155]. Diese Komplexbildung führt zu unterschiedlichen Reaktionen CD14-positiver Zellen: LBP/LPS-Komplexe können via CD14 durch die Zelle internalisiert werden [Schumann 140]. Durch diesen Internalisierungsprozeß wird das Plasma von LPS-Molekülen gereinigt, so daß die LPS-Moleküle im weiteren Verlauf keine (weiteren) Zellen aktivieren können [Gegner 55]. Weiter können Monozyten im Rahmen einer LPS-Exposition CD14-Antigene von ihrer Oberfläche abstoßen [Bazil 13]. Diese Abstoßungsreaktion wird als Schutzmechanismus des Monozyten verstanden, da das nun in löslicher Form vorkommende CD14-Antigen (sCD14) eine LPS-induzierte Monozytenaktivierung reduziert [Schütt 141].

Das sCD14 kann LPS binden und Lipoproteinen zur Neutralisierung präsentieren [Wurfel 164] oder die LPS-Bindung an CD14-negativen Zellen [Bufler 28] wie Endothelzellen [Loppnow 88] und glatten Muskelzellen [Arditi 7] vermitteln. Mit dem Abstoßungsmechanismus können Monozyten vor einer übermäßigen Cytokinantwort geschützt werden [Bazil 13]. Eine weitere Reaktion der Zelle auf eine Endotoxinexposition führt schließlich zu einem CD14-abhängigen Signaltransduktionsweg [Perera 120], durch den einige LBP/LPS-Komplexe die Aktivierung der Zelle [Gegner 55] und damit die Expression verschiedener Gene [Ramadori 123] induzieren können.

Der Vorgang, wie GPI-verankerte CD14-Moleküle die Zellaktivierungssignale durch die Zellmembran nach intrazellulär transduzieren, ist in vollständiger Genauigkeit jedoch noch nicht geklärt [O'Brien und McVey 111]. Durch die nichttransmembrane GPI-Oberflächenverankerung von CD14 scheint der LPS-Rezeptor die Signaltransduktion nach Komplexierung mit LBP/LPS nicht selbst initiieren zu können [Tobias und Ulevich 150, Vasselon 155]. GPI könnte hier mit einer anderen Membrankomponente interagieren, die die Signaltransduktion nach intrazellulär vermittelt [Tobias 151]. Oder aber der Proteinanteil von mCD14 kommuniziert mit einem anderen Oberflächenprotein, das die Signaltransduktion als sogenanntes Transduktormolekül [Gegner 55] transmembran weiterleitet [Tobias 151].

Auch der Mechanismus der intrazellulären Signaltransduktion zur Aktivierung der Zelle ist noch nicht vollständig geklärt [Salgado 133, Setoguchi 142]. Hier scheint die Aktivierung von Proteinkinasen eine Rolle zu spielen [Liu 85, Stefanova 145, Weinstein 161].

Die intrazelluläre Signaltransduktionskaskade, die durch LPS aufgrund Komplexbildung mit LBP und mCD14 ausgelöst wird, führt zu einer letztlich nur unvollständig geklärten Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie z.B. des Kernfaktors NF- κ B [Cordle 33]. NF- κ B ist essentiell in den Prozeß der Gentranskription einer Vielzahl verschiedener Mediatoren eingebunden [Ishikawa 71]. So führt die Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors zur Genexpression proinflammatorischer Cytokine [Mukaida 104] wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) [Collart 32] und Interleukin-6 (IL-6) [Zhang 169] sowie des prokoagulatorischen Proteins Tissue Factor (TF) [O'Brien und McVey 111].

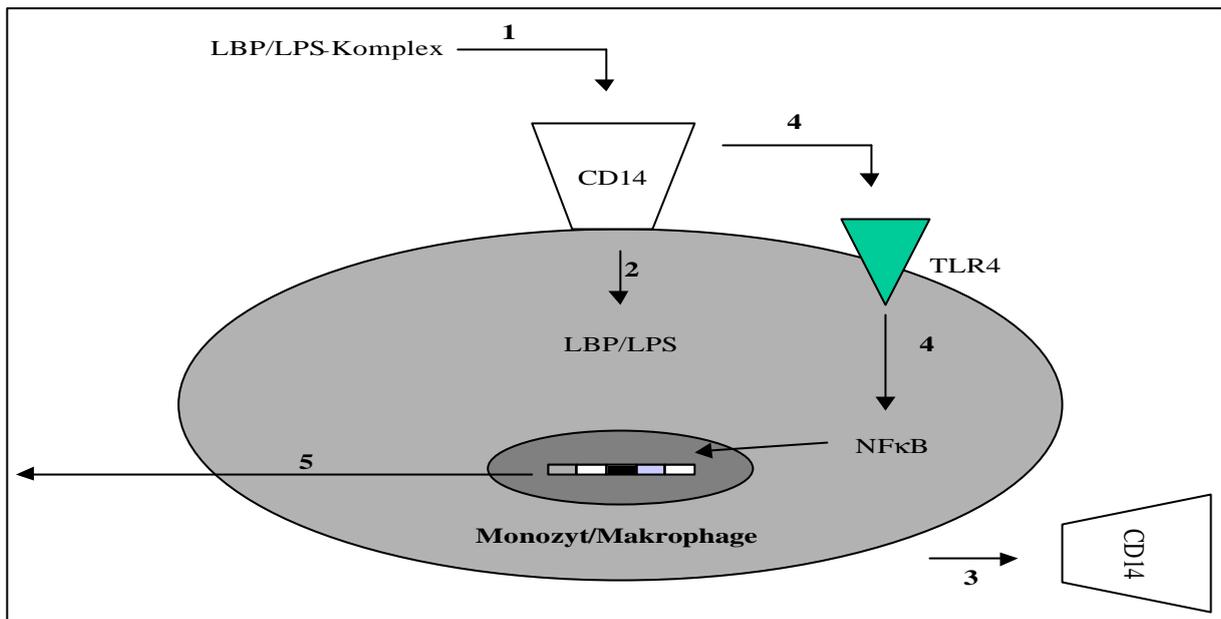


Bild 1.4a: Darstellung einer CD14-positiven Zelle

1 ® Bindung des LBP/LPS-Komplexes an mCD14. 2 ® Internalisierung des LBP/LPS-Komplexes. 3 ® Abstoßung von membrangebundenem CD14-Antigen. 4 ® NFκB-abhängiger Signaltransduktionsweg via TLR4. 5 ® Genexpression und Synthese verschiedener Mediatoren

Die LPS-initiierte Genexpression via LBP und CD14 führt dann zur Synthese und Freisetzung dieser proinflammatorischen (TNF- α , IL-6 [Wang 159]) und prokoagulatorischen (TF [O'Brien und McVey 111]) Genprodukte. Die Regulation dieser Genexpression wird auf transkriptionaler und posttranskriptionaler Ebene reguliert [Bauer 12].

Mittlerweile konnte nachgewiesen werden, daß die Bindung von LPS an den CD14-Rezeptor zu einem durch den sogenannten transmembranen Brückenrezeptor TLR4 ausgelösten NFκB-abhängigen Signaltransduktionsweg mit nachfolgender Synthese und Freisetzung verschiedener Mediatoren kommt. Dabei spielen das Adapterprotein MYD88 sowie verschiedene identifizierte Proteinkinasen, die letztendlich zu einer Phosphorylierung von IκB mit anschließender Degradation und Freisetzung von NFκB führen, eine Rolle [Medzhitov und Janeway 96].

Der Toll-like Rezeptor 4 gehört zu einer Gruppe von insgesamt zehn Brückenrezeptoren (TLRs) [Medzhitov 97], die dem angeborenen Immunkomplex zugeordnet werden [Ozinsky 121, Wyllie 165]. Diese Rezeptoren können jeweils verschiedene pathogene molekulare Muster erkennen [Medzhitov 97]. Toll-like Rezeptoren (TLRs) werden in atherosklerotischen Plaques exprimiert und sind mit inflammatorischer Aktivierung von Endothelzellen und Makrophagen

assoziiert. Via TLRs könnte es so zu einer Plaquestabilisation im Rahmen akuter Koronarsyndrome kommen [Edfeldt 40]. Zwar ist weder eine Infektion noch eine TLR-Expression im Tiermodell suffizient, Atherosklerose zu induzieren [Caligiuri 29], allerdings könnten Mikroben und TLRs durch Aktivierung von Plaquezellen im Rahmen akuter bzw. chronisch persistierender Infektionen von Bedeutung sein [Edfeldt 40]. Dabei könnten lokale „Echos“ systemischer Infektionen zu einer lokal erhöhten Cytokinproduktion mit resultierender Plaqueaktivierung und –ruptur führen [Libby 82].

Vor allem TLR2 und TLR4 scheinen bei dem Krankheitsbild der koronaren Atherosklerose bedeutsam zu sein. Die Expression von TLR4 in lipidreichen atherosklerotischen Läsionen erfolgt vorzugsweise durch Makrophagen. Diese Rezeptorexpression kann durch oxidiertes low density Lipoprotein (LDL) hochreguliert werden. Dies scheint ein möglicher pathophysiologischer Link zwischen Lipiden und Infektion/Inflammation und Atherosklerose zu sein [Xu 166]. *C. pneumoniae* scheint via TLR4 die Proliferation von glatten Gefäßzellen zu induzieren [Sasu 134]. Andogenui konnte zeigen, daß es eine CD14-abhängige und eine CD14-unabhängige Aktivierung von Zellen gibt, daß beide Aktivierungswege aber TLR4-assoziiert sind [4]. TLR2 ist als Rezeptor bei der Stimulation durch Nicht-LPS-Komponenten von *C. pneumoniae* im Rahmen einer CD14- und TLR4-unabhängigen Monozytenaktivierung mit resultierender Synthese und Freisetzung proinflammatorischer Cytokine assoziiert. Antiinflammatorische Mediatoren wie IL-10 werden nicht via TLR2 induziert. Das Bakterium scheint also verschiedene Rezeptoren zu nutzen, um pro- und antiinflammatorische Cytokine zu stimulieren [Netea 110].

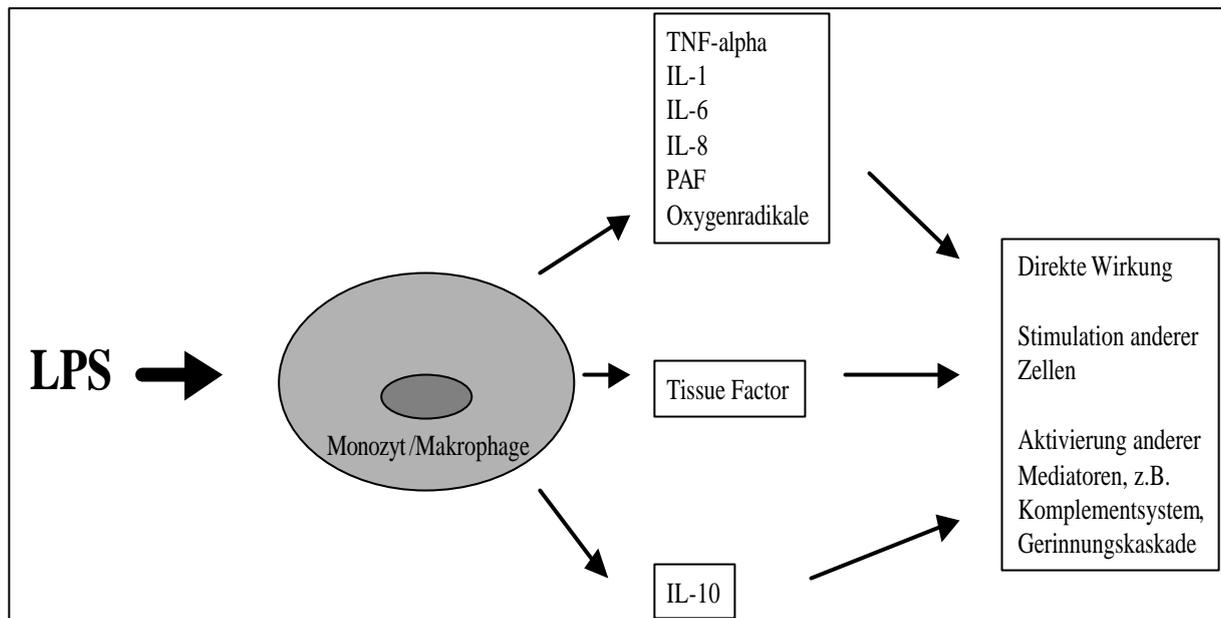


Bild 1.4b: Wirkung von LPS auf Monozyten/Makrophagen
 Die Aktivierung von Monozyten via LPS führt zu einer Mediatorsynthese mit daraus folgenden unterschiedlichen Reaktionen (PAF ® Plättchenaktivierungsfaktor).

1.5 Lipopolysaccharid-aktivierte Genprodukte

1.5.1 Tumornekrosefaktor- α

Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) wird zu den proinflammatorischen Cytokinen gezählt [Kirchner 79] und ist das erste Entzündungsprotein, daß nach Endotoxinexposition durch Monozyten freigesetzt wird [Salgado 133]. TNF- α besteht aus 157 Aminosäuren [Okusawa 113]. Es besitzt eine Vielzahl immunregulatorischer Funktionen (Regulierung der B-Zell-Differenzierung [Kashiwa 76], Erhöhung der Killer-Zell-Aktivität [Ostensen 114], T-Zell-Proliferation [Shalaby 144], Stimulierung der Produktion von Interleukin-2 [Scheurich 135]) und ist für die Vermittlung des septischen Schocks nach Endotoxinexposition im Rahmen bakteriell kontaminierter Infusionen verantwortlich [Abraham 1].

1.5.2 Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6) ist ein multifunktionelles Cytokin [Kirchner 79]. Es ist ein starker Induktor der Akut-Phase-Reaktion [Dofferhoff 39] und wird in erhöhter Konzentration im Serum septischer Patienten gefunden [Waage 157]. IL-6 wird neben Monozyten von einer Vielzahl aktivierter lymphoider und nicht-lymphoider Zellen (T-Zellen, B-Zellen, Endothelzellen, Fibroblasten, Tumorzellen) konstitutiv gebildet [Kirchner 79].

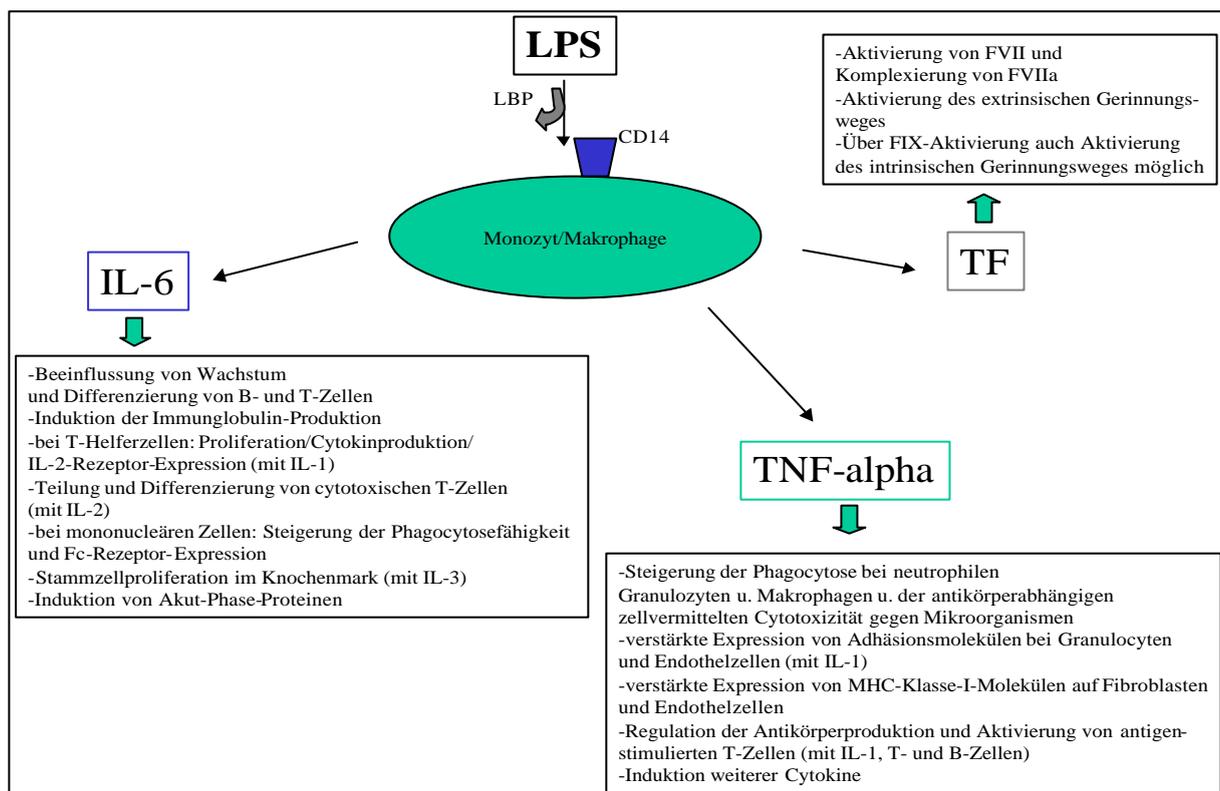


Bild 1.5a: LPS-Wirkung auf Monozyten/Makrophagen und Wirkung der Mediatoren [Biasucci 17, Billiau 19, Bom 23, Kirchner 79, Marlar 92, Nemerson und Pitlick 107]

1.5.3 Tissue Factor

Tissue Factor (TF) ist ein membrangebundenes Zelloberflächenprotein [Bach 10] aus 295 Aminosäuren [Osterud 118], das von Monozyten nach Induktion synthetisiert und exprimiert wird [McGee 95]. Die Regulation der TF-Expression in den Zellen wird dabei durch die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 kontrolliert [Armstead 8, Osterud 119]. TF gilt als

wichtigster zellulärer Initiator der Blutgerinnungskaskade [Bom 23, Nemerson und Pitlick 107] und ist ein Rezeptorprotein für den Gerinnungsfaktor VIIa. Überall dort, wo TF in Kontakt mit Blut kommt, bindet der Faktor VIIa an TF. Der Komplex aus TF/FVIIa führt zu einer proteolytischen Spaltung des Gerinnungsfaktors X in seine aktive Form [Carson und Brozna 31]. Dieser Umwandlung folgt die Formation des Prothrombinase-Komplexes, die Thrombin-generation und zuletzt die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin [Nemerson 108].

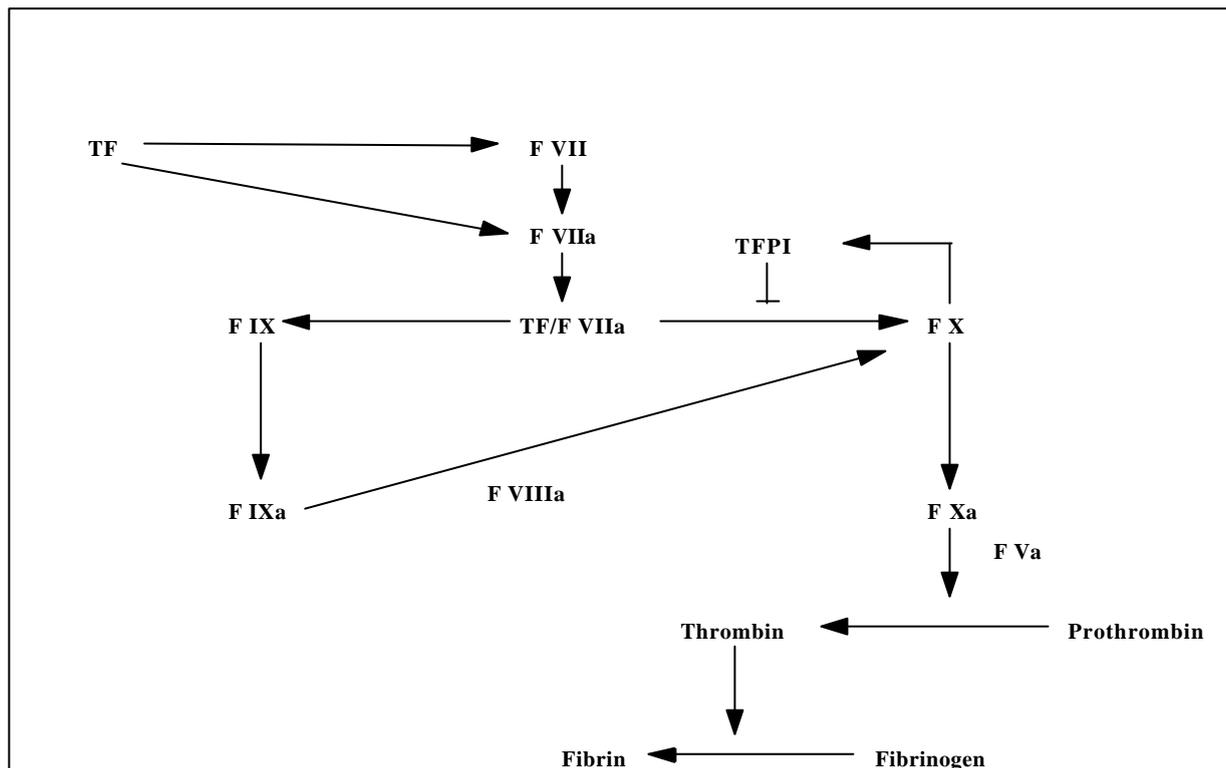


Bild 1.5b: Tissue Factor-induzierte Aktivierung der Blutgerinnung (TFPI: Tissue Factor Pathway Inhibitor)

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien, Chemikalien und Geräte

(Tabellarische Auflistung)

Plastik und Verbrauchsmaterialien

Röhrchen, steril, 50 ml (Polypropylen)	Fa. Becton Dickinson/Falcon, New Jersey, USA
24-Loch Platten, steril	Fa. Becton Dickinson/Falcon, New Jersey, USA
96-Loch Platten, steril	Fa. Greiner, Frickenhausen
Pipetten, steril, verschiedene Größen	Fa. Costar, Cambridge
Pipettenspitzen, steril, verschiedene Größen	Fa. Greiner, Frickenhausen
Reaktionsgefäße, verschiedene Größen	Fa. Greiner, Frickenhausen
Reagenzröhrchen, 4 ml	Fa. Greiner, Frickenhausen
Rührspatel	Fa. Sarstedt, Nümbrecht
Perfusorspritze, 50 ml, steril	Fa. Becton Dickinson, New Jersey, USA
Einmalfilter, steril, 0,20 µm	Fa. Satorius AG, Göttingen
Verschlußkonus (Combi rot), steril	Fa. Braun, Melsungen
Butterfly, steril, 21G	Fa. Kabe, Nümbrecht
Kanülen, steril, 18G	Fa. Terumo Europa, Leuven, Belgien
Einmalspritze, steril, 10 ml	Fa. Braun, Melsungen
EDTA-K Blutentnahmeröhrchen, 3 ml	Fa. Kabe, Nümbrecht
Natrium-Heparin Blutentnahmeröhrchen, 5 ml	Fa. Kabe, Nümbrecht
Natrium-Citrat Blutentnahmeröhrchen, 5 ml	Fa. Kabe, Nümbrecht
Softasept N, 250 ml	Fa. Braun, Melsungen

Zellisolation und Kultur

Monozyten-Serumfreies-Medium (MSFA)	Fa. Gibco, Eggenstein
Hanks-Buffered-Salt-Solution (HBSS)	Fa. PAA, Linz, Österreich
Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline (PBS)	Fa. PAA, Linz, Österreich
Penicillin/Streptomycin Solution	Fa. Gibco, Eggenstein
Humanserum AB of the clot	Fa. PAA, Linz, Österreich
Aqua dest. injectabile	Fa. Braun, Melsungen
Isotone Kochsalzlösung	Fa. Braun, Melsungen
Lipopolysaccharide (E. coli 0112:B4)	Fa. Sigma, Deisendorf
Ficoll-Paque	Fa. Pharmacia, Upsella, Schweden
Liquemin N 25000	Fa. Hoffmann-La Roche AG, Grenzach- -Wyhlen
Standard Limulus Amoebozytlysate Assay	Fa. Chromogenix, Mölndal, Schweden

Zytologische Färbung

Trypanblau 0,4%	Fa. Sigma, Deisendorf
Giemsa Lösung	Fa. Merck, Darmstadt
Formaldehyd 37%	Fa. Merck, Darmstadt
Natriumnitrit kristallin, reinst.	Fa. Merck, Darmstadt
Parasosanilin	Fa. Merck, Darmstadt
1-Naphtylacetat	Fa. Serva, Heidelberg
Aceton reinst.	Fa. Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat 1-hydrat	Fa. Merck, Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Fa. Merck, Darmstadt

Messung der prokoagulatorischen Aktivität

Standard-Human-Serum	Fa. Behring, Marburg
Kalziumchlorid-Lösung (0,025 mol/l)	Fa. Behring, Marburg
Faktor VII defizientes Plasma	Fa. Behring, Marburg
Thromboplastin (rabbit brain)	Fa. Sigma, Deisendorf
Barbitursäurepuffer	Fa. Behring, Marburg

Messung mit dem chromogenen Tissue Factor-Assay

Kalziumchlorid	Fa. Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Fa. Roth, Karlsruhe
HEPES	Fa. Böhringer, Mannheim
Albumine, Bovine, (BSA)	Fa. Sigma, Deisendorf
Aqua dest. injectabile	Fa. Braun, Melsungen
Faktor X (Stuart Power Factor), (10 U)	Fa. Sigma, Deisendorf
Faktor VIIa (human plasma) (purified), (10µg)	Fa. Alexis, San Diego, USA
Rec. lipidated human tissue factor, (50 ng)	Fa. American Diagnostic, Greenwich, USA
S-2222, (25 mg)	Fa. Chromogenix, Mölndal, Schweden
EDTA (Versen) 1%	Fa. Biochrom KG, Berlin

Messung der Interleukin-6 -und Tumornekrosefaktor- α -Sekretion

IL-6 IEMA	Fa. Coulter Company/Immunotech, Marseille, Frankreich
TNF- α IEMA	Fa. Coulter Company/Immunotech, Marseille, Frankreich

Laborgeräte und Meßinstrumente

Pipettierhilfen, verschiedene Größen	Fa. Hirschmann, Eberstadt und Fa. Gilson, Vielliers de Bel, France
Langendorffzählkammer	Fa. Sigma, Deisendorf
Schüttler	Fa. Fischer, Frankfurt/Main
Plattenphotometer	Fa. Lab. Instruments GmbH, Salzburg, Österreich
Zentrifuge 5415 C	Fa. Eppendorf, Köln
Megafuge 2.0 R	Fa. Heraeus Instruments, Hanau
„Cytospin“-Zentrifuge	Fa. Elliott C. Ltd., London, England
Brutschrank	Fa. Heraeus Instruments, Hanau
Sterilbank	Fa. Heraeus Instruments, Hanau
Fluorescence-activated cell-sorting (Facs-Scan)	Fa. Becton Dickinson, New Jersey, USA
Lichtmikroskop	Fa. Leica, Wetzlar

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchsprobanden

Für die Studie wurden 120 gesunde Versuchspersonen willkürlich aus der Studentenschaft und dem Klinikpersonal rekrutiert. Insgesamt nahmen 72 (60%) Männer und 48 (40%) Frauen an der Untersuchung teil. Das Durchschnittsalter der Testpersonen lag bei 26 Jahren (Spannweite [engl. Range] 20 bis 43 Jahre). Bei den Probanden wurden die Merkmale Geschlecht, Alter, Zigarettenrauchen und Einnahme oraler Kontrazeptiva (Nikotinabusus und Einnahme oraler Kontrazeptiva sind laut Hölschermann et al. [68] bei Frauen mit einer erhöhten monozytären Tissue Factor-Aktivität assoziiert) registriert und Krankheitszustände wie Diabetes mellitus, Gicht, arterielle Hypertonie, früher abgelaufene Thrombosen sowie eine familiäre Disposition zu thrombotischen Ereignissen und Einnahme einer Dauermedikation mittels eines Fragebogens ausgeschlossen. Die Testpersonen wurden bezüglich des (T-159C)-Polymorphismus im Promotor des CD14-Gens genotypisiert und

zwei homozygoten Gruppen (CC und TT) sowie einer heterozygoten Gruppe (CT) zugeordnet. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde ein sogenanntes „Doppelblindverfahren“ angewandt, d.h., die Ergebnisse der vorliegenden Studie wurden erst am Schluß dem Genotyp des jeweiligen Probanden zugeordnet.

2.2.2 Blutentnahme

Die Blutabnahme erfolgte unter folgenden standardisierten Bedingungen:

Die Blutabnahme wurde morgens durchgeführt. Die Probanden waren zum Zeitpunkt der Venenpunktion nüchtern. Die Blutabnahme erfolgte liegend nach einem zehnmütigen Ruheintervall. Zur Venenpunktion wurde ein Butterfly (21G) verwendet. Die Punktion erfolgte nach ausreichender Hautdesinfektion durch ein Hautdesinfektionsmittel.

Bei jedem Probanden wurde folgendes Blutröhrchenspektrum abgenommen:

Für die Monozytenisolierung wurde eine 50 ml Perfusorspritze verwendet. Das Blut wurde mit 5000 i.E. Liquemin N (1 ml) heparinisiert. Für die Genpolymorphismusbestimmung wurden je Proband zwei EDTA-K Blutröhrchen verwendet. Begleitend wurde zum Ausschluß aktueller Infektionsproblematiken C-reaktives Protein bestimmt. Als Basisuntersuchung wurden ein Differentialblutbild analysiert und die Elektrolyte sowie der Gerinnungsstatus bestimmt. Außerdem wurde der Interleukin-6-Serumspiegel bei den Versuchsprobanden gemessen.

2.2.3 Isolation humaner Monozyten

Die humanen peripheren Blutmonozyten (PBM) wurden aus je 50 ml heparinisiertem Blut gesunder Probanden durch Zentrifugation über einen Dichtegradienten [Boyum 26] und anschließender Analyse mittels Fluorescence-activated cell-sorting (Facs-Scan) zur Bestimmung des prozentualen Anteils der Monozyten in der Probe isoliert.

Das Probandenblut wurde zunächst jeweils in sterile 50 ml Röhrchen umgefüllt und anschließend vorsichtig über 20 ml Ficoll-Paque in anderen sterilen, verschließbaren 50 ml Zentrifugationsröhrchen geschichtet und bei 600g für 30 Minuten bei 18° C zentrifugiert. Die Interphasen zwischen Ficoll-Paque und Serum wurden nach erfolgter Zentrifugation nun

vorsichtig mit einer Pipette aufgenommen. Die Gradienten der Interphasen enthalten überwiegend mononukleäre Zellen. Zur weiteren Reinigung der mononukleären Zellen von kontaminierenden Thrombozyten und den Ficoll-Paque-Resten wurden die Interphasen in sterilen 50 ml Zentrifugationsröhrchen aufgenommen und auf 50 ml mit HBSS aufgefüllt. Anschließend wurden die Röhrchen bei 200 g für zehn Minuten bei 18° C zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Zellpellets zunächst manuell gelöst und anschließend mit HBSS resuspendiert. Dieser Waschvorgang wurde dreimal wiederholt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Zellpellets in je 20 ml Monozyten-Serumfreien-Medium (MSFM) (versetzt mit 100 IE Penicillin/ml und 100 IE Streptomycin/ml) resuspendiert.

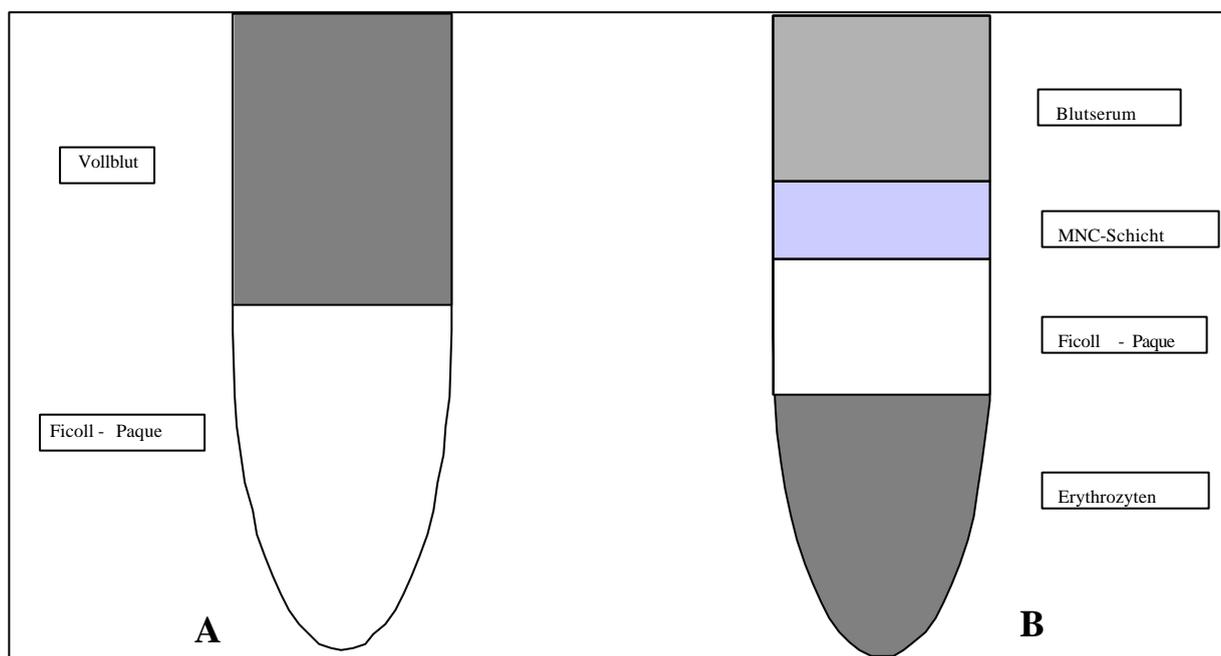


Bild 2.2.3: Darstellung eines sterilen 50 ml Röhrchens nach Beschichtung des Ficoll-Paques mit Probandenblut (A), nach Zentrifugation des Röhrchens bei 600g für 30 min bei 18° C @ vier Schichten: Blutserum, Schicht mononukleärer Zellen (MNC-Schicht, Interphase zwischen Serum und Ficoll-Paque), Ficoll-Paque, Erythrozyten (B)

Zur Zellzählung, Vitalitätsprüfung und zur Prüfung des Reinheitsgrades der isolierten Monozyten wurden Proben von den frisch isolierten Monozyten entnommen und „Cytospin“-Präparate angefertigt.

Für die Versuchsreihen prokoagulatorische Aktivität (PCA), TNF- α und IL-6 IEMA wurde mit jeweils 300.000 Zellen pro Feld einer 3 ml 24 Loch-Zellkulturplatte gearbeitet. Zur Bestimmung des Tissue Factors mittels eines chromogenen Tissue Factor-Assay wurden je 50.000 Zellen pro Feld einer 0,4 ml 96 Loch-Zellkulturplatte benutzt. Bei jeder dieser angegebenen Versuchsreihen wurde mit Doppelbestimmungen für die Basalwerte (ruhende

Zellen) bzw. die LPS-Stimulationsreihe gearbeitet. Die in MSFM suspendierten Zellen wurden nun zum Adhärenz zwei Stunden bei 37° C und 5 % CO₂ kultiviert. Anschließend wurde jedes Feld der Loch-Zellkulturplatten zweimal mit Dulbecco's phosphat buffered saline (PBS) gewaschen und schließlich mit 300 µl bzw. 50 µl MSFM resuspendiert, so daß nun eine Zelldichte entsprechend 1 x 10⁶ Zellen pro ml pro Feld vorlag [Hölschermann 67].

2.2.4 Trypanblaufärbung

Zur Überprüfung der Zellvitalität und der Zellzahl wurden nach der Zellisolation 50 µl des Zellsuspensates mit 50 µl 0,4% Trypanblaulösung in eine 0,4 ml 96 Loch-Zellkulturplatte pipettiert und gründlich mit einer Pipettenspitze durchmischt. Anschließend wurde das Zellsuspension-Trypanblaulösung-Gemisch vorsichtig unter eine Langendorffzählkammer, die mit einem Deckglas abgedeckt war, pipettiert, und bei einer 40-fachen Vergrößerung unter einem Lichtmikroskop wurden die sichtbaren Zellen in dem in 16 Einzelfeldern unterteiltem Zählfeld ausgezählt. Es erfolgte eine Wiederholung der Zellzählung in insgesamt vier Zählfeldern, wodurch schließlich die durchschnittliche Zellzahl pro Zählfeld durch Division ermittelt wurde.

Zur Berechnung der Zellzahl pro ml wurde anschließend die durchschnittliche Zellzahl pro Zählfeld mit dem Faktor 10.000 multipliziert und das Ergebnis dann unter Berücksichtigung der Verdünnung durch Mischung mit der Trypanblaulösung mit dem Faktor zwei multipliziert (*Formeln 2.2.4.1*). Zellen mit nicht-intakter Plasmamembran, deren Zytoplasma sich also nach Trypanblaufärbung mit dem Farbstoff angefärbt hatte, wurden als nicht vital gewertet (*Formel 2.2.4.2*). Die Vitabilität der Zellen betrug im Durchschnitt über 90%. Anschließend wurde mittels Facs-Scan-Analyse der prozentuale Anteil der Monozyten in einer 200 µl Probe aus der Gesamtprobe bestimmt, wodurch nun die genaue Monozytenzahl in der Gesamtprobe berechnet werden konnte (*Formel 2.2.4.3*). Das Facs-Scan ist ein Durchflußzytometer, das mit Argon-Ionen mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm betrieben wird. Es bestimmt die Granularität der Zellen im Seitwärtsstreulicht und die Größe der Zellen im Vorwärtsstreulicht. Die Diskriminierung der Monozyten von Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten erfolgt in der Vorwärts- gegen Seitwärtsstreulichtdarstellung in einem sogenannten DOT-PLOT-Diagramm (zweidimensionale Datenprojektion).

Formel 2.2.4.1:

Zellzahl/ml = Zellzahl im Zählfeld x 10.000 (Zählkammer) x 2 (Verdünnung)

Formel 2.2.4.2:

% leb. Zellen = ungef. Zellen / (ungef. Zellen + gef. Zellen) x 100

Formel 2.2.4.3:

Monozyten/ml = Zellzahl/ml / 100 x Prozentzahl (Monozyten)

2.2.5 „Cytospin“-Präparate

Zunächst wurden 100.000 Zellen, suspendiert in MSFM, aus der jeweiligen Probe auf einem Objektträger für zwei Stunden bei 37° C und 5 % CO₂ kultiviert, anschließend zweimal mit PBS gewaschen und schließlich wieder mit 100 µl MSFM resuspendiert.

Zur Anfertigung der benötigten „Cytospin“-Präparate wurden diese 100 µl Zellsuspensat in eine entsprechende „Cytospin“-Zentrifuge gegeben und zehn Minuten bei 50 g zentrifugiert. Durch die Zentrifugationskräfte wurden die Zellen im Medium auf eine Aussparung eines Löschpapierdeckels zentrifugiert, der einem Objektträger aufliegt. Es erfolgte eine Konzentrierung der Zellen in der Aussparung auf dem Objektträger, wohingegen das Medium vom Löschpapier aufgenommen wurde. Nach dem Entfernen der Löschpapierdeckel wurden die so gewonnenen Präparate auf den jeweiligen Objektträgern für zehn Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und standen für weitere zytologische Färbungen zur Verfügung.

2.2.6 Pappenheimfärbung

Die Pappenheimfärbung der „Cytospin“-Präparate diente zur Kontrolle des Reinheitsgrades der isolierten Monozyten und zur Beurteilung der Kernmorphologie. Zunächst wurden die vorbereiteten Präparate auf den Objektträgern zur Fixierung fünf Minuten in ein Bad mit May-Grünwald-Lösung getaucht und anschließend zweimal in einem Bad mit Aqua dest. gewaschen. Danach wurden die Objektträger für zehn Minuten in einem Bad mit Giemsa-Lösung (Stammlösung im Verhältnis 1:20 mit Aqua dest. verdünnt) inkubiert. Im Anschluß an diese Kernfärbung wurden die Objektträger erneut mit Aqua dest. gewaschen und dann bei

Raumtemperatur 20 Minuten lang getrocknet. Unter einem Mikroskop bei 100-facher Öldispersionsvergrößerung erfolgte nun die Beurteilung der angefärbten Präparate. Aufgrund typischer Kriterien der Kernmorphologie konnte nach Auszählung zehn verschiedener Bildfelder der prozentuale Anteil der Monozyten ermittelt werden. Die Reinheit der isolierten Zellen betrug im Durchschnitt mindestens 90%.

2.2.7 Unspezifischer Esterasenachweis

Die Charakterisierung der Monozyten erfolgte mit der unspezifischen Esterasefärbung nach Löffler [87]. Dazu wurden folgende Lösungen benötigt und entsprechend hergestellt:

Phosphatpuffer 0,2 mol, pH 7,0 – 7,1: Dieser Puffer wurde aus zwei verschiedenen Lösungen (250 ml Lösung A und 130 ml Lösung B) hergestellt. Lösung A entstand dabei aus 13,8 g Natriumhydrogenphosphat 1-hydrat gemischt in 500 ml Aquq dest., Lösung B aus der Mischung von 17,8 g di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat ebenfalls in 500 ml Aqua dest. gemischt.

Weiter wurde eine Inkubationslösung benötigt, die durch Mischung einer Lösung I mit einer Lösung II und anschließender Filtration in eine kleine Küvette hergestellt wurde. Lösung I entstand aus einem Tropfen (0,05 ml) Natrium-Nitritlösung und einem Tropfen (0,05 ml) Pararosanilinlösung, die mindestens eine Minute lang gut gemischt (die Mischung ergibt eine leicht gelbliche Lösung) und anschließend in 5 ml 0,2 mol Phosphatpuffer (pH 7,0 – 7,1) gelöst wurden. Um Lösung II zu erhalten, wurden 10 mg Naphtylacetat in 0,3 ml chemisch reinem Aceton gelöst und dann mit 20 ml 0,2 mol Phosphatpuffer (pH 7,0 – 7,1) unter kräftigem Rühren vermischt. Beide Lösungen wurden direkt vor der Färbung frisch angesetzt. Das luftgetrocknete Probenmaterial wurde auf den Objektträgern vier Minuten lang mit Formaldampf fixiert und danach mit Leitungswasser gespült. Im Anschluß daran wurde das Material erneut luftgetrocknet, um dann in der Inkubationslösung für 60 Minuten eingestellt zu werden. Nach erneutem Spülen mit Leitungswasser erfolgte ein Gegenfärben mit Hämalaun für acht Minuten und anschließend die Bläuung unter Leitungswasser für einen Zeitraum von weiteren 15 Minuten. Das Probenmaterial wurde erneut luftgetrocknet und schließlich unter dem Mikroskop bei einer 100-fachen Öldispersionsvergrößerung analysiert. Dabei zeigten Monozyten die größte Aktivität und stellten sich in den untersuchten Bildfeldern als Zellen mit einem stark braun-orange granulierten Zytoplasma dar.

Durch die unspezifische Esterasefärbung der „Cytospin“-Präparate konnte gezeigt werden, daß mindestens 90 % der Zellen dieses Charakteristikum aufwiesen.

2.2.8 Zellkultur

Nach 24stündiger Inkubation bei 37° C und 5 % CO₂ in MSFM wurden die isolierten Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS mit einem Medium, bestehend aus MSFM und 2%igem Humanserum, pro Lochfeld mit 300 µl bzw. 50 µl resuspendiert und nochmals für zwei Stunden wie oben beschrieben kultiviert. Anschließend wurden die Zellen je Feld für sieben Stunden mit Lipopolysaccharid (LPS) (100 ng pro µl Medium) stimuliert. Die jeweiligen Basalwertproben wurden unter gleichen Bedingungen in Abwesenheit von LPS kultiviert. Die Proben wurden nach der oben genannten Inkubationszeit eingefroren (-80 °C). Für den chromogenen Tissue Factor-Assay wurden die Zellen dabei trocken eingefroren. Die Zellen zur Messung der prokoagulatorischen Aktivität wurden zusammen mit dem Medium eingefroren. Für die übrigen zwei Experimente wurden die Proben nach erfolgter Stimulationszeit durch zweimaliges Zentrifugieren bei 14.000 rpm. aliquotiert, von Monozyten befreit und ebenfalls eingefroren (-80 °C).

2.2.9 Messung der prokoagulatorischen Aktivität

Die prokoagulatorische Aktivität (PCA) der lysierten Monozyten (sie entspricht der Thromboplastinaktivität) wurde in einem Ein-Schritt-Gerinnungstest bestimmt, in dem die Gerinnungszeit einer 1:1 Mischung Monozytenlysat/plättchenarmes humanes Citratplasma gemessen wurde [Helin und Edgington 65]. Zur Messung der PCA wurden die Zellen durch dreifaches Einfrieren und anschließendes Auftauen und durch Abkratzen von der Zellkulturplatte lysiert und homogenisiert. Für die Messung wurden 50 µl Zellysat und 50 µl Citratplasma drei Minuten lang im Wasserbad bei 37° C in einem 12 x 75-mm Plastikröhrchen inkubiert. Die Gerinnung wurde schließlich durch die Zugabe von 50 µl 25 mM Kalziumchloridlösung gestartet. Die Gerinnungszeit wurde dann für jede Probe von der Zugabe der Kalziumchloridlösung bis zur Bildung eines Fibringels gestoppt. Es wurde jeweils in Doublets gemessen. Die ermittelten Gerinnungszeiten der einzelnen Proben wurden durch Vergleich mit einer Standardreaktionskurve in Milliunits (mU) PCA umgerechnet (*Abbildung 2.2.9*). Die entsprechende Vergleichskurve wurde aus den verschiedenen Gerinnungszeiten einer Verdünnungsreihe eines Hasenhirnthromboplastinstandards errechnet. Die Standardkurve verläuft nach doppeltlogarithmischer Auftragung linear zwischen 1 mU (310 Sekunden) und 10.000 mU (20 Sekunden). Alle Werte wurden nun in mU/10⁶ Zellen angegeben. Die Medien, Puffer und Reagenzien zeigten keine PCA. Schließlich wurden alle

benutzten Medien und Puffer auf Kontamination durch Endotoxin mit einem Standard Limulus Amoebocyte Test untersucht. Mit dem Test konnte ein Endotoxingehalt von weniger als 12,5 pg/ml (unterste Nachweisgrenze des Testes) ermittelt werden.

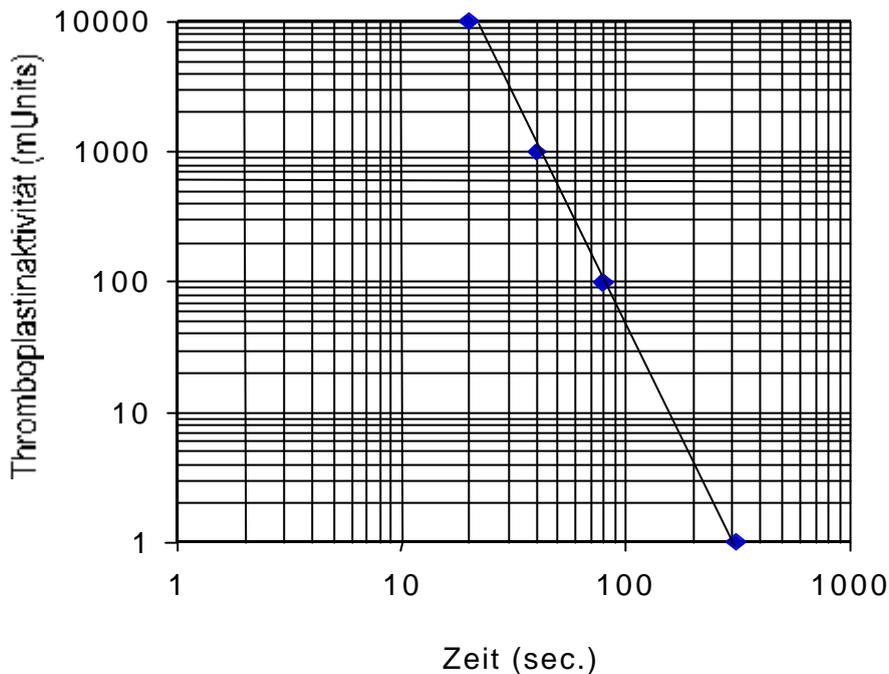


Abbildung 2.2.9: Standardverdünnungskurve eines „rabbit brain“ Thromboplastinstandards
 Thromboplastinstandardkurve verschiedener Verdünnungen eines Hasenhirn-Thromboplastinstandards in Barbitursäurepuffer. Nach doppeltlogarithmischer Auftragung verläuft die Kurve linear zwischen 1 mU (310 sec.) und 10.000 mU (20 sec.). Die Gerinnungszeiten von Proben wurden durch Vergleich mit dem Standard in mUnits Thromboplastinaktivität umgerechnet.

Verschiedene experimentelle Studien berichten von sogenannten Low (LR)- und Highrespondern (HR) bezüglich der Tissue Factor-Aktivität bei LPS-stimulierten Monozyten [Halvorsen 62, Osterud 117, Osterud 118]. Vor diesem Hintergrund wurden die Meßergebnisse der LPS-exponierten Zellen weiter diskutiert. Dazu wurden in der vorliegenden Studie für LR ein PCA-Wert von $\leq 900 \text{ mU}/10^6$ Zellen und für HR von $\geq 3000 \text{ mU}/10^6$ Zellen festgelegt.

Bei 31 Probanden (CC 10, CT 11, TT 10) konnte eine ausreichende Zahl Monozyten isoliert werden. Bei diesen Probanden wurde zusätzlich eine Quantifizierung der zellulären Tissue Factor-Expression mit einem chromogenen TF-Assay und eine TNF- α - und IL-6-Bestimmung in den Zellüberständen mittels Enzymimmunoassays vorgenommen.

2.2.10 Quantifizierung von Tissue Factor mit einem chromogenen Assay

Zur Quantifizierung der Tissue Factor-Aktivität wurde ein chromogener Tissue Factor-Assay, der die FXa-Aktivierung mißt, nach der Methode von Marmur et al. [93] für diese Studie modifiziert.

Die Monozyten der Probanden wurden nach der oben angegebenen Methode isoliert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 96er Mikrotiterplatten (0,4 ml Loch-Zellkulturplatte). Pro Lochfeld der Mikrotiterplatte wurden 5×10^4 Zellen in 50 µl MSFA und 2%igem Human Serum (entspricht der Konzentration 10^6 Zellen/ml) kultiviert. Je Proband wurde mit einer LPS-freien Probe (Basalwert) und einer LPS-stimulierten Probe (100 ng LPS pro ml Medium) mit Doppelbestimmungen gearbeitet. Nach der siebenstündigen Stimulationszeit der Zellen mit LPS wurde der Überstand abgenommen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen, bevor sie trocken in den Mikrotiterplatten bei -80°C bis zur späteren Analyse eingefroren wurden.

Nach Lyse der Zellen wurden die Lochfelder je mit 100 µl Assay-Puffer (CaCl 5 mM, NaCl 140 mM/l, HEPES 10 mM/l, BSA 1 mg/ml, pH bei 7,5 [Marmur 93]) resuspendiert. Schließlich wurde pro Lochfeld eine Reaktionsmischung bestehend aus 93,5 µl Assay-Puffer, 5 µl FX (10 mU/µl) und 1,5 µl FVIIa (20 nM/µl) hinzugegeben. Die lysierten Zellen inkubierten mit der Reaktionsmischung zehn Minuten lang bei 37°C und 5% CO_2 . In dieser Zeit erfolgte die FXa-Aktivierung, die durch Zugabe von 10 µl EDTA (1%) pro Lochfeld am Ende der Inkubationszeit gestoppt wurde. Nun wurden pro Feld 10 µl des FXa-sensitiven chromogenen Substrates S-2222 (4 mmol/l) [Aurell 9, Gouin-Thibault 58, Reuning 125, Wakita 158] zur Quantifizierung der FXa-Menge [Carson 30] hinzugefügt. Der gebildete FXa spaltet den Farbstoff p-Nitroanilid (pNA) von der Aminosäuresequenz Ile-Glu-Gly-Arg des Substrates ab (*Bild 2.2.10*). Dies führt zu einer entsprechend der FXa-Menge abhängigen Gelbfärbung der Probe und damit zu einer spezifischen Extinktion, die, nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei 37°C und 5% CO_2 , spektrophotometrisch mit einem Plattenphotometer bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen wurde.

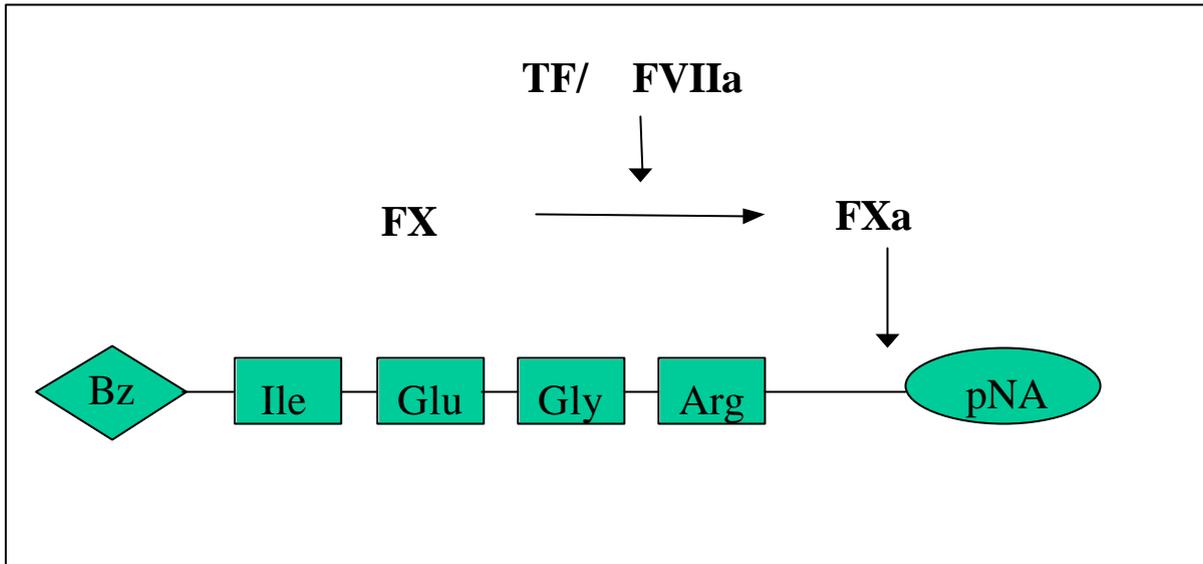


Bild 2.2.10: Reaktionsablauf chromogener TF-Assay

Abgespaltenes pNA führt zu einer Gelbfärbung der Probe, die im Plattenphotometer bei 405 nm gemessen wurde. Der Extinktionsgrad ist abhängig von der gebildeten FXa-Menge. Die Tissue Factor-Menge ist der gebildeten FXa-Menge proportional.

Um diese Extinktionsergebnisse der Proben in die Maßeinheit $\text{pg}/10^6$ Zellen umrechnen zu können, wurde eine Standardaktivitätskurve, die sich auf die Tissue Factor-Konzentrationen 1000 - 500 - 250 - 125 - 62 - 30 - 15 - 7,5 - 0 $\text{pg}/\mu\text{l}$ bezieht, mit einem rekombinanten (lipidated) Tissue Factor, den oben angegebenen Faktoren X und VIIa sowie dem Assay-Puffer entwickelt (Abbildung 2.2.10). Hier erfolgte die Bestimmung der gebildeten FXa-Menge mit dem chromogenen Substrat S-2222 über einen Zeitverlauf von einer halben, einer und zwei Stunden, wobei die Zweistunden-Standardkurve als Maß verwendet wurde, da es vor und nach dieser Zeit zu unspezifischen Extinktionsergebnissen der Standardproben kam und die einzelnen Proben zu dem Zeitpunkt zwei Stunden unterscheidbare TF-Meßergebnisse zeigten.

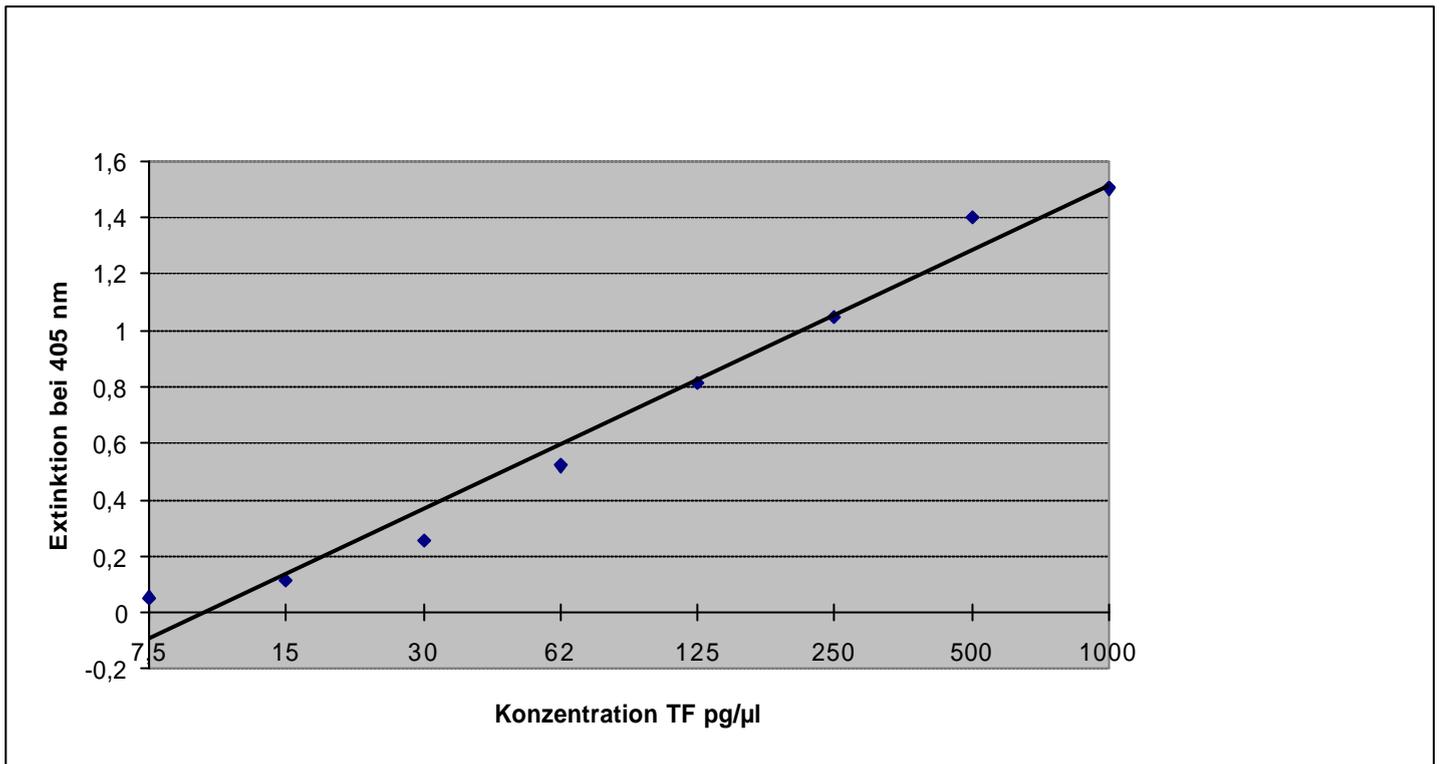


Abbildung 2.2.10: Standardkurve chromogener TF-Assay

Die Standardverdünnungskurve wurde mit den Konzentrationen 1000 – 500 – 250 – 125 – 62 – 30 – 15 – 7,5 – 0 pg/μl eines rekombinanten Tissue Factors erstellt. Die Extinktionsergebnisse der einzelnen Proben wurden nach Vergleich mit der Standardkurve in die Maßeinheit pg/10⁶ Zellen umgerechnet.

2.2.11 Messung der Tumornekrosefaktor- α -Aktivität

Zur Bestimmung der TNF- α -Aktivität der Monozyten in den jeweiligen Überständen wurde der TNF- α IEMA (Enzymimmunoassay) der Firma Company Coulter/Immunotech (Marseille/Frankreich) verwendet. Dieser Assay ist ein sogenannter „Sandwich“-Enzym-Assay, bei dem man mit antikörperbeschichteten Mikrotiterplatten sowie mit einem zweiten anti-TNF- α monoklonalen Antikörper, der mit alkalischer Phosphatase konjugiert ist, arbeitet. Die zellfreien Proben wurden nach dem Auftauen gevortext und danach nochmals durch Zentrifugation aliquotiert. Die Proben wurden anschließend mit einem Diluent Puffer nun auf 1:2 (LPS-freie Probe) und 1:30 (LPS-stimulierte Probe) verdünnt. Die Standardreihe für TNF- α wurde mittels einer Verdünnungsreihe der Konzentrationen 0 - 16 - 63 - 250 - 1000 pg/ml für TNF- α (Abbildung 2.2.11) erstellt.

Reagenzien und Proben mußten zur Versuchsdurchführung Raumtemperatur haben. Je 100 μ l der jeweiligen Standards und 100 μ l jeder verdünnten Probe wurden für den entsprechenden Versuch verwendet. Es wurde mit einer Doppelbestimmung gearbeitet. Standardreagenzien

und verdünnte Proben wurden zusammen mit 100 µl monoklonalem Antikörper enthaltendem Konjugat in den jeweiligen antikörperbeschichteten Lochfeldern der Mikrotiterplatte (0,4 ml Loch-Zellkulturplatte) bei Raumtemperatur für 120 Minuten auf einem Schüttler (ROTAMAX) bei 350 rpm inkubiert. Dabei wurde die Mikrotiterplatte lichtgeschützt mit einer Alufolie abgedeckt. Nach der Inkubationszeit wurden die Lochfelder der Mikrotiterplatte dreimal mit einer Waschlösung gewaschen. Anschließend wurden 200 µl der Substratlösung in jedes Feld pipettiert. Wieder lichtgeschützt erfolgte nun eine Inkubation mit der Substratlösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler bei 350 rpm. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurde die Reaktion in den jeweiligen Lochfeldern mit 50 µl einer Stopplösung (NaOH) beendet. Nun erfolgte eine Extinktionsmessung im Plattenphotometer bei 405 nm und die Umrechnung der Extinktionsergebnisse der Proben mittels der Standardkurve. Der Assay war bis zu einer Extinktion von 2,418 (=1000 pg/ml) genau. Diejenigen Proben, die höhere Extinktionsergebnisse erbrachten, wurden mit einem Diluent weiterverdünnt und berechnet.

In probenfreiem Medium (MSFM und Humanserum 2%) konnte im IEMA kein TNF- α nachgewiesen werden.

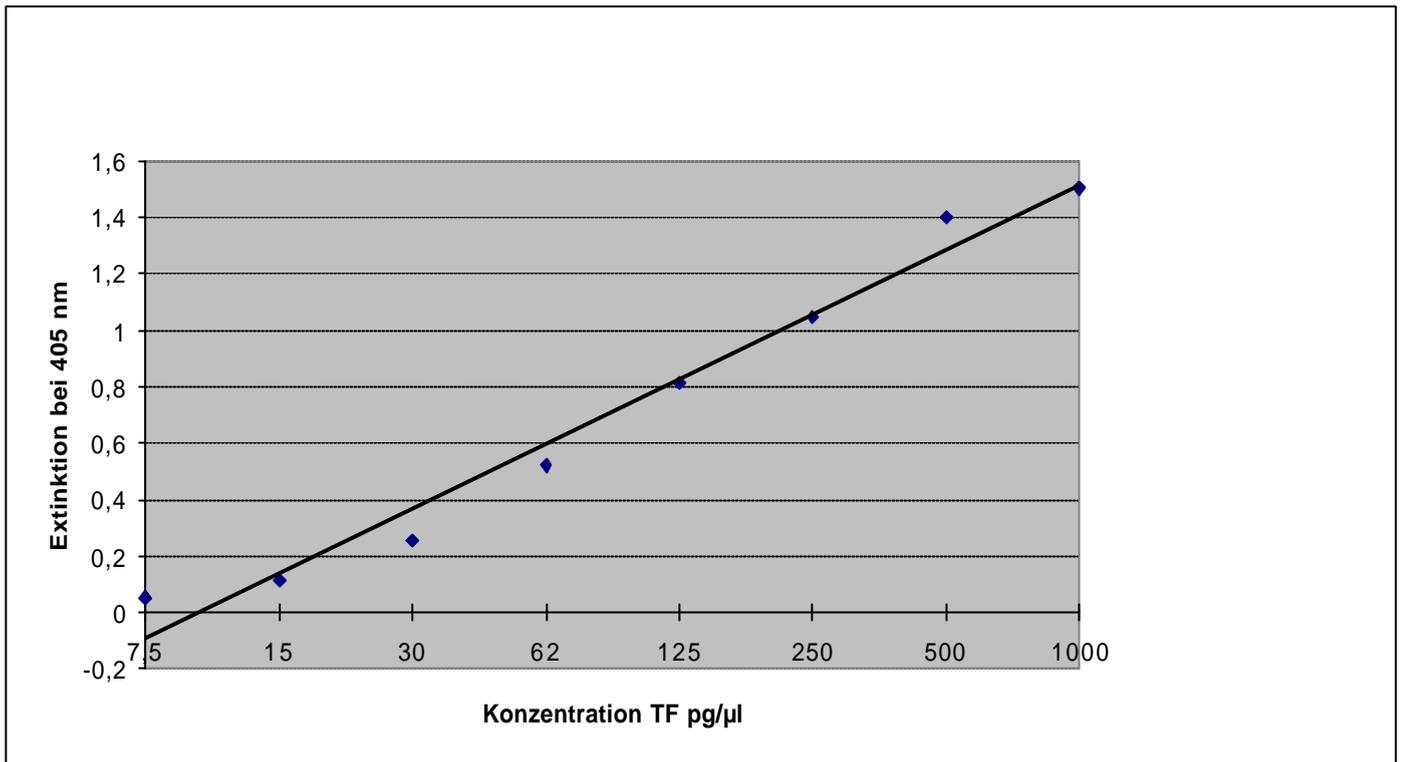


Abbildung 2.2.11: Standardkurve TNF- α IEMA

Zur Erstellung der Standardverdünnungskurve wurden die Konzentrationen 0 – 16 – 63 – 250 – 1000 pg/ml für TNF- α verwendet. Die Extinktionsergebnisse der verwendeten Proben wurden nach Vergleich mit der Standardverdünnungskurve in die Maßeinheit pg/10⁶ Zellen für TNF- α umgerechnet. Der Assay für TNF- α ist bis zu einer Konzentration von 1000 pg/ml genau. Proben, die höhere Konzentrationen durch höhere Extinktionsergebnisse (> 2,418) anzeigten, wurden mit einem Diluent weiterverdünnt und berechnet.

2.2.12 Messung der Interleukin-6-Aktivität

Der hier verwendete Interleukin-6 IEMA (Enzymimmunoassay) der Firma Company Coulter/ Immunotech (Marseille/Frankreich) ist ebenfalls ein sogenannter „Sandwich“-Enzym-Assay, der wie der TNF- α IEMA funktioniert. Probenvorbereitung und Versuchsbedingungen waren die gleichen wie bei dem TNF- α IEMA beschrieben. Als Standardreihe erhält man hier durch eine Verdünnungsreihe die Konzentrationen 0 - 4 - 16 - 63 - 250 - 1000 pg/ml für Interleukin-6 (*Abbildung 2.2.12*).

Die Proben wurden 1:2 (LPS-freie Probe) und 1:30 (LPS-stimulierte Probe) mit einem Sample-Puffer verdünnt. Auch bei dem IL-6 IEMA wurde mit Doppelbestimmungen gearbeitet.

Je 100 μ l der Standardreagenzien und der zu messenden Proben wurden zusammen mit 100 μ l monoklonalen Antikörper enthaltendem Konjugat in die jeweiligen antikörperbeschichteten Lochfelder der Mikrotiterplatte (0,4 ml Loch-Zellkulturplatte) pipettiert und inkubierten hier für 120 Minuten lichtgeschützt mit einer Alufolie bei Raumtemperatur auf einem Schüttler bei 350 rpm. Nach der Inkubationszeit wurden die Lochfelder dreimal mit einer Waschlösung gewaschen. Anschließend wurden 200 μ l der für den IL-6 IEMA mitgelieferten Substratlösung in jedes Feld gegeben und inkubierten hier für weitere 30 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurden in jedes Feld 50 μ l der Stopplösung (Tacrine, ein reversibler Inhibitor der Acetylcholinesterase-Aktivität) gegeben. Damit wurde die Reaktion in den Lochfeldern beendet. Nun erfolgte die Messung der Extinktion im Plattenphotometer bei 405 nm. Die Konzentrationen der zu messenden Proben wurden dann durch Umrechnung mit der Standardkurve bestimmt. Der IL-6 IEMA war bis zu einer Konzentration von IL-6 1000 pg/ml (= Extinktion 1,48) genau. Proben, die eine höhere Konzentration aufwiesen, wurden mittels eines Diluent weiterverdünnt und berechnet.

In probenfreiem Medium (MSFM und Humanserum 2%) konnte im IEMA kein IL-6 nachgewiesen werden.

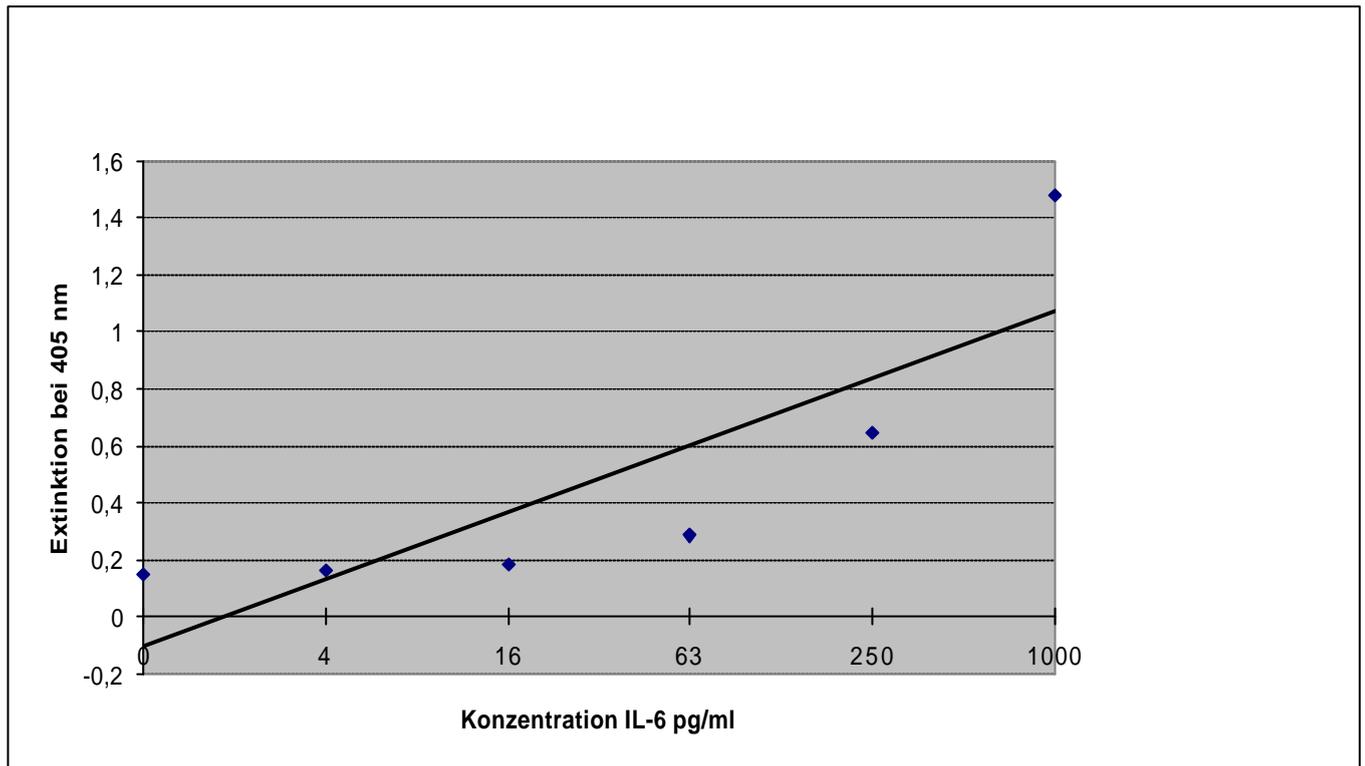


Abbildung 2.2.12: Standardkurve IL-6 IEMA

Die Standardverdünnungskurve wurde mit den Konzentrationen 0 – 4 – 16 – 63 – 250 – 1000 pg/ml für IL-6 erstellt. Bis zu einer Extinktion von 1,48 (=1000 pg/ml) erwies sich der IL-6 IEMA als genau. Durch Vergleich der Extinktionsergebnisse der gemessenen Proben mit der Standardkurve wurden die Meßergebnisse der Proben in $\text{pg}/10^6$ Zellen für IL-6 angegeben. Bei Konzentrationen der Proben über 1000 pg/ml wurden diese mit einem Diluent weiterverdünnt und berechnet.

2.2.13 Ruhende und LPS-exponierte Zellen

Für jeden Probanden wurden ein Basal- sowie ein LPS-Stimulationswert für die Proteine Tissue Factor, TNF- α und Interleukin-6 in den verschiedenen Experimenten ermittelt.

Der Basalwert wurde bei ruhenden Zellen, d.h. bei Monozyten, die nicht mit LPS stimuliert wurden, bestimmt. Dieser Wert sollte die basale Aktivität der Zellen wiedergeben. Vom Basalwert aus ließ sich ablesen, ob eine Stimulierung mit LPS in der LPS-exponierten Zellprobe vorlag und wie stark die monozytäre Reaktion auf Endotoxin für jeden Probanden war. Die Differenz zwischen Basalwert und LPS-Stimulationswert läßt auf das Ausmaß der Stimulierbarkeit mit Endotoxin schließen.

Für die vier Meßmethoden existieren keine Normwerte, anhand derer sich die in der vorgestellten Studie ermittelten Meßergebnisse vergleichen ließen, da die hier verwendeten Experimente keine Standardlabormethoden darstellen. Es handelte sich sowohl bei den

Basalwerten für TF, TNF- α und IL-6, als auch bei den jeweiligen Meßwerten nach Stimulation der Monozyten mit Lipopolysaccharid um individuelle Meßergebnisse.

Die Zellen, die zur Ermittlung der Basalwerte und der LPS-Stimulationswerte verwendet wurden, entstammten den selben Zellisolutions- und Kultivierungsreihen für jeden einzelnen Probanden.

2.2.14 Auswertung und Statistik

Die Daten der Fragebögen sowie die einzelnen Meßergebnisse wurden mittels Eingabe in Microsoft-Excel '97 registriert.

Die statistische Auswertung der Daten der Studienteilnehmer (Fragebogen) und der Meßergebnisse erfolgte mit dem Programm SPSS/PC+.

Die Verteilung der Merkmale Alter, Geschlecht, Rauchen/Nichtrauchen, Einnahme oraler Kontrazeptiva versus keine Einnahme oraler Kontrazeptiva sowie die Kombination von Rauchen und oralen Kontrazeptiva innerhalb der drei Polymorphismusgruppen wurde statistisch durch Kreuztabellen mit Chiquadrat-Test verglichen.

Für die statistische Analyse der Meßergebnisse der drei Genpolymorphismusgruppen im Vergleich wurde der ANOVA-Test (einfaktorielle Varianzanalyse) verwendet. Die Signifikanzprüfung erfolgte anschließend mit dem Scheffe-Test auf der Grundlage eines Signifikanzniveaus von $p \leq 0,05$. Die Daten wurden als Mittelwert \pm SEM (Standardfehler des Median) und Spannweite (Minimum und Maximum) der drei Genotypen angegeben. Die statistischen Analysen wurden graphisch mit dem Programm Excel '97 für Windows '98 dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Verteilung der Genotypen und Merkmale

Die Versuchsteilnehmer wurden durch Genotypisierung mittels SSCP-Analyse drei DNA-Gruppen (CC, CT, TT) zugeordnet. Die Genotypzugehörigkeit und die mit einem Fragebogen ermittelten Merkmale sind in den folgenden Tabellen dargestellt (Tabellen 3.1a – 3.1c). Die Daten wurden in Absolutzahlen (fett gedruckt) und in Prozentzahlen (in Klammern) angegeben.

Merkmal n	Gesamt- population (n)	Genotyp CC (n)	Genotyp CT (n)	Genotyp TT (n)
Probanden	120 (100%)	38 (31,6%)	56 (46,7%)	26 (21,7%)
Männer	72 (60%)	21 (29%)	36 (50%)	15 (21%)
Frauen	48 (40%)	17 (35%)	20 (42%)	11 (23%)

Tabelle 3.1a: Gesamtpopulation und Geschlechtsverteilung in den drei Genpolymorphismusgruppen

Merkmal n	Gesamt- population (n)	Genotyp CC (n)	Genotyp CT (n)	Genotyp TT (n)
Männer	72 (100%)	21 (29%)	36 (50%)	15 (21%)
Nichtraucher	49 (68%)	12 (24,5%)	25 (51%)	12 (24,5%)
Raucher	23 (32%)	9 (39%)	11 (48%)	3 (13%)

Tabelle 3.1b: Verteilung der männlichen Studienteilnehmer auf die drei Genotypen und Darstellung von männlichen Rauchern versus Nichtrauchern

Merkmal n	Gesamt- population (n)	Genotyp CC (n)	Genotyp CT (n)	Genotyp TT (n)
Frauen	48 (100%)	17 (35%)	20 (42%)	11 (23%)
Nichtraucherin	15 (31%)	5 (33%)	4 (27%)	6 (40%)
Raucherin	12 (25%)	3 (25%)	6 (50%)	3 (25%)
Kontrazeptiva	13 (27%)	7 (54%)	4 (31%)	2 (15%)
Rauchen + Kontrazeptiva	8 (17%)	2 (25%)	6 (75%)	0 (0%)

Tabelle 3.1c: Darstellung der weiblichen Studienteilnehmerinnen sowie der Merkmale Rauchen, Nichtrauchen, orale Kontrazeptiva und Kombination Rauchen/ Kontrazeptiva

Die Verteilung der Genotypen in der Studiengruppe, die 120 gesunde Testpersonen umfaßte, lag bei 38 CC (31,6%), 56 CT (46,7%) und 26 TT (21,7%). Es nahmen insgesamt 72 Männer (davon 21 CC, 36 CT, 15 TT) und 48 Frauen (davon 17 CC, 20 CT, 11 TT) teil.

Von den 72 Männern rauchten 23 (davon 9 CC, 11 CT, 3 TT), 49 nicht (davon 12 CC, 25 CT, 12 TT). Bei den Frauen gab es 15 „reine“ Nichtraucherinnen (davon 5 CC, 4 CT, 6 TT) und 12 „reine“ Raucherinnen (davon 3 CC, 6 CT, 3 TT). Insgesamt nahmen 13 Frauen die Pille (davon 7 CC, 4 CT, 2 TT) und 8 Frauen nahmen die Pille und rauchten (davon 2 CC, 6 CT, 0 TT).

In der Gesamtpopulation lag das Durchschnittsalter bei 26 Jahren (Spannweite 20 – 43 Jahre). Das Durchschnittsalter in den drei Genpolymorphismusgruppen lag jeweils ebenfalls bei 26 Jahren (Spannweiten CC 20 – 43 Jahre, CT 20 – 43 Jahre, TT 21 – 42 Jahre).

Die drei DNA-Gruppen unterschieden sich nicht signifikant bezüglich der Merkmale Alter, Geschlecht, Rauchen/Nichtrauchen, Einnahme oraler Kontrazeptiva versus keine Einnahme oraler Kontrazeptiva sowie in der Kombination von Rauchen und oralen Kontrazeptiva.

3.2 Meßergebnisse und statistische Analyse

3.2.1 Tissue Factor: Messung der prokoagulatorischen Aktivität als Maß für die TF-Konzentration

CC		CT		TT	
B	LPS	B	LPS	B	LPS
860	1350	70	1125	260	2750
380	1800	20	750	520	1350
130	2250	66	1350	13	1025
400	2200	1250	2250	1800	3050
250	1800	1025	2000	300	1650
120	2000	62	1500	260	2000
315	2000	290	2750	145	750
200	1025	280	600	430	1800
700	1250	600	1800	230	1025
460	5100	1025	3900	520	1350
90	1125	260	800	800	2750
190	950	260	1650	1125	3900
145	2250	330	1500	860	3900
130	1025	460	1250	50	1025
50	860	570	2000	50	950
34	750	950	2450	40	1025
700	2750	570	950	135	950
520	2750	520	3050	210	3050
230	1500	520	2450	50	1250
64	1025	165	1650	180	1250
60	950	135	2250	310	2750
36	1125	10,3	650	50	1125
60	1350	860	3500	125	1650
220	700	140	2450	9,6	430
50	2250	47	1025	100	1500
220	2000	230	2750	20	1025
650	1650	260	2000		
950	1800	12	600		
570	1125	160	1025		
430	1650	62	1025		
280	1350	40	650		
115	2000	1800	3050		
300	2000	1350	3500		
160	2250	950	2750		
41	1025	410	2450		
125	1800	260	2000		
260	950	950	2250		
50	1125	750	3050		
		300	570		
		860	2750		
		260	600		
		115	2250		
		50	1350		
		380	2450		
		190	2450		
		300	1350		
		17	600		
		100	1650		
		66	1350		
		37	950		
		210	3050		
		180	2000		
		300	1500		
		45	650		
		120	1650		
		35	800		

Tabelle 3.2.1: Gegenüberstellung von individuellen Basalwerten (B) und Stimulationswerten (LPS), Angabe der Tissue Factor-Aktivität in $mU/10^6$ Zellen

Die vorliegenden PCA-Meßergebnisse ergaben für jeden Probanden einen Basal- und einen LPS-Stimulationswert (Tabelle 3.2.1). Die Analyse dieser Ergebnisse zeigte eine deutliche monozytäre Reaktion auf den LPS-Stimulus bei jedem Probanden.

Bei Betrachtung der Meßwerte für unstimulierte und stimulierte Zellen zeigte sich, daß ein niedriger bzw. hoher Basalwert nicht zwangsläufig mit einem niedrigen bzw. hohen PCA-Wert nach LPS-Stimulation korrelierte. Die Monozyten der Probanden reagierten unabhängig vom basalen Ausgangswert individuell unterschiedlich auf den Endotoxin-Stimulus.

Die Spannweiten (Minimum und Maximum) der Meßergebnisse in den drei Genpolymorphismusgruppen kamen durch Probanden zustande, die basal eine sehr niedrige bzw. hohe TF-Aktivität und nach

LPS-Stimulation niedrige bzw. hohe PCA-Werte zeigten. Basal konnte in Gruppe CC eine 27,9-fache, in Gruppe CT eine 174,8-fache und in Gruppe TT eine 187,5-fache Erhöhung zwischen niedrigstem und höchstem PCA-Wert ermittelt werden. Für die LPS-Stimulationswerte lag bei Gruppe CC eine 7,2-fache, bei Gruppe CT eine 6,8-fache und bei Gruppe TT eine 9,1-fache Erhöhung von niedrigstem versus höchstem PCA-Meßwert vor.

In der vorliegenden Studie wurde für sogenannte Lowresponder (LR) ein PCA-Wert nach LPS-Stimulation von $\leq 900 \text{ mU}/10^6$ Zellen festgelegt. Insgesamt erfüllten 16 (13%) Probanden dieses Kriterium, davon 3 CC (18%), 11 CT (69%) und 2 TT (13%). Für Highresponder (HR) wurde eine TF-Aktivität von $\geq 3000 \text{ mU}/10^6$ Zellen bestimmt. 12 (10%) Probanden der gesamten Studiengruppe, davon 1 CC (8,3%), 7 CT (58,3%) und 4 TT (33,3%), zeigten eine entsprechende Aktivität.

3.2.1.1 Tissue Factor: Statistische Analyse der Basalaktivität als Maß der basalen TF-Konzentration

CD14/ Genotypen	n	Mittelwert	SEM	Minimum	Maximum	P
CC	38	277,5	39,5	34	950	
CT	56	380,1	53	10,3	1800	
TT	26	330,5	81	9,6	1800	
Gesamt	120	336,8	32,8	9,6	1800	Ns

Tabelle 3.2.1.1: PCA als Maß für die TF-Konzentration/Basalwerte, Angabe der Tissue Factor-Aktivität in $\text{mU}/10^6$ Zellen (ns: nicht signifikant)

Bei den Basalwerten der Probanden konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Allelgruppen gezeigt werden. Dabei wurden insgesamt 120 Proben (CC 38, CT 56, TT 26) untersucht. Die Tissue Factor-Aktivität wurde bei den drei Versuchsgruppen mit einem Mittelwert in der Gruppe CC $277,5 \pm 39,5 \text{ mU}/10^6$ Zellen (Spannweite 34 – 950) versus der Gruppe CT $380,1 \pm 53 \text{ mU}/10^6$ Zellen (Spannweite 10,3 – 1800) und der Gruppe TT $330,5 \pm 81 \text{ mU}/10^6$ Zellen (Spannweite 9,6 – 1800) berechnet. Für die Gesamtzahl der Studienteilnehmer wurde der Mittelwert mit $336,8 \pm 32,8 \text{ mU}/10^6$ Zellen (Spannweite 9,6 – 1800) angegeben.

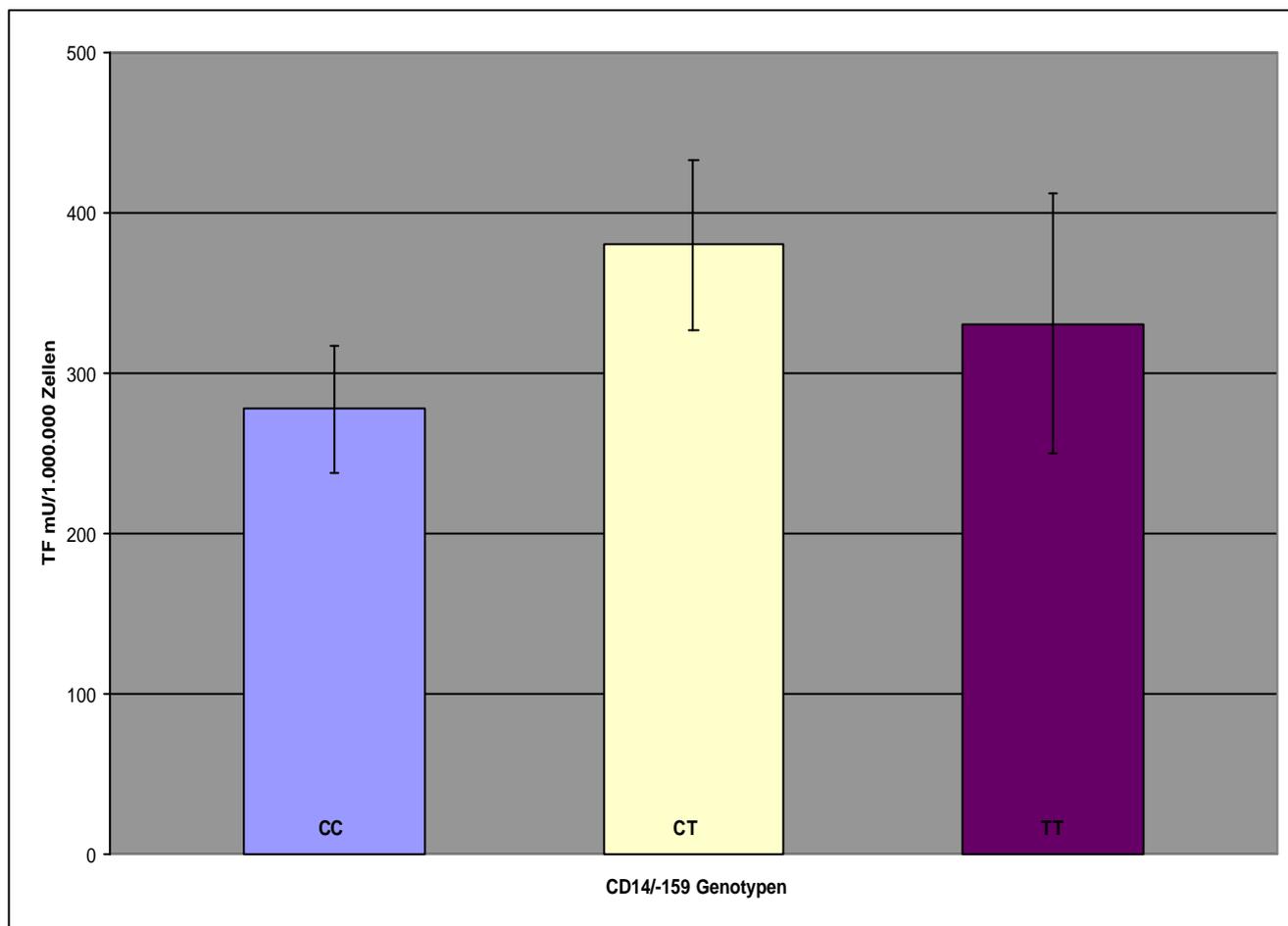


Abbildung 3.2.1.1: PCA als Maß für die TF-Konzentration/Basalwerte, Darstellung von Mittelwert und SEM: CC ($277,5 \pm 39,5$), CT ($380,1 \pm 53$), TT ($336,8 \pm 32,8$), $p = ns$

3.2.1.2 Tissue Factor: Statistische Analyse der TF-Aktivität nach LPS-Stimulation der Zellen

CD14/ Genotypen	n	Mittelwert	SEM	Minimum	Maximum	P
CC	38	1741,5	129,8	700	5100	
CT	56	1798,6	118	570	3900	
TT	26	1659,2	190,7	430	3900	
Gesamt	120	1740,5	79,8	430	5100	Ns

Tabelle 3.2.1.2: PCA als Maß für die TF-Konzentration/nach LPS-Stimulation, Angabe der Tissue Factor-Aktivität in mU/10⁶ Zellen (ns: nicht signifikant)

Die prokoagulatorische Aktivität wurde bei insgesamt 120 Probanden (CC 38, CT 56, TT 26) gemessen.

Nach siebenstündiger Stimulation mit LPS und anschließender Lyse der Monozyten wurde für die TF-Aktivität ein Mittelwert für die Gruppe CC $1741,5 \pm 129,8$ mU/10⁶ Zellen (Spannweite 700 – 5100), für die Gruppe CT $1798,6 \pm 118$ mU/10⁶ Zellen (Spannweite 570 – 3900) und für die Gruppe TT $1659,2 \pm 190,7$ mU/10⁶ Zellen (Spannweite 430 – 3900) berechnet. Total lag der Mittelwert bei $1740,5 \pm 79,8$ mU/10⁶ Zellen (Spannweite 430 – 5100). Die statistische Analyse ergab keinen signifikanten Unterschied der drei Allelgruppen untereinander.

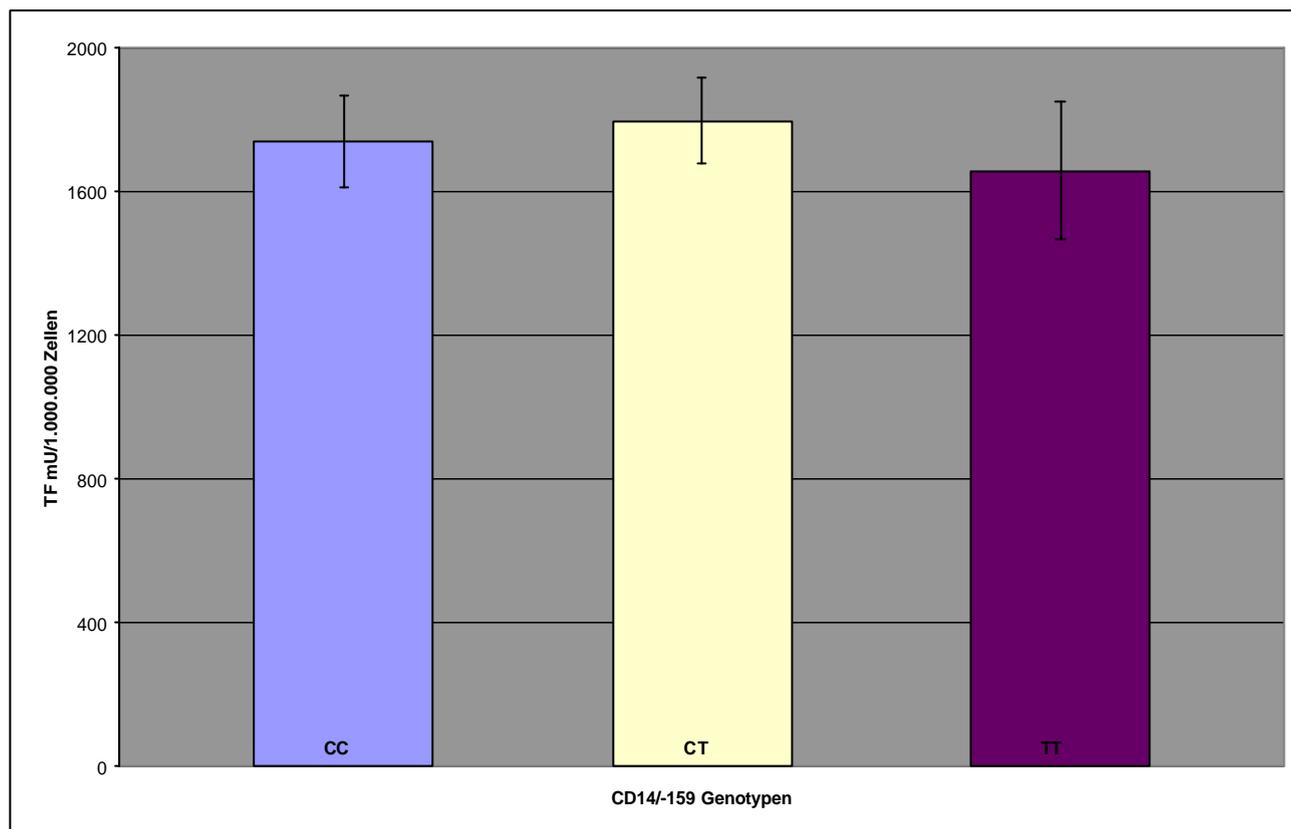


Abbildung 3.2.1.2: PCA als Maß für die TF-Konzentration/nach LPS-Stimulation, Darstellung von Mittelwert und SEM: CC (1741,5 ± 129,8), CT (1798,6 ± 118), TT (1659 ± 190,7), $p = ns$

3.2.1.3 Multivarianzanalysen und weitere statistische Untersuchungen

Multivarianzanalysen, bei denen der biallele (-159 T/C) Promotorpolymorphismus mit verschiedenen Merkmalen der Probanden gekoppelt wurde, zeigten keine signifikanten Ergebnisse. Nikotin, orale Kontrazeptiva und Geschlecht hatten hier keinen signifikanten Einfluß auf die Tissue Factor-Aktivität.

Weitere statistische Untersuchungen, mit denen die TF-Aktivität zwischen Männern und Frauen, männlichen Rauchern und Nichtrauchern, männlichen und weiblichen Rauchern, männlichen und weiblichen Nichtrauchern (Wilcox-Test) sowie zwischen Nichtraucherinnen, Raucherinnen, Nichtraucherinnen bzw. Raucherinnen mit Kontrazeptivaeinnahme (ANOVA-Test) verglichen, konnten keine signifikanten Unterschiede nachweisen.

3.2.2 Tissue Factor: Ermittlung der TF-Konzentration basal und nach LPS-Stimulation

In der *Tabelle 3.2.2* wurden die jeweiligen TF-Basal- und LPS-Stimulationswerte dargestellt.

<u>CC</u>		<u>CT</u>		<u>TT</u>	
B	LPS	B	LPS	B	LPS
47,13	218,5	18,75	750	11,25	375
45	445,3	16,875	187	107	250
13,1	93	20,625	206,7	3,75	179,25
27	325	83	300	12	102
9,375	171,5	20,625	89,125	22,5	160
45	220	36	255	40	266
59,875	121	53,5	103	13,125	71,687
11,25	812,5	375	875	9,375	218,5
73,625	371	13,2	121	28	285
40	420	9,375	85,25	25	183
		13,125	101		

Tabelle 3.2.2: Darstellung von Basal (B) - und LPS-Stimulationswerten (LPS), Angabe von TF in pg/10⁶ Zellen

Die stimulierten Monozyten der einzelnen Versuchsteilnehmer reagierten im Vergleich mit den unstimulierten Zellen auf eine Endotoxinexposition mit einer erhöhten TF-Expression.

Die extreme Spannweite für die Basalwerte in Gruppe CT ergab sich durch einen sehr hohen basalen Meßwert eines Probanden für Tissue Factor.

Basal lag bei Gruppe CC eine 7,9-fache, bei Gruppe CT eine 40-fache und bei Gruppe TT eine 29-fache Differenz zwischen niedrigstem und höchstem TF-Wert vor. Bei den LPS-Stimulationswerten zeigte sich in Gruppe CC eine 8,7-fache, bei Gruppe CT eine 8,7-fache und bei Gruppe TT eine 5,2-fache Erhöhung zwischen dem niedrigsten und höchsten Meßwert.

Wie schon bei den PCA-Werten korrelierten bei dem chromogenen TF-Assay ein niedriger bzw. hoher Basalwert nicht zwangsläufig mit einem niedrigen bzw. hohen LPS-Stimulationswert, wobei der eine Proband mit dem extrem hohen Basalmeßwert ebenfalls die höchste TF-Aktivität in der Probe nach LPS-Exposition aufwies.

3.2.2.1 Tissue Factor: statistische Analyse der Basalwerte mit dem chromogenen TF-Assay

CD14/ Genotypen	n	Mittelwert	SEM	Minimum	Maximum	P
CC	10	37,1	6,8	9,4	73,6	
CT	11	60	32	9,4	375	
TT	10	27,2	9,5	3,7	107	
Gesamt	31	42	11,4	3,7	375	Ns

Tabelle 3.2.2.1: TF (chromogener TF-Assay)/Basalwerte, Angabe von Tissue Factor in pg/10⁶ Zellen (ns: nicht signifikant)

Mit dem chromogenen TF-Assay wurde der basale Tissue Factor-Proteingehalt von 31 Proben (CC 10, CT 11, TT 10) bestimmt. Der Mittelwert lag insgesamt bei $42 \text{ pg}/10^6 \pm 11,4$ Zellen (Spannweite 3,7 – 375). Der Mittelwert wurde für die Gruppe CC mit $37,1 \pm 6,8 \text{ pg}/10^6$ Zellen (Spannweite 9,4 – 73,6) versus der Gruppe CT mit $60 \pm 32 \text{ pg}/10^6$ Zellen (Spannweite 9,4 – 375) und der Gruppe TT mit $27,2 \text{ pg}/10^6 \pm 9,5$ Zellen (Spannweite 3,7 – 107) berechnet. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen gefunden werden.

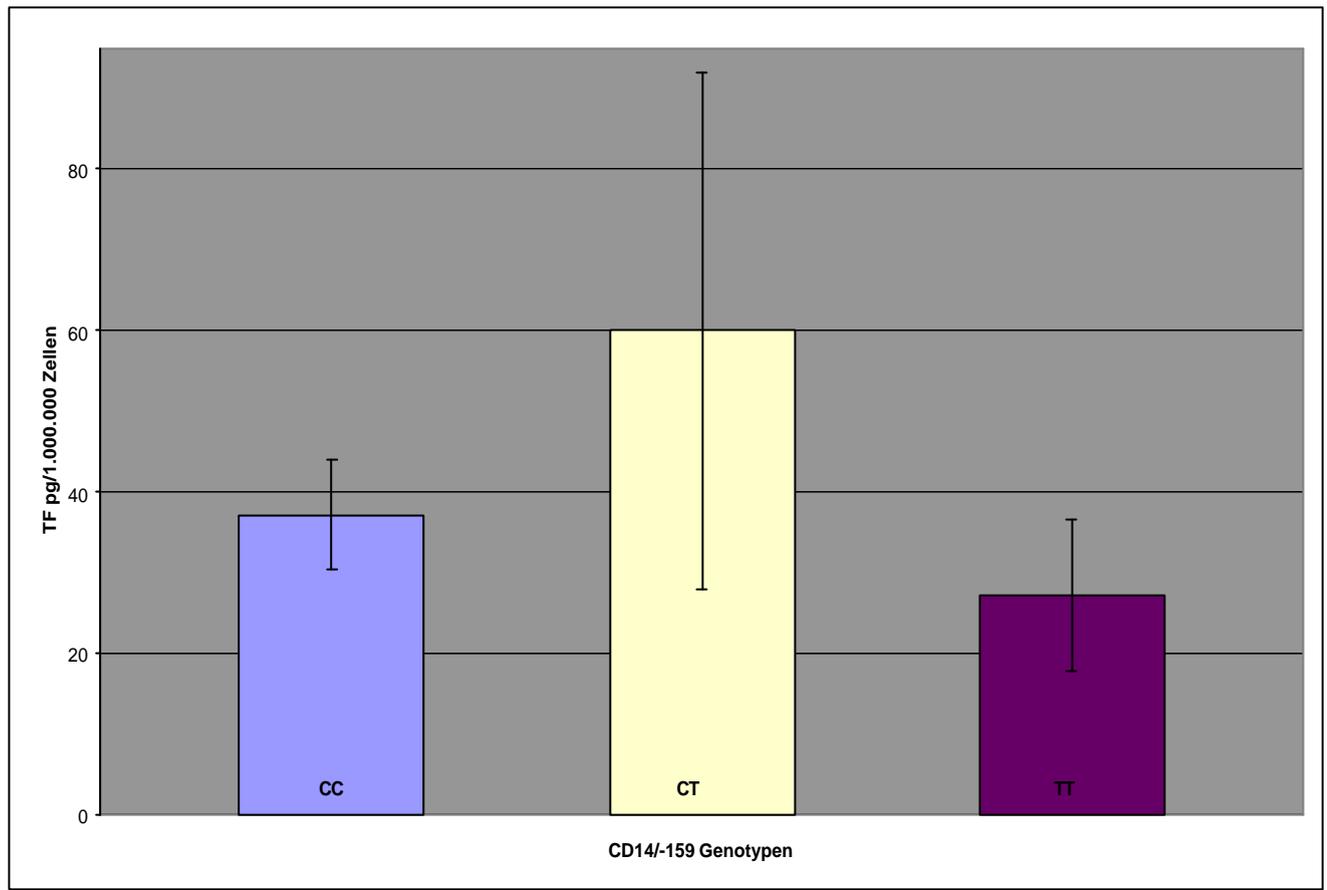


Abbildung 3.2.2.1: TF (chromogener TF-Assay)/Basalwerte, Darstellung von Mittelwert und SEM: CC (37,1 ± 6,8), CT (60 ± 32), TT (27,2 ± 9,5), $p = ns$

3.2.2.2 Tissue Factor: Statistische Analyse LPS-stimulierter Zellen mit dem chromogenen Tissue Factor-Assay

CD14/ Genotypen	n	Mittelwert	SEM	Minimum	Maximum	P
CC	10	319,8	67	93	812,5	
CT	11	279,4	82,7	85,3	875	
TT	10	209	28,4	71,7	375	
Gesamt	31	269,7	37,3	71,7	875	Ns

Tabelle 3.2.2.2: Tissue Factor (chromogener TF-Assay)/nach LPS-Stimulation, Angabe von Tissue Factor in $\text{pg}/10^6$ Zellen (ns: nicht signifikant)

Die Monozyten von insgesamt 31 Probanden (CC 10, CT 11, TT 10) zeigten nach Stimulation mit LPS im chromogenen TF-Assay keinen signifikanten Unterschied zwischen den drei Allelgruppen bezüglich des TF-Proteingehaltes. Der Mittelwert wurde für die Gruppe CC mit $319,8 \pm 67 \text{ pg}/10^6$ Zellen (Spannweite 93 – 812,5), für die Gruppe CT mit $279 \pm 82,7 \text{ pg}/10^6$ Zellen (Spannweite 85,3 – 875) und die Gruppe TT mit $209 \pm 28,4 \text{ pg}/10^6$ Zellen (Spannweite 71,7 – 375) angegeben. Insgesamt lag der Mittelwert der Probanden bei $269,7 \pm 37,3 \text{ pg}/10^6$ Zellen (Spannweite 71,7 – 875).

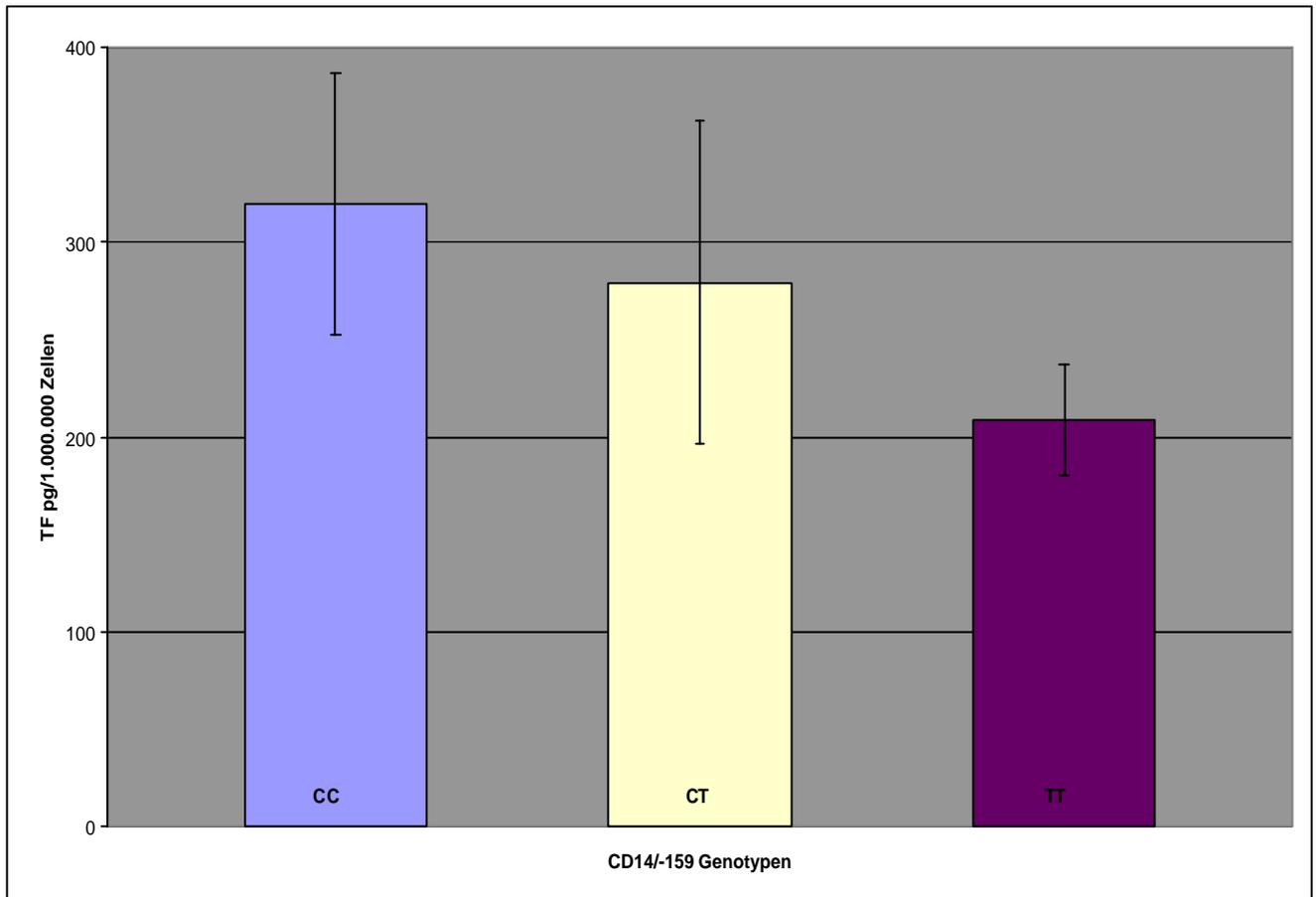


Abbildung 3.2.2.2: Tissue Factor (chromogener TF-Assay)/nach LPS-Stimulation, Darstellung von Mittelwert und SEM: CC (319,8 ± 67), CT (279,4 ± 82,7), TT (209 ± 28,4), $p = ns$

3.2.3 TNF- α : Ermittlung der Basal- und LPS-Stimulationswerte in den Monozytenüberständen mit dem TNF- α IEMA

In der folgenden Tabelle (3.2.3) wurden die einzelnen Basal- und LPS-Stimulationswerte gegenübergestellt.

<u>CC</u>		<u>CT</u>		<u>TT</u>	
B	LPS	B	LPS	B	LPS
43	270	42	840	44	5130
43	4590	43	3210	48	1110
50	2430	48	8700	49	2634
43	570	50	10662	43	2874
42	210	41	3990	43	2071
46	7290	42	2070	42	840
43	810	45	1050	40	780
47	270	40	300	44	1530
45	5100	40	6630	42	1800
51	2190	41	2820	40	2715
		40	1467		

Tabelle 3.2.3: Gegenüberstellung der individuellen Basal (B)- und Stimulationswerte (LPS) für TNF- α ($\text{pg}/10^6$ Zellen)

Basal zeigten sich relativ konstante Meßergebnisse (40-51 $\text{pg}/10^6$ Zellen) für die 31 Probanden. Auf eine LPS-Stimulation reagierte jeder einzelne Proband mit einer individuellen TNF- α -Synthese. Basal zeigte sich bei Gruppe CC eine 1,2-fache, bei Gruppe CT und TT jeweils eine 1,25-fache Steigerung von niedrigstem zu höchstem Meßwert. Zwischen niedrigstem und höchstem LPS-Stimulationswert lag in Gruppe CC eine 34,7-fache, in Gruppe CT eine 36-fache und in Gruppe TT eine 6,6-fache Erhöhung vor. Die größte Spannbreite der LPS-Stimulationswerte ergab sich in Gruppe CT (300 – 10662 $\text{pg}/10^6$ Zellen) und war durch einen Probanden mit einem sehr hohen TNF- α -Synthesewert bedingt.

3.2.3.1 *TNF- α* : Statistische Analyse der Basalwerte

CD14/ Genotypen	n	Mittelwert	SEM	Minimum	Maximum	P
CC	10	45,3	1	42	51	
CT	11	42,9	1	40	50	
TT	10	43,5	0,9	40	50	
Gesamt	31	43,9	0,6	40	51	Ns

Tabelle 3.2.3.1: *TNF- α* (IEMA)/ Basalwerte, Angabe von *TNF- α* in pg/10⁶ Zellen (ns: nicht signifikant)

Bei dem TNF- α Enzymimmunoassay wurden 31 Proben (CC 10, CT 11, TT 10) gemessen. Bei den Basalwerten lag der Mittelwert der Gruppe CC bei $45,3 \pm 1$ pg/10⁶ Zellen (Spannweite 42 – 50) versus der Gruppe CT $42,9 \pm 1$ pg/10⁶ Zellen (Spannweite 40 – 50) und der Gruppe TT $43,5 \pm 0,9$ pg/10⁶ Zellen (Spannweite 40 – 50). Für die Gesamtzahl der gemessenen Proben wurde der Mittelwert mit $43,9 \pm 0,6$ pg/10⁶ Zellen (Spannweite 40 – 51) berechnet. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen bei den TNF- α -Basalwerten ermittelt werden.

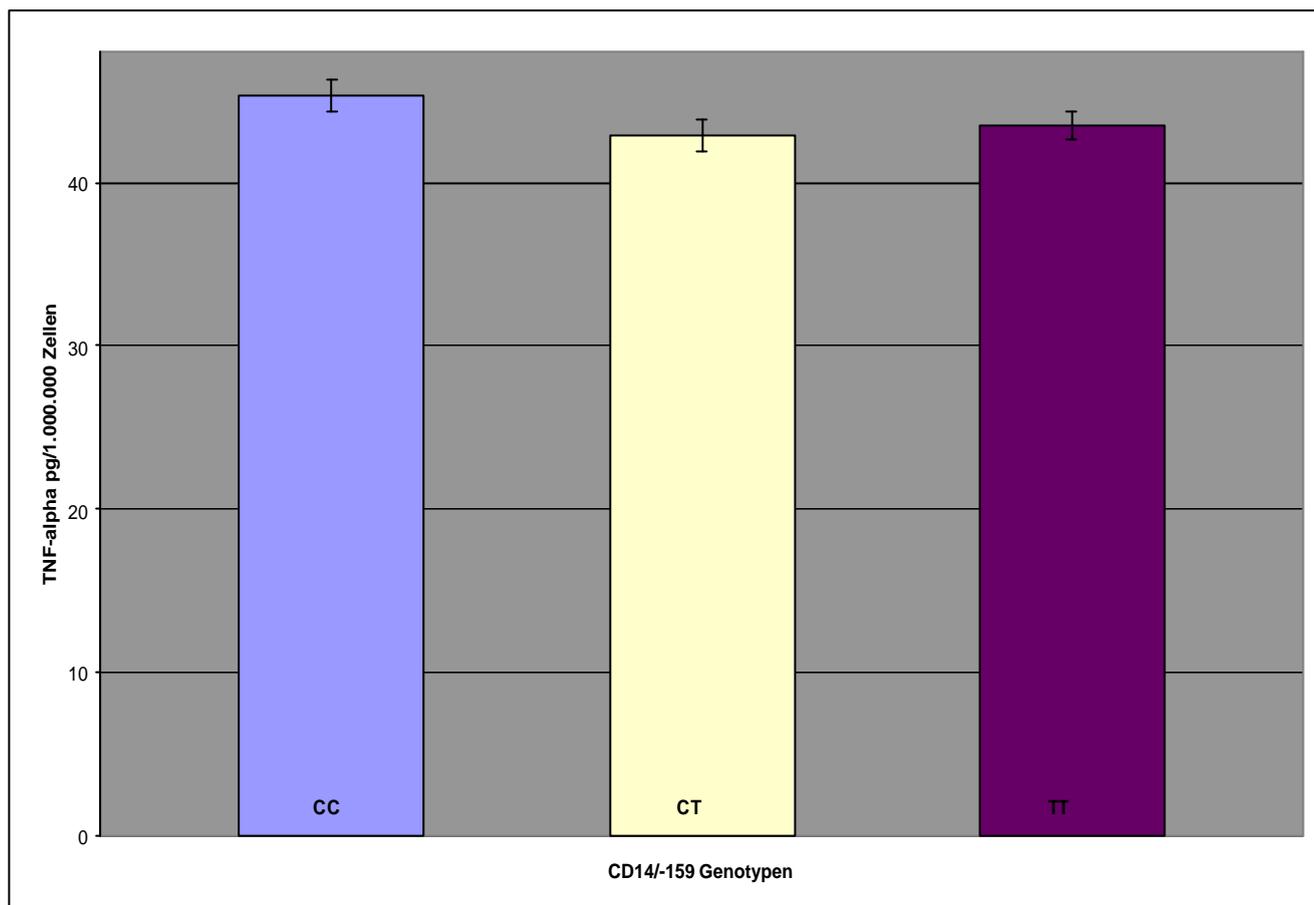


Abbildung 3.2.3.1: TNF- α (IEMA)/Basalwerte, Darstellung von Mittelwert und SEM: CC ($45,3 \pm 1$), CT ($42,9 \pm 1$), TT ($43,5 \pm 0,9$), $p = ns$

3.2.3.2 *TNF- α* : Statistische Analyse LPS-stimulierter Zellen

CD14/ Genotypen	n	Mittelwert	SEM	Minimum	Maximum	P
CC	10	2373	787,3	210	7289	
CT	11	3714,5	1033,4	300	10661	
TT	10	2148,4	410	780	5130	
Gesamt	31	2804,9	470	210	10661	Ns

Tabelle 3.2.3.2: *TNF- α* (IEMA)/nach LPS-Stimulation, Angabe von *TNF- α* in pg/10⁶ Zellen (ns: nicht signifikant)

Nach Stimulation mit LPS unterschieden sich die Zellen der drei Allelgruppen im *TNF- α* -IEMA nicht signifikant voneinander. Bei 31 untersuchten Proben (CC 10, CT 11, TT 10) wurde für die Gruppe CC der Mittelwert $2373 \pm 787,3$ pg/10⁶ Zellen (Spannweite 210 – 7289), für die Gruppe CT $3714,5 \pm 1033,4$ pg/10⁶ Zellen (Spannweite 300 – 10661) und die Gruppe TT $2148,4 \pm 410$ pg/10⁶ Zellen (Spannweite 780 – 5130) bei einem Gesamtmittelwert von $2804,9 \pm 470$ pg/10⁶ Zellen (Spannweite 210 – 10661) ermittelt.

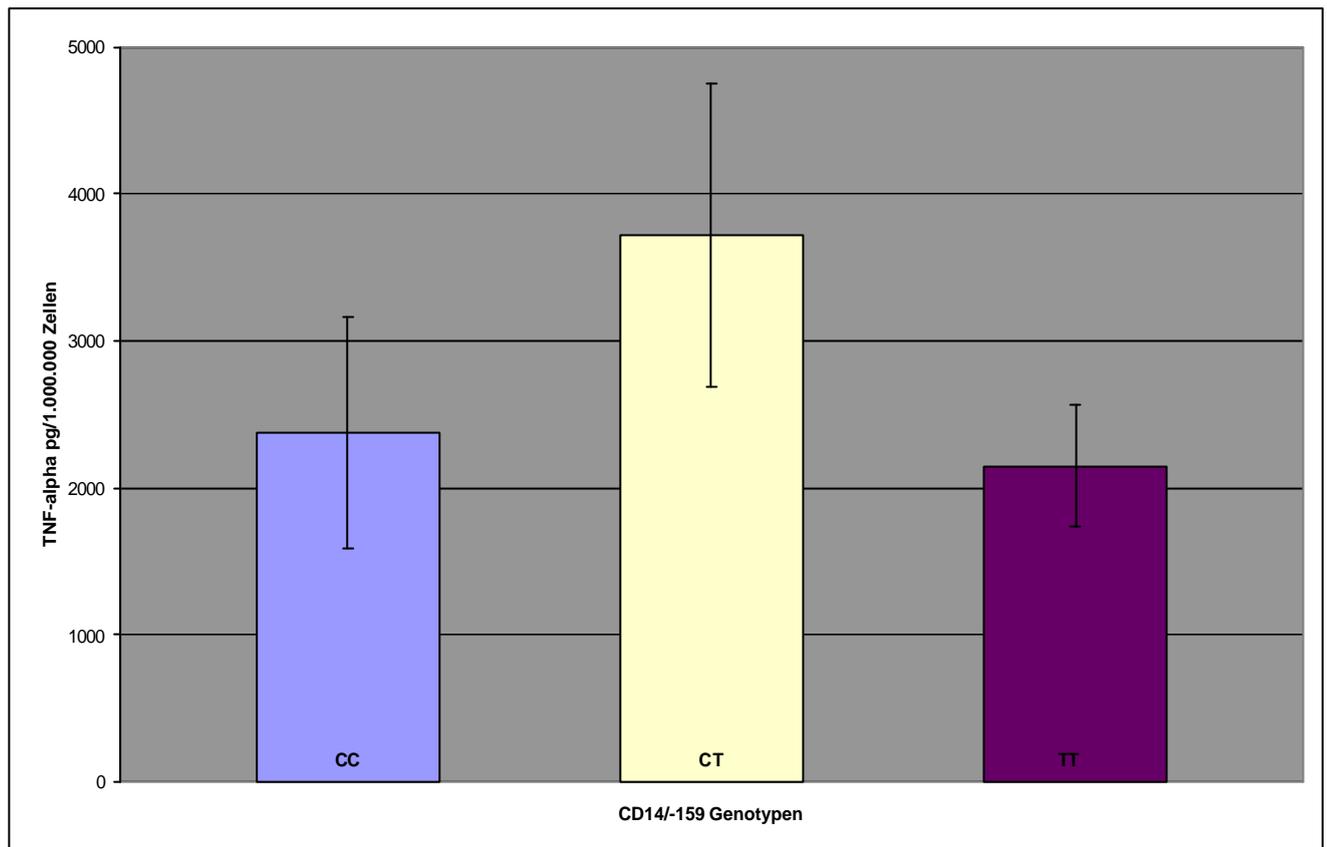


Abbildung 3.2.3.2: TNF- α (IEMA)/nach LPS-Stimulation, Darstellung von Mittelwert und SEM: CC ($2373 \pm 787,3$), CT ($3714,5 \pm 1033,4$), TT ($2148,4 \pm 410$), $p = ns$

3.2.4 IL-6: Ermittlung der Basal- und LPS-Stimulationswerte in den Monozytenüberständen mit dem IL-6 IEMA

Basal- und Stimulationswerte für jeden Probanden wurden in der *Tabelle 3.2.4* dargestellt.

<u>CC</u>		<u>CT</u>		<u>TT</u>	
B	LPS	B	LPS	B	LPS
25	90	15	270	15	2328
15	1830	12	330	20	150
15	240	15	2370	15	2853
12	390	15	3660	187	3828
13	150	15	300	15	3105
10	1206	15	480	12	240
10	240	15	150	18	570
12	270	15	3210	15	870
15	1104	15	3810	15	450
15	300	17	5610	15	2715
		123	2721		

Tabelle 3.2.4: Darstellung der individuellen Meßergebnisse basal (B) und nach LPS-Stimulation (LPS) für IL-6 (pg/10⁶ Zellen)

Für IL-6 ergaben sich bei jedem Probanden ein Basal- und ein LPS-Stimulationswert.

Die extremen Spannweiten für die Basalwerte in den Gruppen CT und TT kamen durch jeweils einen sehr hohen Meßwert zustande. Ansonsten lagen basal die Synthesewerte für IL-6 relativ konstant zwischen 10 und 25 pg/10⁶ Zellen. Zwischen niedrigstem und höchstem Basalwert lag in Gruppe CC eine 2,5-fache, in Gruppe CT eine 10,25-fache und in Gruppe TT eine 18,7-fache Erhöhung vor. Auf einen LPS-Stimulus reagierten die Zellen jedes Probanden mit einer deutlich erhöhten IL-6-Synthese, deren Ausmaß jedoch unabhängig vom Basalwert war. In Gruppe CC lag eine 20-fache, in Gruppe CT eine 37,4-fache und in Gruppe TT eine 25,5-fache Erhöhung zwischen niedrigstem und höchstem IL-6-Meßwert nach Stimulation vor.

3.2.4.1 IL-6: Statistische Analyse der IL-6-Basalwerte

CD14/ Genotypen	n	Mittelwert	SEM	Minimum	Maximum	P
CC	10	14,2	1,4	10	25	
CT	11	24,7	9,8	12	123	
TT	10	32,7	17,2	12	187	
Gesamt	31	23,9	6,5	10	187	Ns

Tabelle 3.2.4.1: IL-6 (IEMA)/Basalwerte, Angabe von IL-6 in pg/10⁶ Zellen (ns: nicht signifikant)

Insgesamt wurden mit dem IL-6-IEMA 31 Proben (CC 10, CT 11, TT 10) zur Messung verwendet. Für die Gesamtzahl der Proben lag der Mittelwert bei $23,9 \pm 6,5$ pg/10⁶ Zellen (Spannweite 10 – 187). Gruppe CC wies einen Mittelwert von $14,2 \pm 1,4$ pg/10⁶ Zellen (Spannweite 10 – 25) versus Gruppe CT $24,7 \pm 9,8$ pg/10⁶ Zellen (Spannweite 12 – 122) und versus Gruppe TT $32,7 \pm 17,2$ pg/10⁶ Zellen (Spannweite 12 – 187) auf. Die drei Gruppen unterschieden sich statistisch nicht signifikant voneinander.

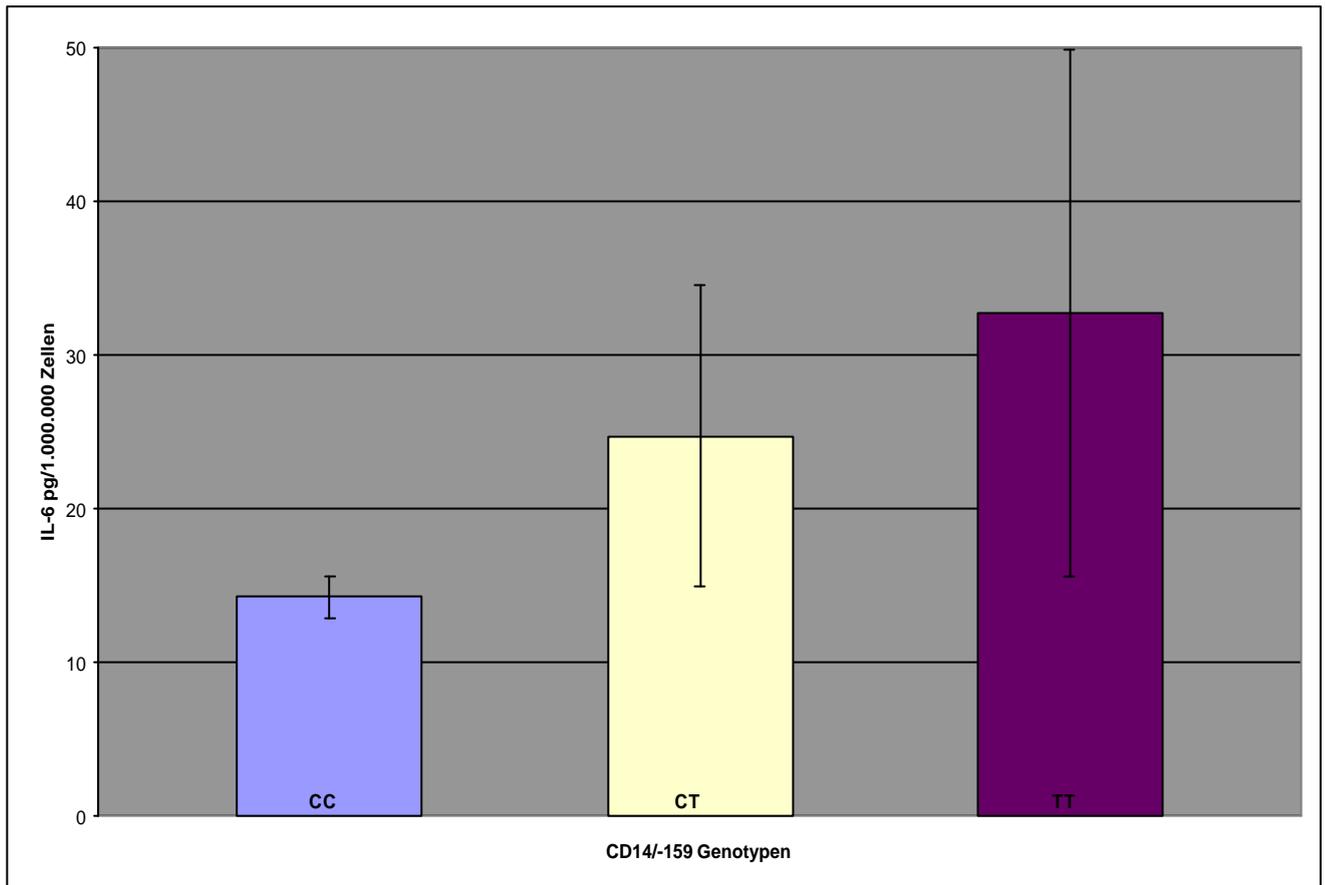


Abbildung 3.2.4.1: IL-6 (IEMA)/Basalwerte, Darstellung von Mittelwert und SEM: CC (14,2 ± 1,4), CT (24,7 ± 9,8), TT (32,7 ± 17,2), $p = ns$

3.2.4.2 IL-6: Statistische Analyse LPS-stimulierter Zellen

CD14/ Genotypen	n	Mittelwert	SEM	Minimum	Maximum	P
CC	10	582	176	90	1830	
CT	11	2082,8	568	150	5610	
TT	10	1710	438,7	150	3828	
Gesamt	31	1478,7	271	90	5610	0,08

Tabelle 3.2.4.2: IL-6 (IEMA)/ nach LPS-Stimulation, Angabe von IL-6 in $\text{pg}/10^6$ Zellen ($p = 0,08$)

Interleukin-6 wurde bei 31 Probanden (CC 10, CT 11, TT 10) in den Überständen nach Stimulation mit LPS bestimmt. Insgesamt wurde ein Mittelwert von $1478,7 \pm 271 \text{ pg}/10^6$ Zellen (Spannweite 90 – 5610) berechnet. Die Gruppe CC (Mittelwert $582 \pm 176 \text{ pg}/10^6$ Zellen, Spannweite 90 – 1830) zeigte tendenziell niedrigere Meßwerte als die beiden T-Allelgruppen CT (Mittelwert $2082,8 \pm 568 \text{ pg}/10^6$ Zellen, Spannweite 150 – 5610) und TT (Mittelwert $1710 \pm 438,7 \text{ pg}/10^6$ Zellen, Spannweite 150 – 3828). Diese Tendenz konnte statistisch nicht gesichert werden ($p = 0,08$).

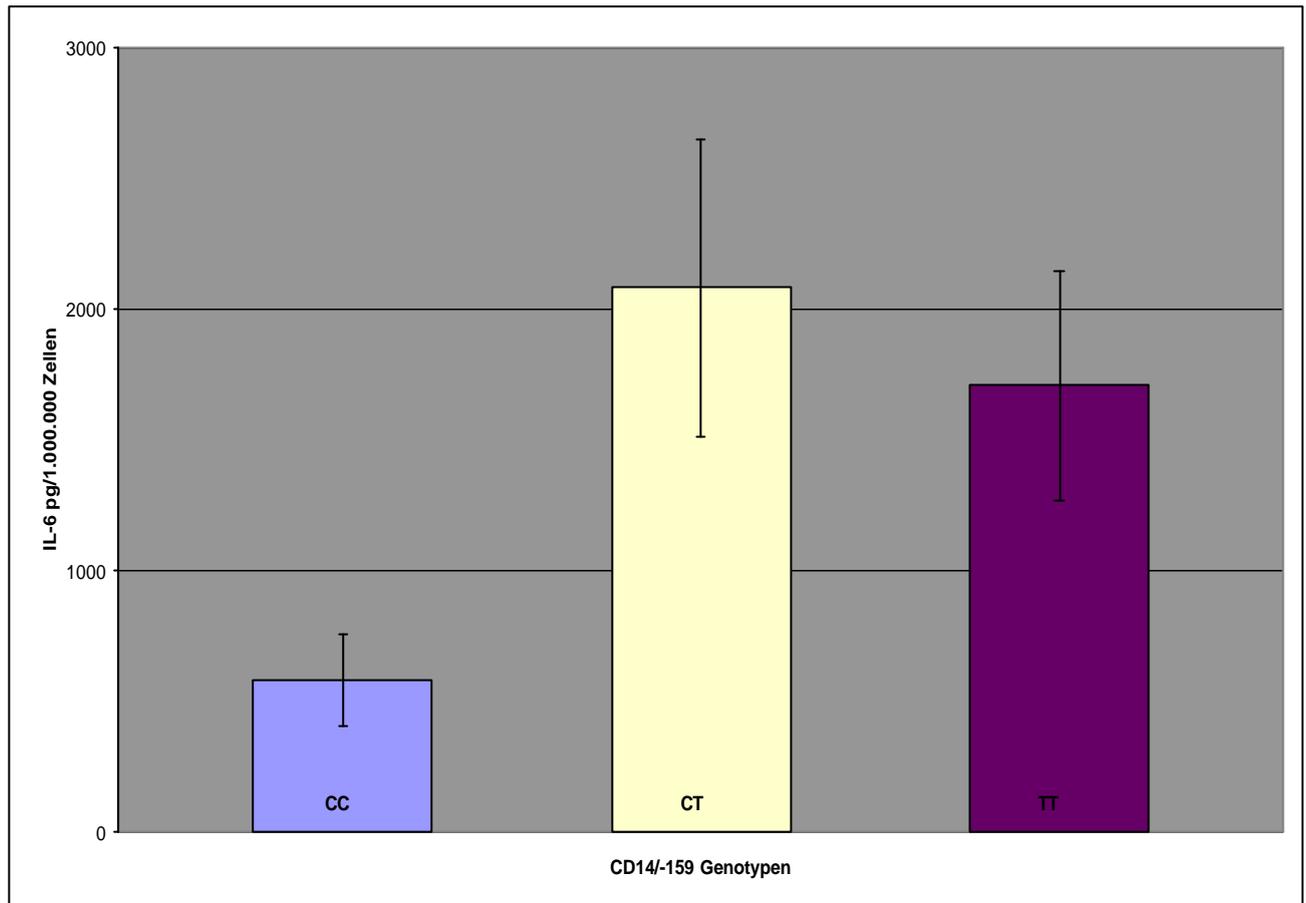


Abbildung 3.2.4.2: IL-6 (IEMA)/nach LPS-Stimulation, Darstellung von Mittelwert und SEM: CC (582 ± 176), CT ($2082,8 \pm 568$), TT ($1710 \pm 438,7$), $p = 0,08$

Bei den 31 untersuchten Probanden korrelierten die Höhe der Meßergebnisse für Tissue Factor, Tumornekrosefaktor- α und Interleukin-6 intraindividuell nicht miteinander.

3.2.5 Laborergebnisse

Bei den begleitenden Laboruntersuchungen ergab sich kein Hinweis auf eine Infektion bei den Probanden (Blutbild und CRP im Normbereich). Die IL-6-Spiegel lagen bei allen Probanden im Normbereich (Norm bis 11,3 pg/ml). Die ermittelten Routineparameter der Gerinnungsmessung (Quick, INR, PTT, TZ, Fibrinogen) und der Elektrolytbestimmung waren unauffällig und lagen ebenfalls im Normbereich.

3.2.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Genotypverteilung bei den 120 gesunden Versuchsteilnehmern wurde mit 38 CC, 56 CT und 26 TT berechnet.

Die drei Allelgruppen unterschieden sich bezüglich der Genotypverteilung und der Verteilung der zuvor bestimmten Merkmale (Geschlecht, Alter, Rauchen, orale Kontrazeptiva) statistisch nicht signifikant voneinander.

Die statistischen Analysen der Meßergebnisse, die mit dem ANOVA-Test und anschließender Signifikanzprüfung nach Scheffe durchgeführt wurden, zeigten für Tumornekrosefaktor- α , Interleukin-6 und Tissue Factor mit und ohne LPS-Stimulation keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Allelgruppen ($p = ns$). Die Gruppe CC wies tendenziell niedrigere IL-6-Synthesewerte nach LPS-Exposition der Monozyten im Vergleich zu den Allelgruppen CT und TT auf. Diese Tendenz konnte statistisch nicht gesichert werden ($p = 0,08$).

In Multivarianzanalysen unterschieden sich die drei Genotypen bezüglich der TF-Aktivität (PCA) ebenfalls nicht signifikant voneinander.

Schließlich konnte kein statistischer Unterschied der monozytären TF-Aktivität zwischen männlichem und weiblichem Geschlecht sowie zwischen Rauchern und Nichtrauchern, bzw. Frauen mit den Merkmalen Rauchen, Nichtrauchen, Einnahme oraler Kontrazeptiva und Kombination Rauchen und Pille berechnet werden.

4 Diskussion

In der hier vorgestellten Studie über die funktionellen Auswirkungen des (T-159C)-Polymorphismus im Promotor des CD14-Gens von Monozyten konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Genotypen bezüglich der Mediatorensynthese gezeigt werden.

Der Promotor eines Gens ist an der transkriptionalen Regulation der Genexpression beteiligt. Er reguliert durch seine spezifische Basensequenz das Ausmaß der Genexpression. Eine Änderung in der Promotorsequenz könnte sich auf die Frequenz der Genexpression und damit auf das Ausmaß der Proteinsynthese auswirken [Brown 27].

Bezogen auf den CD14-Rezeptor könnte ein Promotorpolymorphismus Konsequenzen für die CD14-Genexpression und damit für die Zelloberflächenrezeptordichte haben. Eine höhere versus einer niedrigeren Rezeptordichte könnte Auswirkungen auf die Rezeptorwirkung im Sinne einer stärkeren bzw. schwächeren Induktion der Zellaktivierung haben. Die Stärke der Zellaktivierung könnte schließlich Einfluß auf das Ausmaß der Synthese verschiedener Mediatoren durch die Zellen haben.

Proinflammatorische und prokoagulatorische Mediatoren, die durch eine bakterieninduzierte Monozytenaktivierung via CD14 freigesetzt werden, scheinen an der Atherogenese und den akuten Koronarsyndromen beteiligt zu sein [Fuster 52, Kane und Havel 75, Marmur 93, Toschi 152]. Eine durch das gramnegative Bakterium *C. pneumoniae* bedingte Gefäßläsion würde pathogenetisch gut in das aktuelle Konzept der Atheroskleroseentstehung passen, dem die sogenannte „response to injury“-Theorie nach R. Ross [127] zugrunde liegt [Essig 42]. Infizierte Monozyten werden als sogenannte Carrier angesehen, mit deren Hilfe sich Chlamydien theoretisch in Gefäßwänden absiedeln können [Essig 42]. In den Gefäßwänden scheint eine durch die Bakterien initiierte Schaumzellbildung – das Schlüsselereignis in der frühen Atherogenese – möglich zu sein [Kalayoglu 74]. Eine Infizierung aller relevanten Zelltypen humaner Gefäße führt schließlich zu einer vermehrten Synthese proinflammatorischer und prokoagulatorischer Faktoren [Dechend 37, Heinemann 64, Netea 109]. Entzündungsfördernde Cytokine werden für die Plaqueinstabilität und –ruptur [Biasucci 17, Boyle 25, Davies und Thomas 36, Fuster 49, Kane und Havel 75, Libby 83], der Gerinnungsfaktor TF für die Koronarthrombose verantwortlich gemacht [Fuster 52, Marmur 93, Toschi 152]. Eine erhöhte CD14-Rezeptordichte auf Monozyten könnte eine stärkere Reaktion der Zellen auf einen LPS-Stimulus bewirken mit folgender vermehrter Freisetzung proinflammatorischer

Cytokine und Expression von Tissue Factor. Dies könnte eine Atheroskleroseentstehung mit folgender KHK intensivieren und akute Koronarsyndrome fördern.

Tatsächlich fanden Unkelbach et al. im Rahmen der Genotypisierung von 2228 koronarangiographierten Patienten bei einer Subgruppe (Alter > 62 Jahre, niedriges Infarkttrisikoprofil) eine positive Assoziation der Allelgruppe TT mit koronaren Ereignissen. Die Autoren beschrieben nach statistischer Analyse Homozygotie für das T-Allel als unabhängigen Risikofaktor für Myokardinfarkte und spekulierten über eine höhere CD14-Rezeptordichte auf Monozyten, die ursächlich für dieses Ergebnis verantwortlich sein könnte [Unkelbach 153].

Die tschechischen Forscher Hubacek et al. wiesen ebenfalls in einer Studie über genotypisierte, koronarangiographierte Patienten nach, daß homozygote T-Allelie mit einer größeren Infarkthäufigkeit gekoppelt ist [Hubacek 69]. Obwohl in der Studie von Unkelbach et al. [153] der CD14-Polymorphismus keine Beziehung zu etablierten Risikofaktoren der koronaren Herzkrankheit hatte, konnte diese Unabhängigkeit in der Studie von Hubacek et al. nicht gesehen werden [Kane und Havel 75]. Abgesehen von unterschiedlichen Studiendesigns zeigten beide Veröffentlichungen eine Assoziation des T-Allels im Promotor des CD14-Gens mit myokardialen Infarktereignissen in zwei ethnischen Gruppen Europas [Kane und Havel 75]. Die tschechischen Autoren wiesen darüber hinaus bei einer Analyse von 18 gesunden jungen Männern (8 CC, 5 CT, 5 TT) nach, daß die monozytäre CD14-Rezeptordichte bei homozygoten T-Allelträgern signifikant höher ($\approx 40\%$) war als bei den anderen zwei Genotypen [Hubacek 69]. In ihrem Editorial bekräftigen Kane und Havel [75] die Möglichkeit der stärkeren zellulären Reaktivität auf einen LPS-Stimulus bei höherer Rezeptordichte mit entsprechender Auswirkung auf koronare Herzkrankheiten.

In der vorliegenden Studie wurde erstmals untersucht, ob der bialele CD14 Promotorpolymorphismus (-159 C/T) funktionelle Auswirkungen im Sinne einer stärkeren bzw. schwächeren proinflammatorischen und prokoagulatorischen Reaktion von Monozyten auf eine Stimulation mit bakteriellem Endotoxin hat. Dazu wurden die Entzündungsmediatoren Tumornekrosefaktor- α und Interleukin-6 in den Zellüberständen sowie die Expression des Gerinnungsproteins Tissue Factor bei kultivierten, genotypisierten Monozyten in Ruhe und nach LPS-Exposition gemessen.

Die Genotypverteilung in der Studiengruppe (n = 120) wurde mit 31,6% CC, 46,7% CT und 21,7% TT berechnet und entsprach damit den von Unkelbach et al. [153] publizierten Ergebnissen.

Die statistischen Auswertungen der Meßergebnisse für Tumornekrosefaktor- α , Interleukin-6 und Tissue Factor mit und ohne LPS-Stimulation zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Allelgruppen ($p = ns$). Die Gruppe CC wies tendenziell niedrigere IL-6-Synthesewerte nach LPS-Exposition der Monozyten im Vergleich zu den Allelgruppen CT und TT auf. Diese Tendenz konnte statistisch nicht gesichert werden ($p = 0,08$).

Mit diesen Ergebnissen konnte nicht gezeigt werden, daß der (T-159C)-Polymorphismus im Promotor des CD14-Gens von Monozyten Einfluß auf das Ausmaß der Mediatorensynthese hat.

Früheren Veröffentlichungen liegt die Theorie zugrunde, daß eine höhere monozytäre CD14-Rezeptordichte mit einer stärkeren Zellaktivierung und damit stärkeren Synthese entzündungs- und gerinnungsfördernder Proteine gekoppelt sein könnte [Kane und Havel 75, Hubacek 69]. Die Zelloberflächendichte des LPS-Rezeptors wurde allerdings im Rahmen dieser Studie in den verschiedenen Allelgruppen nicht bestimmt. Auch Unkelbach et al. [153] und Hubacek et al. [69] lieferten diesbezüglich im Rahmen ihrer retrospektiven Patientenuntersuchungen keine Ergebnisse. Nur die tschechischen Forscher zeigten unterschiedliche Rezeptordichten bei einer Kontrollgruppe gesunder Probanden. Allerdings unterschied sich diese Kontrollgruppe (45% CC, 39% CT, 16% TT) statistisch von der koronarangiographierten Patientengruppe (29% CC, 43% CT, 27% TT). Dies läßt die Frage offen, ob sich auch das Rezeptormuster zwischen diesen beiden Gruppen unterscheidet, zumal die CD14-Rezeptordichte unter chronischer Endotoxinbelastung – wie sie für die Patientengruppe im Rahmen einer infektassoziierten koronaren Atherosklerose angenommen werden kann – nicht klar ist.

Des weiteren wurde in der vorliegenden Studie nicht berücksichtigt, daß LBP/LPS-Komplexe zu unterschiedlichen Reaktionen CD14-positiver Zellen wie Internalisierung von LPS-Molekülen [Schumann 140], Abstoßung von CD14-Antigen von der Zelloberfläche [Bazil 13] und Zellaktivierung via Signaltransduktionskaskade [Perera 122] führen können. Diese experimentell beobachteten Wirkmechanismen des CD14-Rezeptors könnten insgesamt die Frequenz der Mediatorgenexpression ebenfalls beeinflussen. Unklar ist darüber hinaus, wie diese Komplexität der Rezeptorfunktion unter chronischer LPS-Stimulation aussieht.

Geht man davon aus, daß die CD14-Rezeptordichte auf einer Zelloberfläche das Outcome verschiedener Mediatoren bestimmt, wird allerdings die eigene Regulation dieser Proteine auf unterschiedlichen Ebenen nicht mitberücksichtigt. Die Höhen der einzelnen Meßergebnisse für Tumornekrosefaktor- α , Interleukin-6 und Tissue Factor korrelierten bei den 31 Probanden intraindividuell nicht miteinander. Dies könnte auf entsprechende Kontrollmechanismen zurückzuführen sein. Für die Genexpression dieser Mediatoren existieren transkriptionale und posttranskriptionale (translational, posttranslational) Regulationsvorgänge [Bauer 12], die bedeutsam erscheinen.

Im Tumornekrosefaktor- α -Gen wurden verschiedene Polymorphismen identifiziert, die allerdings keinen relevanten Einfluß auf ein erhöhtes KHK-Risiko zu haben scheinen [Herrmann 66]. Auch über einen Polymorphismus im Promotor des TNF-Gens mit klinischer Assoziation gibt es verschiedene Berichte [Nadel 106, Manus 91].

Im Promotor des Interleukin-6-Gens wurde ein bialleler (-176 G/C) Polymorphismus entdeckt, der mit unterschiedlichen IL-6-Plasmaspiegeln assoziiert war [Fishman 46].

Polymorphismen in verschiedenen Genregionen von Cytokinen können die Transkription dieser Mediatoren beeinflussen und so für interindividuelle Unterschiede in der Cytokinproduktion verantwortlich sein [Danis 34]. Für ein Low (LR)- und Highresponder (HR)-Phänomen bezüglich der TNF/IL-6-Genexpression wurden Kontrollprozesse auf transkriptionalem Niveau verantwortlich gemacht [Schrout 138].

Schließlich ist bekannt, daß Tumornekrosefaktor- α , Interleukin-6 und Tissue Factor durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B transkriptional kontrollierte Proteine sind [O'Brien und McVey 111]. Die Genexpression von Interleukin-6 wird zusätzlich suffizient durch die Kernfaktoren NFIL6 und NFIL6 β [Akira 2, Isshiki 72, Kinoshita 78], die Genexpression von Tissue Factor durch AP-1 [Armstead 8] vermittelt und reguliert. Dies macht deutlich, daß eine isolierte Betrachtung von LPS-Rezeptor und Ausmaß von Mediatorenprodukten möglicherweise unzureichend ist. Vielmehr existieren auf dem Weg der Mediatorengeneration verschiedene komplexe Kontrollmechanismen, die mit zu berücksichtigen sind.

Auch könnte die isolierte Betrachtung der Zellen und der synthetisierten Mediatoren unter einer LPS-Stimulation In-Vitro unzureichend sein, da eine monozytäre TF-Expression z.B. auch durch Tumornekrosefaktor- α induzierbar ist [O'Brien und McVey 111]. In der vorliegenden Studie wurden Tumornekrosefaktor- α und Interleukin-6 in den Zellüberständen ruhender und LPS-exponierter Zellen gemessen. Dabei wurde eine deutliche Synthesesteigerung in den LPS-stimulierten Zellproben gefunden. Rückkoppelnde Wirkungen

dieser Cytokine auf die Zellen – wie eine TF-Aktivierung – wurden allerdings nicht untersucht und berücksichtigt.

In der In-Vitro-Studie wurde mit einer einmaligen, extrem hohen LPS-Stimulation (100 ng/µl Medium) der Monozyten vergleichbar einer akuten Infektion gearbeitet. Es stellt sich dabei die Frage, ob das dabei resultierende Mediatorenmuster gleichsam unter einer chronischen Endotoxinbelastung der Zellen auftreten würde oder ob es unter chronischer LPS-Exposition durch Modifikations-, Regulations- und Reparationsvorgänge auf transkriptionaler und posttranskriptionaler Ebene bzw. Rezeptorebene der Zellen nicht zu einem anderen Mediatorenoutcome kommen würde. Geht man davon aus, daß der infektassoziierten Atherogenese eine chronische *C. pneumoniae*-Infektion zugrunde liegt, wird deutlich, wie bedeutsam die Erforschung von Monozytenreaktionen auf chronische Endotoxinbelastungen sind. Dies wäre bei der Interpretation der hier vorgestellten Studienergebnisse und den Untersuchungen von Unkelbach et al. und Hubacek et al. weiter wichtig, da die beiden Forschergruppen retrospektiv Daten chronisch Herzkranker auswerteten [153, 69].

Bei Betrachtung der Studien von Unkelbach et al. und Hubacek et al. [153, 69] überraschte, daß in ersterer Untersuchung die positive Assoziation des (T-159C)-Polymorphismus und Myokardinfarkten unabhängig von anderen, etablierten Risikofaktoren für die koronare Herzkrankheit war. Dies überraschte um so mehr, als dieser Sachverhalt nur für eine Patientengruppe mit einem Lebensalter von über 62 Jahren zutraf. Hubacek et al. [69] konnten ähnliches in ihrer Untersuchung nicht zeigen. Verfolgt man die „response to injury“-Theorie der Atherosklerose und bedenkt, daß das KHK-Risiko bei Vorhandensein von mehreren Risikofaktoren überadditiv zunimmt, erscheint es nicht einleuchtend, warum die *C. pneumoniae*-induzierte koronare Atherosklerose unabhängig von Standardrisikofaktoren wie etwa Hyperlipoproteinämie, Nikotinabusus, arterielle Hypertonie, Bewegungsmangel, Streß und Diabetes mellitus sein soll. Bemerkenswert erscheint dabei, daß diese positive Assoziation bei Unkelbach et al. [153] in einer nachfolgend gebildeten Subgruppe mit 76 Individuen beobachtet wurde. In der Gesamtpopulation von 2228 Patienten konnte keine signifikante Assoziation zwischen CD14-Polymorphismus und koronarer Herzkrankheit bzw. Myokardinfarkten gesehen werden [Zee 168]. Darüber hinaus lassen beide Studien offen, ob bei den untersuchten und genotypisierten KHK-Patienten überhaupt eine chronische *C. pneumoniae*-Infektion bzw. eine chronisch-inflammatorische Situation vorlag oder entsprechende Hinweise in Atherektomiepräparaten gefunden wurden.

In der vorliegenden Studie konnten bei 31 von insgesamt 120 Studienteilnehmern aus der 50 ml umfassenden Vollblutprobe ausreichend Monozyten isoliert werden. Bei diesen 31 Probanden (10 CC, 11 CT, 10 TT) wurde unter anderem IL-6 in den Zellüberständen ruhender und LPS-stimulierter Monozyten gemessen. Betrachtet man das Ergebnis für Interleukin-6 nach LPS-Exposition der Zellen, fällt auf, daß die Gruppe CC tendenziell niedrigere IL-6-Synthesewerte im Vergleich zu den anderen zwei Allelgruppen CT und TT aufwies. Diese Tendenz konnte statistisch nicht verifiziert werden ($p = 0,08$).

Nach Schieffer [135] sind akute Koronarsyndrome mit erhöhten IL-6-Plasmaspiegeln assoziiert. Erhöhte Interleukin-6-Serumwerte konnten bei Patienten mit instabiler Angina Pectoris gefunden werden und scheinen den Anfall eines akuten Koronarsyndroms auslösen zu können [Bianucci 15, Marx 94].

In atherosklerotischen Plaques wurde IL-6 in makrophagendichten Bereichen lokalisiert [Schieffer 134]. Eine hohe Makrophagendichte in einer Plaque macht diesen anfällig für eine Plaqueruptur [Fuster 48, Fuster 49]. Interleukin-6 spielt eine zentrale Rolle bei Entzündungsvorgängen, der Makrophagenmigration und -differenzierung und induziert die Expression Akuter Phasen Proteine in glatten Gefäßmuskelzellen [Bacon 11, Biasucci 15, Biswas 21, Ikeda 70, Kishimoto 80]. IL-6 scheint durch Stimulierung der Synthese von Enzymen, die die extrazelluläre Matrix erniedrigen [Galis 53, Galis 54] sowie durch Erhöhung von LDL-Rezeptoren in Makrophagen und Stimulierung der Lipidaufnahme in diesen Zellen [Hamanaka 63] zur Entwicklung akuter Koronarsyndrome beizutragen. Darüber hinaus aktiviert IL-6 Makrophagen zur Sekretion von Monozyten-Chemotaktischen-Protein-I [Biswas 21]. Dieser Mediator ist für die Rekrutierung von Monozyten in Gewebe und für inflammatorische Ereignisse im Rahmen der Atherosklerose entscheidend [Biswas 21, Boring 24]. Schließlich reguliert IL-6 die Expression von Adhäsionsmolekülen und anderen Cytokinen, die entzündliche Reaktionen verstärken [Ikeda 70, Kishimoto 80, Mantovani 90]. Theoretisch könnten interindividuell unterschiedliche IL-6-Werte innerhalb eines atherosklerotischen Plaques, Plaqueinstabilitäten und -rupturen mehr oder weniger fördern.

Möglicherweise könnte durch Messung von Interleukin-6 bei einer erhöhten Probandenzahl ($n > 31$) eine statistische Signifikanz im Sinne einer erniedrigten IL-6-Synthese CC-Homozygoter versus CT-Heterozygoten und TT-Homozygoten ermittelt werden. Falls dieses Ergebnis durch eine unterschiedliche CD14-Rezeptordichte auf der äußeren Monozytenmembran bedingt wäre, wäre ebenso ein signifikanter Unterschied zwischen den Allelgruppen CT und TT denkbar. Möglich ist aber auch, daß im Zellkern nur ein Allel des

Promotors für die Rezeptorgenexpression aktiv ist (Allel C oder Allel T) und daß das T-Allel bezüglich der CD14-Genexpression dominant wirkt. Dieser Sachverhalt könnte die in dieser Studie beobachtete Tendenz bei der IL-6-Synthese von LPS-exponierten Monozyten erklären. Um diese Tendenz zu sichern, wären also Studien mit einer größeren Studienteilnehmerzahl vonnöten. Darüber hinaus scheint eine gleichzeitige Untersuchung des biallelen (-176 G/C) Promotorpolymorphismus im IL-6-Gen bei diesen Probanden nötig zu sein, da dieser Genpolymorphismus in einer klinischen Studie unterschiedliche IL-6-Plasmaspiegel zeigte [Fishman 46]. Schließlich stellt sich die Frage, ob nicht eine komplexere Sichtweise bei der IL-6-assoziierten koronaren Atherosklerose angezeigt wäre. So scheinen CD14-negative glatte Gefäßmuskelzellen als Wirtszellen für Chlamydien während chronischer Infektionen zu dienen. Diese bakterieninfizierten Zellen zeigten eine erhöhte IL-6-Produktion In-Vitro [Rodel 126]. Interessant wäre, ob es hier interindividuelle Unterschiede gibt und wodurch diese bedingt sind. Darüber hinaus scheint eine IL-6-Expression in atherosklerotischen Plaques durch ein aktiviertes Renin-Angiotensin-System (RAS), das als Risikofaktor für Myokardinfarke beschrieben wurde, möglich zu sein [Schieffer 136]. Demnach könnte der inflammatorische Prozeß innerhalb eines atherosklerotischen Plaques durch ein blutdruckregulierendes System und nicht durch eine mögliche chronische, bakterielle Infektion getriggert sein. Denkbar wäre hier auch eine additive bzw. überadditive Zunahme von Interleukin-6-Synthesewerten, wenn ein infektiöses Ereignis und ein aktiviertes RAS gleichzeitig auftreten. Dies würde zu der von Muhlestein et al. aufgestellten Theorie passen, wonach eine chronische Infektion zusätzlich die durch KHK-Standardrisikofaktoren (z.B. Hypertonie, Hyperlipidämie) erhöhten inflammatorischen Reaktionsparameter weiter erhöht [Muhlestein 100, Muhlestein 102].

Insgesamt scheint die vorliegende Studie aber die Untersuchung von Zee et al. [168] zu bestätigen, die den prädiktiven Wert des biallelen (-260 C/T) Polymorphismus bezüglich Myokardinfarkten in einer prospektiven Studie analysierten. Es handelt sich dabei um den selben Promotorpolymorphismus. Die Autoren zählten in ihrer Untersuchung ab dem ersten Codon, das in eine Aminosäure translatiert wird, wohingegen bei Unkelbach et al. [153] und in der vorgestellten Studie ab der Transkriptionsstartstelle gezählt wurde. In der „Physician health study“ wurden dabei 14916 gesunde Männer über einen Zeitraum von 12 Jahren beobachtet. 387 Studienteilnehmer, die im Laufe dieser Zeit einen Myokardinfarkt erlitten und eine gleiche Anzahl Studienteilnehmer, bei denen keine Gefäßerkrankungen in den 12 Jahren auftraten, wurden genotypisiert. Die Forscher konnten keine signifikante Assoziation

zwischen dem CD14-Polymorphismus und Myokardinfarkten nachweisen. Für das Risikomanagement scheint die CD14 C(-159)T-Genotypisierung daher eher nicht geeignet zu sein [Zee 168].

Abschließend sei noch auf die Low (LR)- und Highresponder (HR)-Theorie für monozytäre TF-Aktivität von Osterud [118] verwiesen. Für Tissue Factor zeigten HR eine bis zu 50-fache Erhöhung der Aktivität nach LPS-Stimulation gegenüber LR [Osterud 118]. Dieses Phänomen wurde mit Interaktionen zwischen Thrombozyten und LPS-aktivierten Monozyten [Osterud 115] sowie zwischen Thrombozyten, Granulozyten und LPS-stimulierten Monozyten [Halvorsen 62, Osterud 117] erklärt. Inkubiert man z.B. LPS-stimulierte Monozyten von LR mit Thrombozyten von HR, konnte ein Anstieg der TF-Aktivität beobachtet werden [Osterud 115]. Dabei scheint der Plättchenaktivierungsfaktor (PAF) eine entscheidende Rolle zu spielen [Osterud 116].

In der vorliegenden Studie lagen die Spannweiten zwischen LR und HR mit einer insgesamt 11,8-fachen Erhöhung zwischen niedrigstem und höchstem PCA-Wert sowie 12,2-fachen Erhöhung des niedrigsten versus höchsten TF-Meßwertes im chromogenen TF-Assay deutlich niedriger als in der Literatur beschrieben [Osterud 118]. Es fand sich in der vorliegenden Studie kein Zusammenhang mit zuvor bestimmten Probandenmerkmalen wie z.B. Rauchen oder Einnahme oraler Kontrazeptiva.

In der vorliegenden Studie wurden die Monozyten der verschiedenen Probanden im gleichen Medium kultiviert und mit LPS stimuliert. Daher kann man davon ausgehen, daß es zu den dabei gemessenen interindividuell unterschiedlichen TF-Aktivitäten unabhängig von Thrombozyten und Granulozyten kam. Allerdings ist denkbar, daß unter der zusätzlichen Anwesenheit dieser Zellen die TF-Aktivität bei HR sich noch weiter erhöhen könnte. Dies könnte für den Tissue Factor-Gehalt innerhalb eines atherosklerotischen Plaques und für thrombotische Ereignisse nach Plaqueruptur ebenfalls Konsequenzen haben.

Ist laut Hölschermann et al. [68] monozytäre TF-Aktivität unter Nikotin- und Kontrazeptivagebrauch bei Frauen erhöht, konnte Entsprechendes in der vorliegenden Studie nicht nachgewiesen werden. Dies könnte an unterschiedlichen Studiendesigns beider Untersuchungen liegen. So kultivierten und stimulierten Hölschermann et al. im Gegensatz zu dieser Studie die Zellen in serumfreiem Medium.

Die vorliegende In-Vitro-Untersuchung konnte einen Einfluß des CD14-Polymorphismus auf eine stärkere bzw. schwächere Mediatorensynthese nicht zeigen und dadurch eine mögliche

Erklärung für die Ergebnisse von Unkelbach et al. [153] und Hubacek et al. [69] liefern. Die Bindung von LPS an den CD14-Rezeptor initiiert zwar eine Zunahme der Genexpression verschiedener proinflammatorischer und prokoagulatorischer Mediatoren. Diese Genexpressionen unterliegen aber selbst Regulationsprozessen, die in der Studie nicht berücksichtigt wurden. Darüber hinaus scheint die Studienteilnehmerzahl (n = 31) hinsichtlich der Messung von IL-6 in den Zellüberständen ein limitierender Faktor in der Bewertung der vorliegenden Studie zu sein, da bei LPS-exponierten Monozyten zwar tendenziell niedrigere IL-6-Synthesewerte bei CC-Homozygoten gefunden wurden, diese Tendenz aber statistisch nicht verifiziert werden konnte.

Vielmehr scheint die Untersuchung die prospektive „Physician health study“, in der keine Beziehung zwischen (T-159C)-Polymorphismus und Myokardinfarkten gesehen wurde [Zee 168], zu bestätigen. Daher scheinen weitere experimentelle Studien mit höheren Probandenzahlen nötig zu sein, die unter Beachtung der Komplexität der Genexpression und der infektassoziierten Atherosklerose mögliche funktionelle Auswirkungen des CD14-Polymorphismus untersuchen, vor allem unter Berücksichtigung der sogenannten Toll-like Rezeptoren.

5 Zusammenfassung

Monozyten können durch Lipopolysaccharid gramnegativer Bakterien aktiviert werden. Die Aktivierungsreaktion führt zu einer Mediatorsynthese der Zelle. Proinflammatorische und prokoagulatorische Mediatoren, die durch eine solche bakterieninduzierte Monozytenaktivierung freigesetzt werden, scheinen an der Atherogenese und den akuten Koronarsyndromen beteiligt zu sein.

Der spezifische LPS-Rezeptor auf der äußeren Monozytenmembran ist das CD14-Antigen (mCD14). Die Bindung an diesen Rezeptor erfolgt LBP-vermittelt. Für das CD14-Gen wurde in der Promotorsequenz ein DNA-Polymorphismus an Position -159 (C/T) identifiziert. Im Rahmen einer retrospektiven Studie über koronarangiographierte Patienten konnte bei einer nachfolgend gebildeten Subgruppe (niedriges Risikoprofil, Alter > 62 Jahre), die 76 Individuen umfaßte, eine positive Assoziation zwischen TT-Homozygotie und Myokardinfarkten beobachtet werden. Der CD14-Polymorphismus wurde anschließend als unabhängiger Risikofaktor für Myokardinfarkte beschrieben.

Der Promotor ist für die Regulierung der CD14-Genexpression verantwortlich und kann möglicherweise die Frequenz der CD14-Proteinsynthese bestimmen. Eine höhere CD14-Rezeptordichte auf der äußeren Monozytenmembran könnte möglicherweise zu einer stärkeren Zellaktivierung mit folgender stärkerer Mediatorsynthese führen. Dies könnte theoretisch für den Prozeß der Atherogenese bedeutsam sein.

In der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob der biallele (-159 C/T) Polymorphismus sich allelabhängig im Sinne einer stärkeren bzw. schwächeren proinflammatorischen und prokoagulatorischen Reaktion von Monozyten auf eine LPS-Stimulierung auswirkt.

Dazu wurden Monozyten aus dem Vollblut gesunder, genotypisierter Probanden (n = 120) isoliert und mit bzw. ohne LPS kultiviert. Die Genotypverteilung der Studiengruppe wurde mit 31,6% CC, 46,7% CT und 21,7% TT berechnet. Die drei Allelgruppen unterschieden sich bezüglich der Genotypverteilung und der Verteilung zuvor bestimmter Merkmale (Geschlecht, Alter, Rauchen, orale Kontrazeptiva) statistisch nicht signifikant voneinander.

Die Aktivität des prokoagulatorischen Proteins Tissue Factor wurde bei lysierten Zellen mit einem Ein-Schritt-Gerinnungstest (PCA) bestimmt (n = 120). Bei 31 Probanden (10 CC, 11 CT, 10 TT) konnten ausreichend Monozyten isoliert werden. Bei diesen wurde die Sekretion der entzündungsfördernden Cytokine Tumornekrosefaktor- α und Interleukin-6 in den Monozytenüberständen mit einem Enzymimmunoassay (IEMA) ermittelt. Außerdem erfolgte

bei diesen Probanden eine Quantifizierung von Tissue Factor mit einem chromogenen Tissue Factor-Assay. Die Meßergebnisse der drei Allelgruppen wurden statistisch mit dem ANOVA-Test und anschließender Signifikanzprüfung nach Scheffe miteinander verglichen.

Es konnten bei der Bestimmung von Tumornekrosefaktor- α , Interleukin-6 und Tissue Factor (PCA/chromogener TF-Assay) mit und ohne LPS-Stimulation keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Allelgruppen ($p = ns$) gezeigt werden. Die Gruppe CC wies tendenziell niedrigere IL-6-Synthesewerte nach LPS-Exposition der Monozyten im Vergleich zu den Allelgruppen CT und TT auf. Diese Tendenz konnte statistisch nicht verifiziert werden ($p = 0,08$).

In Multivariananalysen unterschieden sich die drei Genotypen bezüglich der Tissue Factor-Aktivität (PCA) ebenfalls nicht signifikant voneinander.

Die vorliegende Studie konnte damit keinen Zusammenhang zwischen dem CD14-Polymorphismus und stärkerer bzw. schwächerer Mediatorsynthese nach LPS-Exposition von Monozyten belegen. Damit wurde auch keine mögliche Erklärung für die positive Assoziation TT-Homozygoter mit Myokardinfarkten in früheren Studien gefunden. Die früheren Veröffentlichungen zugrundeliegende Hypothese über die CD14-Rezeptordichte auf der äußeren Zellmembran wurde im Rahmen dieser Studie nicht untersucht. Weiter wurden in der Literatur beschriebene unterschiedliche Reaktionen des LPS-Rezeptors auf einen Endotoxin-Stimulus nicht berücksichtigt. Transkriptionale und posttranskriptionale Regulationsprozesse der Mediatorengexpression, die entscheidend für die jeweilige Proteinsynthese sind, wurden ebenfalls nicht beachtet. Eine isolierte Betrachtung von CD14-Polymorphismus und Mediatorsynthese erscheint deshalb nicht ausreichend.

Schließlich läßt die vorliegende Studie die Frage offen, wie CD14-Rezeptordichten und Mediatorenmuster unter einer chronischen Endotoxinbelastung, die wohl für die Atherogenese entscheidend ist, aussehen. Limitierend scheint auch die Probandenzahl hinsichtlich der IL-6-Synthesewerte ($n = 31$) zu sein, da hier eine Tendenz statistisch nicht gesichert werden konnte. Vielmehr scheint die Untersuchung eine neue prospektive Studie zu bestätigen, die keinen Zusammenhang zwischen dem (T-159C)-Polymorphismus und Myokardinfarkten fand.

Weitere Studien mit größeren Probandenzahlen unter Einbeziehung der komplexen Aspekte der infektassoziierten KHK erscheinen sinnvoll, um den Zusammenhang des biallelen (-159 C/T) CD14-Polymorphismus und der koronaren Atherosklerose auf experimenteller Ebene zu klären.

6 Abkürzungsverzeichnis

AHA	American Heart Association
Arg	Arginin
Bz	Benzoyl
C	Cytosin
C. pneumoniae	Chlamydia pneumoniae
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Facs-Scan	Fluorescence-activated cell-sorting
G	Gauge
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
kDA	Kilodalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
HBSS	Hanks-Buffered-Salt-Solution
HR	Highresponder
IEMA	Enzymimmunoassay
Ile	Isoleucin
IL-6	Interleukin-6
INR	International normalized ratio
LBP	Lipopolysaccharid-bindende-Protein
LPS	Lipopolysaccharid
LR	Lowresponder
Max	Maximum
mCD14	membrangebundenes CD14
MHC	Haupt-Histokompatibilitätsantigene
Min	Minimum
MSFA	Makrophagen-Serum-Freies-Medium
MW	Mittelwert
ns	nicht signifikant
PAF	Plättchenaktivierungsfaktor
PCA	prokoagulatorische Aktivität
PBM	humane periphere Blutmonozyten

PBS	Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline
pNA	p-Nitroanilid
PTT	Prothrombinzeit
RAS	Renin-Angiotensin-System
RNA	Ribonukleinsäure
sCD14	lösliches CD14
SEM	Standardfehler des Median
T	Thymin
TF	Tissue Factor
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
TFr	Transkriptionsfaktor
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TZ	Thromboplastinzeit

7 Literatur

1. **Abraham E.** Tumor necrosis factor. *Crit Care Med.* 1989;17:590-591.
2. **Akira S,** Isshiki H, Sugita T, Tanabe O, Kinoshita S, Nishio Y, Nakajima T, Hirano T, Kishimoto T. A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of C/EBP family. *EMBOJ.* 1990;9:1897-18906.
3. **Anderson JL,** Muhlestein JB, Carlquist J, Allen A, Trehan S, Nielson C, Hall S, Brady J, Egger M, Horne B, Lim T. Randomized secondary prevention trial of azithromycin in patients with coronary artery disease and serological evidence for Chlamydia pneumoniae infection: The Azithromycin in Coronary Artery Disease: Elimination of Myocardial Infection with Chlamydia (ACADEMIC) study. *Circulation.* 1999;99:1540-1547.
4. **Andogenui G,** Goyert SM, Kubes P. Lipopolysaccharid-induced leukocyte-endothelial cell interactions: a role for CD14 versus Toll-like receptor 4 within microvessels. *J Immunol.* 2002;169:2111-2119.
5. **Antal-Szalmas P,** Van Strijp JAG, Weersink AJL, Verhoef J, Van Kessel KPM. Quantitation of surface CD14 on human monocytes and neutrophils. *J Leukoc Biol.* 1997;61:721-728.
6. **Arbustini E,** Morbini P, Bello BD, Prati F, Specchia G. From plaque rupture biology to clinical setting. *Am Heart J.* 1999;138 (2 Pt 2):55-60.
7. **Arditi M,** Zhou J, Dorio R, Rong GW, Goyert SM, Kim KS. Endotoxin-mediated endothelial cell injury and activation: Role of soluble CD14. *Infect Immun.* 1993;61:3149-3156.
8. **Armstead VE,** Opentanova IL, Michenko AG, Lefer AM. Tissue factor expression in vital organs during murine traumatic shock: role of transcription factors AP-1 and NF-kappaB. *Anesthesiology.* 1999;91:1844-1852.

9. **Aurell L**, Friberger P, Karlsson G, Claesson G, AB KABI Peptide Research, P.O.B. 156, s431 22 Mölndal, Sweden. A new sensitive and highly specific Chromogenic Peptide Substrate for Factor Xa. *Thromb Res.* 1977;11:595-609.
10. **Bach RR**. Initiation of coagulation by tissue factor. *Crit Rev Biochem.* 1988;23:339-368.
11. **Bacon K**, Gearing A, Camp R. Induction of in-vitro human lymphocyte migration by interleukin-3, interleukin-4 and interleukin-6. *Cytokine.* 1990;2:100-105.
12. **Bauer M**. Pathophysiologie der Sepsis. *Anaesthesist.* 1996;45:312-322.
13. **Bazil V**, Strominger JL. Shedding as a mechanism of down-modulating of CD14 on stimulated human monocytes. *J Immun.* 1991;147:1567-1574.
14. **Bertrand ME**, Simoons ML, Fox KAA, Wallentin LC, Hamm CW, McFadden E, De Feyter PJ, Specchia G, Ruzyllo W. Vorgehen bei akuten Koronarsyndromen: Akute Koronarsyndrome ohne persistierende ST-Streckenhebung. *Eur Heart J.* 2000;21:1406-1432.
15. **Biasucci LM**, Vitelli A, Liuzzo G, Altamura S, Caligiuri G, Monaco C, Rebuzzi AG, Ciliberto G, Maseri A. Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina. *Circulation.* 1996;94:874-877.
16. **Biasucci LM**, Liuzzo G, Buffon A, Maseri A. The variable role of inflammation in acute coronary syndroms and in restenosis. *Sem Interv Cardiol.* 1999;4:105-110.
17. **Biasucci LM**, Collizzi C, Rizello V, Vitrella G, Crea F, Liuzzo G. Role of inflammation in the pathogenesis of unstable coronary artery diseases. *Scan J Clin Lab Invest Suppl.* 1999;230:12-22.
18. **Biasucci LM**, Liuzzo G, Fantuzzi G, Caligiuri G, Rebuzzi AG, Ginnetti F, Dinarello CA, Maseri A. Increasing levels of Interleukin (IL)-1Ra and IL-6 during the first days of hospitalization in Unstable Angina are associated with increased risk of in-hospital coronary events. *Circulation.* 1999;99:2079-2084.

19. **Billiau A.** Interleukin-6: Structure, production and actions. *Monokines and Other Lymphocytic Cytokines*. 1988:3-13.
20. **Birkenmaier C, Hong YS, Horn JK.** Modulation of the endotoxin receptor (CD14) in septic patients. *J Trauma*. 1992;32:473-479.
21. **Biswas P, Delfanti F, Bernasconi S, Mengozzi M, Cota M, Polentarutti N, Mantovani A, Lazzarin A, Sozzani S, Poli G.** Interleukin-6 induces monocyte chemotactic protein-I in peripheral blood mononuclear cells and in the U937 cell line. *Blood*. 1998;91:258-265.
22. **Boer de OJ, Wal van der AC, Becker AE.** Atherosclerosis, inflammation, and infection. *J Pathol*. 2000;190:237-243.
23. **Bom VJJ, van Hinsbergh VWM, Reinalda-Poot HH, Mohanlal RW, Bertina RM.** Extrinsic activation of human coagulation Factors IX and X on endothelial surface. *Thromb Haemost*. 1991;66:283-291.
24. **Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF.** Decreased lesion formation in CCR2 / mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature*. 1998;394:894-897.
25. **Boyle JJ.** Association of coronary plaque rupture and atherosclerotic inflammation. *J Pathol*. 1997;181:93-99.
26. **Boyum A.** Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood: Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 1968;97:77-89.
27. **Brown TA.** Moderne Genetik. *Spektrum, Heidelberg – Berlin – Oxford*. 1999;2. Auflage.
28. **Bufler P, Stiegler G, Schuchmann M.** Soluble lipopolysaccharide receptor (CD14) is released via two different mechanisms from human monocytes and CD14 transfectants. *Eur J Immunol*. 1995;25:604-610.

29. **Caligiuri** G, Rottenberg M, Nicoletti A, Wigzell H, Hansson GK. Chlamydia pneumoniae infection does not induce or modify atherosclerosis in mice. *Circulation*. 2001;103:2834-2838.
30. **Carson** SD. Continuous Chromogenic Tissue Factor Assay: Comparison to clot-based Assays and sensitivity established using pure Tissue Factor. *Throm Res*. 1987;47:379-387.
31. **Carson** SD und **Brozna** JP. The role of tissue factor in the production of thrombin. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1993;4:281-292.
32. **Collart** MA, Baeuerle P, Vassalli P. Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kappa B. *Mol Cell Biol*. 1990;10:1498-1506.
33. **Cordle** SR, Donald R, Read MA, Hawinger J. Lipopolysaccharid induces phosphorylation of MAD3 and activation of c-Rel and related NF- κ B proteins in human monocytic THP-1 cells. *J Biol Chem*. 1993;268:11803-11810.
34. **Danis** VA, Millington M, Hyland VJ, Grennan D. Cytokine production by normal human monocytes: inter-subject variation and relationship to an IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene polymorphism. *Clin Exp Immunol*. 1995;99:303-310.
35. **Davies** MJ, **Thomas** A. Thrombosis and acute coronary-artery lesions in sudden cardiac ischemic death. *N Engl J Med*. 1984;310:1137-1140.
36. **Davies** MJ, **Thomas** AC. Plaque fissuring – the cause of acute myocardial infarction, sudden ischaemic death, and crescendo angina. *Br Heart J*. 1985;53:363-373.
37. **Dechend** R, Maass M, Gieffers J, Dietz R, Scheidereit C, Leutz A, Gulba DC. Chlamydia pneumoniae infection of vascular smooth muscle and endothelial cells activates NF-kappaB and induces tissue factor and PAI-1 expression: a potential link to accelerated arteriosclerosis. *Circulation*. 1999;100:1369-1373.

38. **Depre C**, Wijns W, Robert AM, Renkin JP, Havaux X. Pathology of unstable plaque: correlation with the clinical severity of acute coronary syndroms. *J Am Coll Cardiol.* 1997;30:694-702.

39. **Dofferhoff A**, Vellenga E, Limburg PC, van Zanten A, Mulder PO, Weits J. Tumor necrosis factor (cachectin) and other cytokines in septic shock: a review of the literature. *Neth J Med.* 1991;39:45-62.

40. **Edfeldt K**, Swedenborg J, Hansson GK, Yan ZQ. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation.* 2002;105:1158-1161.

41. **Eijnden van den MMED**, Steenhauer SI, Reitsma PH, Bertina RM. Tissue Factor expression during Monocyte-Macrophage differentiation. *Thromb Haemost.* 1997;77:1129-1136.

42. **Essig A**, Marre R. Chlamydia pneumoniae. Ein Erreger chronischer, extrapulmonaler Infektionen? *DÄ.* 2000;50:A3440-A3443.

43. **Ferrero E**, Goyert SM. Nucleotide sequence of the gene encoding the monocyte differentiation antigen, CD14. *Nucleic Acids Res.* 1988;16:4173.

44. **Ferrero E**, Hsieh CL, Francke U, Goyert SM. CD14 is a member of the family of Leucine-rich proteins and is encoded by a gene synthetic with multiple receptor genes. *J Immunol.* 1990;145:331-336.

45. **Ferrero E**, Jiao D, Tsuberi BZ, Tesio L, Rong GW, Haziot A, Goyert SM. Transgenic mice expressing human CD14 are hypersensitive to lipopolysaccharid. *Proc Natl Acad Sci.* 1993;90:2380-2384.

46. **Fishman D**, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P. The effect of novel polymorphism in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest.* 1998;102:1369-1376.

47. **Fortini** A, Corti G, Cappelletti C. Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis. *Ann Ital Med Int.* 1999;14:253-263.
48. **Fuster** V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndroms. *N Engl J Med.* 1992;326:242-250.
49. **Fuster** V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndroms (second part). *N Engl J Med.* 1992;326: 310-318.
50. **Fuster** V. The mechanism leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology. Lewis A. Conner Memorial Lecture. *Circulation.* 1994;90:2126-2146.
51. **Fuster** V, Gotto AM, Libby P, Loscalzo J, McGill H. Task Force 1. Pathogenesis of coronary disease: The biologic role of risk factors. *J Am Coll Cardiol.* 1996;27:964-1047.
52. **Fuster** V, Badimon JJ, Chesebro JH, Fallon JT. Plaque rupture, Thrombosis and therapeutic implications. *Haemost.* 1996;26(Suppl 4):269-284.
53. **Galis** ZS, Muszynski M, Sukhova GK, Simon-Morrissay E, Unemori EN, Lark M, Amento E, Libby P. Cytokine-stimulated smooth muscle cells stimulate a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. *Circ Res.* 1994;75:181-189.
54. **Galis** ZS, Sukhova GK, Kranzhofer R, Clark S, Libby P. Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrix-degrading proteinases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92:402-406.
55. **Gegner** JA, Ulevitch RJ, Tobias PS. Lipopolysaccharide (LPS) signal transduction and clearance. *J Biol Chem.* 1995;270:5320-5325.
56. **Gerrity** RG. The Role of the Monocyte in Atherogenesis. I. Transition of blood-borne Monocytes into Foam Cells in fatty lesions. *Am J Pathol.* 1981;103:181-190.

57. **Goetze S**, Xie XP, Kawano Y, Kawano H, Fleck E, Hsueh WA, Law RE. TNF-alpha-induced migration of vascular smooth muscle cells is MAPK dependent. *Hypertension*. 1999;33 (1 PT 2):183-189.
58. **Gouin-Thibault I**, Dewar L, Craven S, Kulczycky M, Wun TC, Ofosu FA. Probable regulation of Factor VIIa-Tissue Factor and Prothrombinase by Factor Xa-TFPI and TFPI in vivo. *Br J Haematol*. 1996;95:738-746.
59. **Goyert SM**, Ferrero E, Rettig WJ, Yenamandra AK, Obata F, Le Beau MM. The CD14 Monocyte differentiation maps to a region encoding Growth Factors and Receptors. *Science*. 1988;239:497-500.
60. **Gurfinkel E**, **Bozovich G**. Chlamydia pneumoniae: inflammation and instability of atherosclerotic plaque. *Atherosclerosis*. 1998;140 (Suppl. 1):S31-S35.
61. **Hailman E**, Lichenstein HS, Wurfel MM, Miller DS, Johnson DA, Kelley M, Busse LA, Zukowski MM, Wright SD. Lipopolysaccharide (LPS)-binding Protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J Exp Med*. 1994;179:269-277.
62. **Halvorsen H**, Olsen JO, Osterud B. Granulocytes enhance LPS-induced tissue factor activity in monocytes via an interaction with platelets. *J Leuk Bio*. 1993;54:275-282.
63. **Hamanaka R**, Kohno K, Seguchi T, Okamura K, Morimoto T, Ono M, Ogata M, Kuwano M. Induction of low-density lipoprotein receptor and transcription factor SP-1 by tumor necrosis factor in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 1992;267:13160-13165.
64. **Heinemann M**, Susa M, Simnacher U, Marre R, Essig A. Growth of Chlamydia pneumoniae induces cytokine production and expression of CD14 in human monocytic cell line. *Infect Immun*. 1996;64:4872-4875.
65. **Helin H**, **Edgington TS**. Allogenic induction of the human T cell-instructed monocyte procoagulant response is rapid and is elicited by HLA-DR. *J Exp Med*. 1983;158:962.

66. **Herrmann** SM, Ricard S, Nicau V, Mallet C, Arveiler D, Evans A, Ruidavets JB, Luc G, Bara L, Parra HJ, Poirier O, Cambien F. Polymorphisms of the tumor necrosis factor-alpha gene, coronary heart disease and obesity. *Eur J Clin Invest.* 1998;28:59-66.
67. **Hölschermann** H, Dürfeld F, Maus U, Bierhaus A, Heidinger K, Lohmeyer J, Nawroth PP, Tillmanns H, Haberbosch W. Cyclosporin A inhibits tissue factor expression in Monocytes/Macrophages. *Blood.* 1996;88:3837-3845.
68. **Hölschermann** H, Terhalle HM, Zakel U, Maus U, Parviz B, Tillmanns H, Haberbosch W. Monocyte tissue factor expression is enhanced in woman who smoke and use oral contraceptives. *Thromb Haemost.* 1999;82:1614-1620.
69. **Hubacek** JA, Pit`ha J, Skodova Z, Stanek V, Poledne R. C(-260)→T Polymorphismus in the promotor of the CD14 monocyte receptor gene as a risk factor for myocardial infarction. *Circulation.* 1999;99:3218-3220.
70. **Ikeda** U, Ikeda M, Seino Y, Takahashi M, Kasahara T, Kano S, Shimada K. Expression of intracellular adhesion molecule I in rat vascular smooth muscle cells by pro-inflammatory cytokines. *Atherosclerosis.* 1993;104:61-68.
71. **Ishikawa** Y, Mukaida N, Kuno K, Rice N, Okamoto S, Matsushima K. Establishment of Lipopolysaccharide-dependent Nuclear Factor-kappaB activation in a cell-free system. *J Biol Chem.* 1995;270:4158-4164.
72. **Isshiki** H, Akira S, Tanabe O, Nakajima T, Shimamoto T, Hirano T, Kishimoto T. Constitutive and Interleukin-1 (IL-1)-inducible factors interacts with the IL-1-responsive element in the IL-6 gene. *Mol Cell Biol.* 1990;10:2757-2764.
73. **Jantos** CA, Nesseler A, Waas W, Baumgartner W, Tillmanns H, Haberbosch W. Low prevalence of Chlamydia pneumoniae in atherectomy specimens from patients with coronary heart disease. *Clin Infect Dis.* 1999;28:988-992.
74. **Kalayoglu** MV, Byrne GI. Induction of macrophage foam cell formation by Chlamydia pneumoniae. *J Infect Dis.* 1998;177:725-729.

75. **Kane** JP, **Havel** RJ. Polymorphism of the Lipopolysaccharid receptor (CD14) and myocardial infarction. *Circulation*. 1999;99:3210-3212.
76. **Kashiwa** H, Wright CS Bonavida B. Regulation of B cell maturation and differentiation. I. Suppression of pokeweed mitogen-induced B cell differentiation by tumor necrosisfactor (TNF). *J Immunol*. 1987;138:1383-1390.
77. **Kaykov** E, Abbou B, Friedstrom S, Hermoni D, Roguin N. Chlamydia pneumonia in ischemic heart disease. *Isr Med Assoc J*. 1999;1:225-227.
78. **Kinoshita** S, Akira, Kishimoto. A member of the C/EBP family, NF-IL β 6, forms a heterodimer and transcriptionally synergizes with NF-IL6. *Proc Natl Acad Sci*. 1992;89:1473-1476.
79. **Kirchner** H, Kruse A, Neustock P, Rink L. Monocyten und Makrophagen. In: Cytokine und Interferone, Botenstoffe des Immunsystems. *Spektrum, Heidelberg – Berlin – Oxford*. 1994; 1. korrigierter Nachdruck:47-63.
80. **Kishimoto** T, Akira S, Narazaki M, Taga T. Interleukin-6 family of cytokines and gp 130. *Blood*. 1995;86:1243-1254.
81. **Libby** P. Molecular basis of acute coronary syndromes. *Circulation*. 1995;91:2844-2850.
82. **Libby** P, Egan D, Skarlatos S. Roles of infectious agents in atherosclerosis and restenosis: an assessment of the evidence and need for future research. *Circulation*. 1997;96:4095-4103.
83. **Libby** P. The interface of atherosclerosis and thrombosis: basic mechanisms. *Vasc Med*. 1998;3:225-229.
84. **Libby** P, Ridker PM. Novel Inflammatory Markers of Coronary Risk Theory versus practice. *Circulation*. 1999;100:1148-1150.

85. **Liu** MK, Herrera-Velit P, Brownsey RW, Reiner NE. CD14-dependent activation of Protein Kinase C and Mitogen-activated Protein Kinases (p42 and p44) in human monocytes treated with bacterial Lipopolysaccharide. *J Immun.* 1994;153:2642-2652.
86. **Liuzzo** G, Biasucci LM, Gallimore JR, Caligiuri G, Buffon A, Rebuffi AG, Pepys MB, Maseri A. Enhanced inflammatory response in patients with preinfarction unstable angina. *J Am Coll Cardiol.* 1999;34:1696-1703.
87. **Loffler** H. Unspecific esterases and acid phosphatase in plasmocytomas. *Blut.* 1967;15:330-335.
88. **Loppnow** H, Stelter F, Schönbeck U, Schlüter C, Ernst M, Schütt C, Flad HD. Endotoxin activates human vascular smooth muscle cells despite lack of expression of CD14 mRNA or endogenous membrane CD14. *Infect Immun.* 1995;63:1020-1026.
89. **Manten** A, Winter RJ, Minnema MC, ten Cate H, Lijmer JG, Adams R, Peters RJ, van Deventer SJ. Procoagulant and proinflammatory activity in acute coronary syndroms. *Cardiovascs Res.* 1998;40:389-395.
90. **Mantovani** A. The interplay between primary and secondary cytokines. Cytokines involved in the regulation of monocyte recruitment. *Drugs.* 1997;54(Suppl. I):15-23.
91. **Manus** RM, Wilson AG, Mansfield J, Weir DG, Duff GW, Kelleher D. TFN2, a polymorphism of the tumor necrosis-alpha gene promoter, is a component of the celiac disease major histocompatibility complex haplotype. *Eur J Immunol.* 1996;26:2113-2118.
92. **Marlar** RA, Kleiss AJ, Griffith JH. An alternative extrinsic pathway of human blood coagulation. *Blood.* 1982;60:1353-1358.
93. **Marmur** JD, V. Thiruvikraman S, Fyfe BS, Guha A, Sharma SK, Ambrose JA, Fallon JT, Nemerson Y, Taubman MB. Identification of active tissue factor in human coronary atheroma. *Circulation.* 1996;94:1226-1232.

94. **Marx** N, Neumann FJ, Ott I, Gawaz M, Koch W, Pickau T, Schomig A. Induction of cytokine expression in leucocytes in acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 1997;30:165-170.
95. **McGee** MP, Foster S, Wang X. Simultaneous expression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor by human monocytes: a potential mechanism for localized control of blood coagulation. *J Exp Med.* 1994;179:1847-1854.
96. **Medzhitov** R, **Janeway** C. Innate Immunity. *NEJM.*2000;343:338-344.
97. **Medzhitov** R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2001;1:135-145.
98. **Meier** CR. The possible role of infections in acute myocardial infarction. *Biomed Pharmacother.* 1999;53:397-404.
99. **Muhlestein** JB, Hammond EH, Carlquist JF, Radicke E, Thomson MJ, Karagounis LA, Woods ML, Anderson JL. Increased incidence of Chlamydia species within the coronary arteries of patients with symptomatic atherosclerotic versus other forms of cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol.* 1996; 27:1555-1561.
100. **Muhlestein** JB. Bacterial infections and atherosclerosis. *J Investing Med.* 1998;46:396-402.
101. **Muhlestein** JB, Anderson JL, Hammond EH, Zhao L, Trehan S, Schwobe EP, Carlquist JF. Infection with Chlamydia pneumoniae accelerates the development of atherosclerosis and treatment with azithromycin prevents it in a rabbit model. *Circulation.* 1998;97:633-636.
102. **Muhlestein** JB. Chronic infection and coronary artery disease. *Med Clin North Am.* 2000;84:123-148.
103. **Muhlestein** JB. Chlamydia pneumoniae-induced atherosclerosis in a rabbit model. *J Infect Dis.* 2000;181 Suppl 3:S505-507.

104. **Mukaida** N, Ishikawa Y, Ikeda N, Fujioka N, Watanabe S, Kuno K, Matsushima K. Novel insight into molecular mechanism of endotoxin shock: biochemical analysis of LPS receptor signaling in a cell-free system targeting NF-kappaB and regulation of cytokine production/action through β_2 integrin in vivo. *J Leu Biol.* 1996;59:145-151.
105. **Murken** J und **Cleve** H. Humangenetik. *Enke, Stuttgart.* 1988; 4. Auflage.
106. **Nadel** S, Newport MJ, Booy R, Levin M. Variation in the tumor necrosis factor-alpha gene promoter region may be associated with death from meningococcal disease. *J Infect Dis.* 1996;174:878-880.
107. **Nemerson** Y und **Pitlick** FA. The tissue factor pathway of blood coagulation. *Prog Hemost Thromb.* 1972;1:1-37.
108. **Nemerson** Y. Tissue factor and hemostasis. *Blood.* 1988;71:1-8.
109. **Netea** MG, Selzman CH, Kullberg BJ, Galama JM, Weinberg A, Stalenhoef AF, Van der Meer JW, Dinarello CA. Acellular components of Chlamydia pneumoniae stimulate cytokine production in human blood mononuclear cells. *Eur J Immunol.* 2000;30:541-549.
110. **Netea** MG, Kullberg BJ, Galama MD, Stalenhoef AFH, Dinarello CA, Meer van der JWM. Non-LPS components of Chlamydia pneumoniae stimulate cytokine production through toll-like receptor 2-dependent pathways. *Eur J Immunol.* 2002;32:1188-1195.
111. **O'Brien** DP and **McVey** JH. Blood coagulation, inflammation and defence. In: Tuddenham EGD (Guest Editor). Bailliere`s Clinical Haematology, International Practice and Research. The Molecular Biology of Coagulation. *Bailliere Tindall, London – Philadelphia – Sydney – Tokyo – Toronto.* 1989;2:257-280.
112. **Obara** H, Takayanagi A, Hirahashi J, Tanaka K, Wakabayashi G, Matsumoto K, Shimazu N, Shimizu N, Kitajima M. Overexpression of truncated IkappaBalpha induces TNF-alpha-dependent apoptosis in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:2198-2204.

113. **Okusawa S**, Yancey KB, van der Meer JWM, Endres S, Lonnemann G, Hefter K, Frank MM, Burke JF, Dinarello CA, Gelfand JA. C5a stimulates secretion of tumor necrosis factor from human mononuclear cells in vitro. *J Exp Med*. 1988;168:443-448.
114. **Ostensen ME**, Thiele DL, Lipsky PE. Tumor necrosis factor-alpha enhances cytolytic activity of human killer cells. *J Immunol*. 1987;138:4185-4191.
115. **Osterud B**, Olsen JO, Wilsgard L. The role of arachidonic acid release and lipooxygenase pathway in lipopolysaccharide-induced thromboplastin activity in monocytes. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1990;1:41-46.
116. **Osterud B**. Platelet activating factor enhancement of lipopolysaccharide-induced tissue factor activity in monocytes: requirement of platelets and granulocytes. *J Leuk Bio*. 1992;51:462-465.
117. **Osterud B**. Cellular interactions in tissue factor expression by blood monocytes. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1995;6:S20-S25.
118. **Osterud B**. Tissue Factor: a Complex Biological Role. *Thromb Haemost*. 1997;78:755-758.
119. **Osterud B**. Tissue factor expression by monocytes: regulation and pathophysiological roles. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1998;Suppl1:S9-S14.
120. **Ouchi K**. Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis. *Jpn J Infect Dis*. 1999;52:223-227.
121. **Ozinsky A**, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Aderem A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:13766-13771.

122. **Perera** PY, Vogel SN, Detore GR, Haziot A, Goyert SM. CD14-Ddependent and CD14-independent signaling pathways in murine makrophages from normal and CD14 knockout mice stimulated with Lipopolysaccharide or Taxol. *J Immunol.* 1997;158:4422-4429.
123. **Ramadori** G, Meyer zum Buschfelde KH, Tobias PS, Mathison JC, Ulevitch RJ. Biosynthesis of lipopolysaccharid-binding protein in rabbit hepatocytes. *Pathobiol.* 1990;58:89-94.
124. **Ramirez** JA. Isolation of Chlamydia pneumoniae from the coronary artery of a patient with coronary atherosclerosis. The Chlamydia pneumoniae/Atherosclerosis Study Group. *Ann Intern Med.* 1996;125:979-982.
125. **Reuning** U, Preissner KT, Müller-Berghaus G. Two Independent binding sites on monolayers of human endothelial cells are responsible for interaction with coagulation Factor VII and Factor VIIa. *Thromb Haemost.* 1993;69:197-204.
126. **Rodel** J, Woytas M, Groh A, Schmidt KH, Hartmann M, Lehmann M, Straube E. Production of basic fibroblast growth factor and interleukin-6 by human smooth muscle cells following infection with Chlamydia pneumoniae. *Infect Immun.* 2000;68:3635-3641.
127. **Ross** R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 1993;362:801-809.
128. **Saikku** P, Leinonen M, Mattila K, Ekman MR, Nieminen MS, Makela PH, Huttunen JK, Valtonen V. Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Lancet.* 1988;2:983-986.
129. **Saikku** P, Leinonen M, Tenkanen L, Linnanmaki E, Ekman MR, Manninen V, Manttari M, M, Frick MH, Huttunen. Chronic Chlamydia pneumoniae infection as a risk factor for coronary heart disease in the Helsinki Heart Study. *Ann Intern Med.* 1992;116:273-278.

130. **Saikku** P. Chlamydia pneumoniae infection as a risk factor in acute myocardial infarction. *Eur Heart J.* 1993; 14 Suppl. K:62-65.
131. **Saikku** P. Epidemiology of Chlamydia pneumoniae in atherosclerosis. *Am Heart J.* 1999;138 (5 Pt 2):S500-503.
132. **Saikku** P. Chlamydia pneumoniae in atherosclerosis. *J Intern Med.* 2000;247:391-396.
133. **Salgado** A, Boveda JL, Monasterio J, Segura RM, Mourelle M, Gomez-Jimenez J, Peracaula R. Inflammatory mediators and their influence on haemostasis. *Haemost.* 1994;24:132-138.
134. **Sasu** L, La Verda D, Qureshi N, Golenbock DT, Beasley D. Chlamydia pneumoniae and chlamydial heat shock protein 60 stimulate proliferation of human vascular smooth muscle cells via toll-like receptor 4 and p44/p42 mitogen activated protein kinase activation. *Circ Res.* 2001;89:244-250.
135. **Scheurich** P, Thomas B, Ucer U, Pfizenmaier K. Immunoregulatory activity of recombinant human tumor necrosis factor (TNF-alpha): Induction of TNF receptors on human T cells and TNF-alpha-mediated enhancement of t cell responses. *J Immunol.* 1987;138:1786-1790.
136. **Schieffer** B, Schieffer E, Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Kovanen PT, Kaartinen M, Nussberger J, Harringer W, Drexler H. Expression of Angiotensin II and Interleukin-6 in human coronary atherosclerotic plaques. Potential implication for inflammation and plaque instability. *Circulation.* 2000;101:1372-1378.
137. **Schletter** J, Heine H, Ulmer AJ, Rietschel ET. Molecular mechanisms of endotoxin activity. *Arch Microbiol.* 1995;164:383-389.
138. **Schraut** W, Wendelgass P, Calzada-Wack JC, Frankenberger M, Löms Ziegler-Heitbrock HW. TNF gene expression in monocytes of low and high responder individuals. *Cytokine.* 1997;9:206-211.

139. **Schumann** RR, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ. Structure and function of Lipopolysaccharide Binding Protein. *Science*. 1990;249:1429-1431.
140. **Schumann** RR, Rietschel ET, Loppnow H. The role of CD14 and lipopolysaccharid-binding protein (LBP) in the activation of different cell types by endotoxin. *Med Microbiol Immunol (Berl)*. 1994;183:279-297.
141. **Schütt** C, Schilling T, Grunwald U, Schönfeld W, Krüger C. Endotoxin-neutralizing capacity of soluble CD14. *Res Immunol*. 1992;143:71-78.
142. **Setoguchi** M, Nasu N, Yoshida S, Higuchi Y, Akizuki S, Yamamoto S. Mouse and human CD14 (myeloid cell-specific leucine-rich glycoprotein) primary structure deduced from cDNA clones. *Biochem Biophys Acta*. 1989;1008:213-222.
143. **Shah** PK. Plaque disruption and coronary thrombosis: new insight into pathogenesis and prevention. *Clin Cardiol*. 1997;20 (11 Suppl. 2): II-38-44.
144. **Shalaby** MR, Espevik T, Rice GC, Ammann AJ, Figari IS, Ranges GE, Palladino MA. The involvement of human tumor necrosis factors- α and - β in the mixed lymphocyte reaction. *J Immunol*. 1988;141:499-503.
145. **Stefanova** I, Corcorans ML, Horak EM, Wahls LM, Bolen JB, Horak ID. Lipopolysaccharide induces activation of CD14-associated Protein Tyrosin Kinase p53/56^{lyn}. *J Biol Chem*. 1993;268:20725-20728.
146. **Stary** HC. Evolution and progress of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults. *Arteriosclerosis*. 1989;9 (1 Suppl):I19-32.
147. **Stary** HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1995;92:1355-1374.

148. **Strachan T** und **Read AP**. Molekulare Humangenetik. *Spektrum, Heidelberg – Berlin – Oxford*. 1996;1. Auflage.
149. **Tobias PS**, Soldau K, Ulevitch RJ. Identification of a lipid A binding site in the acute phase reactant lipopolysaccharid binding protein. *J Biol Chem*. 1989;264:10867-10871.
150. **Tobias PS**, **Ulevich RJ**. Lipopolysaccharide-Binding Protein and CD14 in the Lipopolysaccharide-dependent activation of cells. *Chest*. 1994;105:48S-50S.(Suppl.).
151. **Tobias PS**, Gegner J, Han J, Kirkland T, Kravchenko V, Leturcq D, Moriarty A, Mathison JC, Pugin J, Steinemann S, Ulevitch RJ. LPS Binding Protein and CD14 in the LPS dependent activation of cells. In: Levin, van Deventer, van der Poll und Sturk (Hrsg.). *Bacterial Endotoxins: Basic Science to Anti-Sepsis Strategies*. 1994:31-39.
152. **Toschi V**, Gallo R, Lettino M, Fallon JT, Gertz D, Fernandez-Ortiz A, Chesebro JH, Badimon L, Nemerson Y, Fuster V, Badimon JJ. Tissue Factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation*. 1997;95:594-599.
153. **Unkelbach K**, Gardemann A, Kostrzewa M, Philipp M, Tillmanns H, Haberbosch W. A new promotor polymorphism in the gene of lipopolysaccharide receptor CD14 is associated with expire myocardial infarction in patients with low atherosclerotic risk profile. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:932-938.
154. **Varveri A**, Sgorbini L, Romano S, Aurigemma G, Dagianti A Jr, Sessa R, Di Pietro M, Del Piano M, Dagianti A, Penco M. Chlamydia pneumoniae infection and cardiac ischemic syndroms. *Cardiologia*. 1998;43:1053-1058.
155. **Vasselon T**, Pironkova R, Detmers PA. Sensitive responses of leukocytes to Lipopolysaccharide require a protein distinct from CD14 at the cell surface. *J Immun*. 1997;159:4498-4505.
156. **Viriyakosol S**, Kirkland TN. A region of human CD14 required for Lipopolysaccharide binding. *J Biol Chem*. 1995;270:361-368.

157. **Waage** A, Espevik T, Halstensen A. TNF, IL-1 and IL-6 in human septic shock. *Scand J Immunol.* 1988;28:267 (Abstract).
158. **Wakita** K, Stearns-Kurosawa D, Marumoto Y. The effect of Calcium Ionophore A23187 on tissue factor activity and mRNA in endothelial cells. *Thromb Res.* 1994;74:95-103.
159. **Wang** SC, Klein RD, Wahl WL, Alarcon WH, Garg RJ, Remick DG, Su GL. Tissue coexpression of LBP and CD14 mRNA in a mouse model of sepsis. *J Surg Res.* 1997;76:67-73.
160. **Wang** P, Kitchens RL, Munford RS. Phosphatidylinositides bind to plasma membrane CD14 and can prevent monocyte activation by bacterial Lipopolysaccharide. *J Biol Chemistry.* 1998;273:24309-24313.
161. **Weinstein** SL, Sanghera JS, Lemke K, De Franco AL, Pelech SL. Bacterial Lipopolysaccharide induces tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated Protein Kinases in macrophages. *J Biol Chem.* 1992;267:14955-14962.
162. **Wright** SD, Tobias PS, Ulevitch RJ, Ramos RA. Lipopolysaccharide (LPS) binding protein opsonizes LPS-bearing particles for recognition by a novel receptor on macrophages. *J Exp Med.* 1989;170:1231-1241.
163. **Wright** SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharid (LPS) and LPS binding protein. *Science.* 1990;249:1431-1433.
164. **Wurfel** MM, Hailman E, Wright SD. Soluble CD14 acts as a shuttle in the neutralization of Lipopolysaccharide (LPS) by LPS-binding protein and reconstituted High Density Lipoprotein. *J Exp Med.* 1995;181:1743-1754.
165. **Wylli** DH, Kiss-Toth E, Visintin A, Smith SC, Boussouf S, Segal DM, Duff, GW, Dower SK. Evidence for an accessory protein function for toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses. *J Immunol.* 2000;165:7125-7132.

166. **Xu XH**, Shah PK, Faure E, Equils O, Thomas L, Fishbein MC, Luthringer D, Xu XP, Rajavashisth TB, Yano J, Kaul S, Arditi M. Toll-like receptor 4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. *Circulation*. 2001;104:3103-3108.
167. **Yudkin JS**, Kumari M, Humphries SE, Mohamed-Ali V. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis*. 2000;148:209-214.
168. **Zee RY**, Lindpaintner K, Struk B, Hennekens CH, Ridker PM. A prospective evaluation of the CD14 C(-260)T gene polymorphism and the risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 2001;154:699-702.
169. **Zhang Y**, Lin JX, Vilcek J. Interleukin-6 induction by Tumor Necrosis Factor and Interleukin-1 in human fibroblasts involves activation of a nuclear binding to a κ B-like sequence. *Mol Cell Biol*. 1990;10:3818-3823.

Lebenslauf

Name: Reyher
Vorname: Mathias
Geburtsdatum: 05.04.1972
Geburtsort: Rheine
Familienstand: nicht verheiratet, ein Kind

1978 – 1991: Schulausbildung
Mittlere Reife 1988, Wichern-Realschule Münster
Hochschulreife 1991, Ratsgymnasium Münster

10.1991 – 03.1993: Wehrdienst, Sanitätssoldat der Luftwaffe, Köln-Wahn

04.1993 – 09.1993: Pflegedienst, Evangelisches Krankenhaus Düsseldorf

10.1993 – 05.2000: Studium der Humanmedizin
Justus-Liebig-Universität Giessen
Studienabschluß (3. Staatsexamen) 05.2000

07.2000 – 10.2001: Arzt im Praktikum
Institut für Anästhesiologie und Intensivmedizin
Stadtklinik Baden-Baden

11.2001 – 12.2001: Arzt im Praktikum
Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin
Klinikum der Stadt Villingen-Schwenningen

Seit 01.2002: Assistenzarzt
Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin
Klinikum der Stadt Villingen-Schwenningen

Danksagung

Für die Überlassung des Themas und die Betreuung des experimentellen und schriftlichen Teils bedanke ich mich bei Professor Dr. med. W. Haberbosch und Privatdozent Dr. med. H. Hölschermann.

Frau Dr. med. K. Unkelbach danke ich herzlich für die Genotypisierung der Probanden, Herrn W. Pabst für die statistische Beratung.

Den 120 hier nicht namentlich erwähnten Probanden danke ich für die Bereitschaft zur Teilnahme an der Untersuchung.

Ganz besonderen Dank gilt Frau B. Parviz für die unermüdliche Unterstützung und Hilfe bei der Realisierung der vorliegenden Studie.