

---

Aus dem Kardiologischen Forschungslabor  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Unterschiede im Genexpressionsmuster kardiovaskulär  
relevanter Faktoren in männlichen und weiblichen  
Nabelschnurzellen

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Janina Koschate

aus Dieburg (Kreis Darmstadt-Dieburg)

---

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. H Northoff

2. Priv.- Doz. Dr. med. habil. M. Faßhauer

3. Prof. Dr. med. V. Stangl

**Datum der Promotion: 08.04.2011**

---

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1	Bedeutung der Arteriosklerose	6
1.2	Geschlechtsunterschiede und deren Ausprägung	6
1.2.1	Epidemiologie und Lebensstilfaktoren	6
1.2.2	Risikofaktoren für die Entstehung der koronaren Herzkrankheit und ihre sexspezifische Wichtung	9
1.2.3	Östrogentheorie und KHK	11
1.2.4	Genetische Ausstattung	14
1.3	Begründung für die Verwendung von HUVEC als gewähltes Zellkulturmodell	14
1.3.1	Eigenschaften	15
1.3.2	Geschlechtsdeterminierung der Zellen	15
1.3.3	Fetale Entwicklung und Hormoneinflüsse	16
1.3.4	Fetaler Kreislauf	18
1.3.5	Zielsetzung der Arbeit	20
<b>2</b>	<b>Methodik</b>	<b>21</b>
2.1	RNA-Extraktion aus dem Blut	21
2.2	Zellkultur	22
2.3	RNA-Extraktion aus HUVEC	23
2.4	Photometrische RNA-Vermessung	25
2.5	Umschreibung von RNA in cDNA	25
2.6	Polyacrylamidgel	26
2.7	Realtime-RT-PCR	28
2.7.1	SYBR-Green-RT-PCR	32
2.7.2	Taqman-RT-PCR	32
2.7.3	Primermatrix	32
2.7.4	Standardkurve	33
2.8	Microarray	33
2.9	Statistische Auswertung	34

---

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>35</b>
3.1	Geschlechtsbestimmung der HUVEC	35
3.2	Auswahl der zu untersuchenden Gene	37
3.3	Expressionsunterschiede zwischen männlichen und weiblichen HUVEC	38
3.3.1	Gene mit Einfluss auf die Vasoreaktivität	38
3.3.1.1	eNOS und eNOS-Spliceprodukte	38
3.3.1.2	Caveolin-1	41
3.3.1.3	Endothelin-1	42
3.3.1.4	ACE	43
3.3.2	Gene mit Einfluss auf den oxidativen Status	44
3.3.2.1	SOD-1	44
3.3.2.2	SOD-2	45
3.3.2.3	Catalase	46
3.3.2.4	HMOX-1	47
3.3.2.5	GPX-3	48
3.3.2.6	NOX-4	49
3.3.2.7	P52+66 <sup>shc</sup>	50
3.3.2.8	p66 <sup>shc</sup>	51
3.3.3	Gene mit Einfluss auf die zelluläre Stressantwort	52
3.3.3.1	Hsp70	52
3.3.3.2	Hsp90	53
3.3.3.3	ICAM-1	54
3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Realtime-RT-PCR	55
3.5	Whole Genome Array	56
3.5.1	Qualitätskontrolle und Zusammenstellung der Gen-Poole	56
3.5.2	Expressionsunterschiede	58
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>63</b>
4.1	Bedeutung der untersuchten Gene in der Realtime RT-PCR	63
4.1.1	Gene mit Einfluss auf die Vasoreaktivität	63
4.1.2	Gene mit Einfluss auf den oxidativen Status	66
4.1.3	Gene mit Einfluss auf die zelluläre Stressantwort	72

---

4.2	Potentieller Einfluss von Umweltfaktoren auf die Genexpression in Nabelschnurzellen	74
4.3	Erhöhte Immunreaktivität der Frau	74
4.3.1	Die Rolle der Geschlechtshormone: Wirkt Östrogen pro- oder antiinflammatorisch?	76
4.3.2	Genetische Faktoren autoimmuner Erkrankungen	79
4.3.3	Evolutionenbiologische Überlegungen	80
4.4	Autoimmunerkrankungen und kardiovaskuläre Komorbidität	80
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>82</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungen und Symbole</b>	<b>84</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>88</b>
<b>8</b>	<b>Erklärung</b>	<b>100</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Bedeutung der Arteriosklerose

Die World Health Organisation (WHO) definiert die koronare Herzkrankheit als „akute oder chronische verminderte Leistungsfähigkeit des Herzens, die durch eine Reduktion oder einen Stillstand myokardialer Blutzufuhr infolge Arteriosklerose der Koronararterien verursacht wird“.

In den Industrienationen zählen Herz-Kreislauf-Erkrankungen, vor allem die Koronare Herzkrankheit (KHK), zu den häufigsten Todesursachen im Erwachsenenalter. Zwar wurde in Deutschland, wie auch den USA und anderen westeuropäischen Ländern, im Allgemeinen ein Absinken der Sterblichkeit an der koronaren Herzkrankheit seit Beginn der 90er Jahre beobachtet. Wie in Abbildung 1 zu sehen, ist dieser Rückgang nicht über alle Altersgruppen gleich verteilt und steigt insbesondere im höheren Lebensalter erneut an [1].

Selbst in den Entwicklungsländern liegen Herz-Kreislauf-Erkrankungen an zweiter Stelle der Mortalitätsstatistik, nur wenig übertroffen von Infektionskrankheiten des Respirationstraktes [2]. Mit zunehmender Industrialisierung der Schwellenländer gestaltet sich diese Entwicklung zu einem globalen Problem. Die Verbesserung der Lebensbedingungen ist im Allgemeinen eng mit einer fettreicheren Ernährung, vermehrtem Tabakkonsum und einer sitzenden Lebensweise verknüpft, welche auf die Entstehung der Arteriosklerose begünstigend einwirken [3].

Unabhängig vom Geschlecht ist die KHK eng mit folgenden Risikofaktoren verbunden: Alter, genetische Belastung, Rauchen, Hypertonie, Dyslipidämie und Diabetes mellitus, wobei die relative Wichtung jedes einzelnen Faktors sexspezifisch unterschiedlich ist.

## 1.2 Geschlechtsunterschiede und deren Ausprägung

### 1.2.1 Epidemiologie und Lebensstilfaktoren

Zwar sterben über fast alle Altersgruppen hinweg mehr Männer als Frauen an den Folgen der KHK [1], jedoch kommt es in den höheren Altersgruppen zu einer Angleichung der Sterblichkeit zwischen dem männlichen und dem weiblichen

Geschlecht [4, 5], so dass die KHK mittlerweile sogar als führende Todesursache bei Frauen über 75 Jahren gilt.

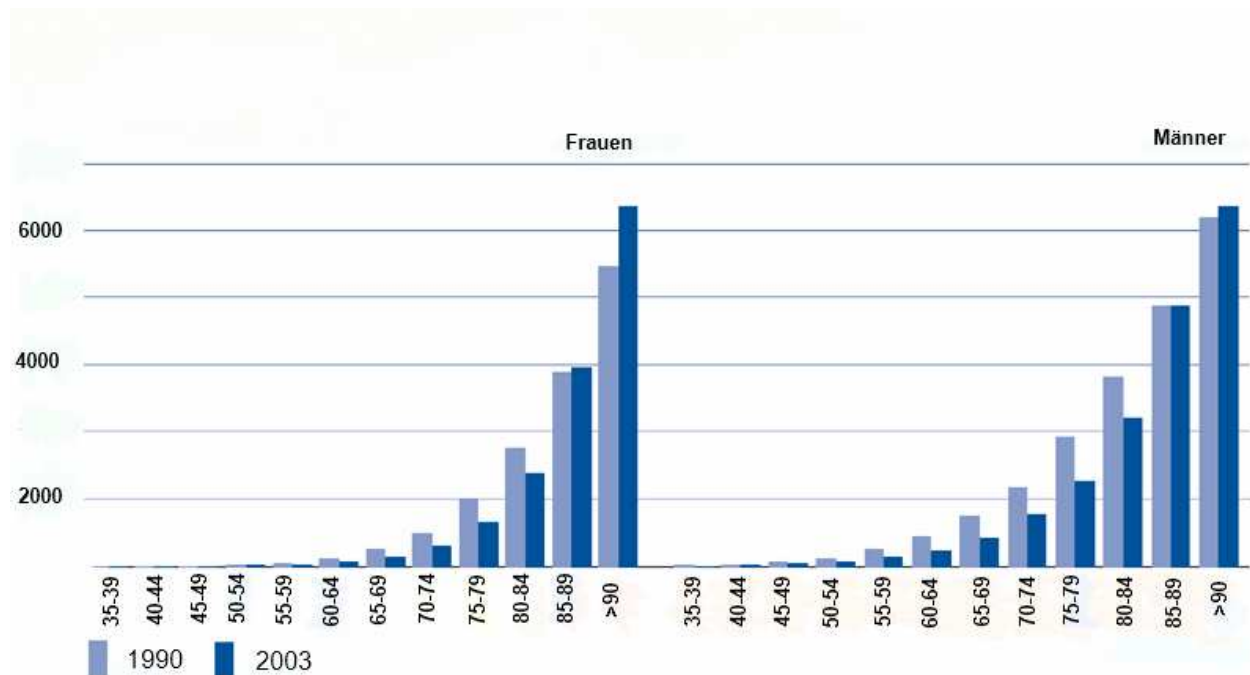


Abbildung 1: **Zeitliche Trends der Sterblichkeit an koronarer Herzkrankheit nach Geschlecht in Deutschland in den Jahren 1990 und 2003.** Sterbefälle je 100000 Einwohner nach Altersgruppen. Quelle: Todesursachenstatistik, Statistisches Bundesamt.

Nach Altersgruppen dargestellt, zeigt sich, dass die Sterblichkeit an KHK mit zunehmendem Alter ansteigt, bei den Frauen allerdings später als bei den Männern. Allgemein verringerte sich zwischen den beiden Erhebungen in den Jahren 1990 und 2003 die Sterblichkeit bei Frauen und bei Männern bis zum 85. Lebensjahr deutlich. Dies wird auf eine verbesserte medizinische Akutbehandlung zurückgeführt.

Laut Statistiken der WHO aus dem Jahre 1997 betrug die relative Todesrate infolge der KHK bei Männern im Alter von 65-74 Jahren 311 pro 100.000 Einwohner, bei Frauen der gleichen Altersgruppe dagegen 144. Nach dem 75. Lebensjahr stieg die Todesrate bei Männern um ca. das 5-fache, bei Frauen jedoch um das 9-fache. Bei Frauen ist die KHK also eine Krankheit des höheren Lebensalters.

Aufgrund der gegenwärtigen Veränderung der Bevölkerungsstruktur mit stetig zunehmender Lebenserwartung (Frauen 82,4 Jahre/Männer 77,2 Jahre Stand

2006/2008 vgl. Statistisches Bundesamt, Bevölkerung Deutschlands bis 2060, 12. koordinierte Bevölkerungsvorausberechnung) bei gleich bleibend niedriger Geburtenrate, führt dies insgesamt zu einer Zunahme der absoluten Zahl versterbender Frauen [6]. Da das Altern per se einen Risikofaktor für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen darstellt [7], wäre bei einer gleich bleibenden Entwicklung ein weiterer zahlenmäßiger Anstieg der Sterblichkeit von Frauen an den Folgen der KHK zu erwarten [1].

Im WHO-MONICA (MONItoring CARDIOvascular Disease) Projekt konnte weiterhin bestätigt werden, dass die Abnahme der Risikofaktoren bei Männern stärker ausgeprägt war als bei Frauen, insbesondere den Tabakkonsum betreffend. Jedoch korrelierte dies überraschenderweise nur schwach mit der Abnahme der Inzidenz und Letalität der KHK [8]. Eine stärkere Korrelation zeigten die Anwendung neuerer Therapiemodalitäten und sekundäre Präventionsmaßnahmen von denen bis heute besonders Männer profitierten [9]. In jüngeren Studien erfolgte eine genauere Betrachtung der Risikofaktoren und ihrer sexspezifischen Ausprägung. Denn obwohl laut Todesursachenstatistik aus dem Jahr 2005 in Deutschland 58,5% aller Kreislauferkrankungen und 45,2% aller Myokardinfarkte Frauen betrafen, wurden zu diesem Thema in den letzten Jahrzehnten überwiegend Studien bei Männern im mittleren Lebensalter durchgeführt.

Darüber hinaus registrierte das Statistische Bundesamt in den Jahren 1985-87 zu 2001-2003 sowohl eine Zunahme der Herzinfarkttraten bei Frauen zwischen 25-54 Jahren, als auch eine Zunahme der Reinfarktrate bei Frauen zwischen 55-64 Jahren, während bei den Männern ein deutlicher Rückgang zu verzeichnen war. Zum einen wurde dies einer intensivierten Aufmerksamkeit für das Thema Herzinfarkt bei Frauen zugeschrieben, infolgedessen auch mehr Herzinfarktfälle bei Frauen diagnostiziert wurden. Zum anderen korreliert der beobachtete Anstieg mit einer Zunahme und dem frühen Beginn des Zigarettenrauchens in der weiblichen Bevölkerung [10-12].

Zwei weitere Umstände wirken sich in diesem Zusammenhang zusätzlich ungünstig auf das weibliche Risikoprofil aus: zum einen hat Rauchen einen additiven Effekt auf das Risiko einer KHK, wenn gleichzeitig orale Kontrazeptiva eingenommen werden, insbesondere bei Frauen über 35 Jahren [13]. Zum anderen scheinen Frauen aufgrund der mit dem Rauchen verbundenen



Gewichtsabnahme bzw. Gewichtskontrolle größere Schwierigkeiten zu haben, mit dem Rauchen aufzuhören [14].

Doch trotz dieser beschriebenen Entwicklungen bleibt immer noch ein erheblicher Unterschied in der Inzidenz der KHK zwischen den Geschlechtern bestehen [11, 15, 16], insbesondere wenn man das Augenmerk auf die mittleren Lebensjahre richtet. So sind Männer dieser Altersgruppe etwa dreimal häufiger betroffen und die Mortalität liegt sogar um das Fünffache höher als bei Frauen [17].

Um diesen sexspezifischen Unterschied zu erklären, entstanden Mitte des 20. Jahrhunderts, als die KHK noch als typische Männerkrankheit galt, verschiedene soziologische Erklärungsmodelle. Beispielsweise seien Frauen durch ihr häusliches Betätigungsfeld weniger dem Stress der Arbeitswelt ausgesetzt und aus diesem Grund geringer von der KHK betroffen. Doch in epidemiologischen Untersuchungen konnte nicht nur gezeigt werden, dass zwischen arbeitenden Frauen und Hausfrauen kein signifikanter Unterschied im Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen bestand [18], sondern dass beruflich erfolgreiche Frauen sogar ein günstigeres Risikoprofil aufwiesen. Dazu gehören niedrigere Cholesterin- und Plasma-Glukosespiegel [19] sowie erhöhte HDL-Spiegel [20].

Daneben galt die Fähigkeit soziale Netzwerke zu knüpfen als vorwiegend weibliche und auch kardioprotektive Eigenschaft [21]. Männer profitierten dagegen von einem verheirateten Status und wiesen deutlich geringere Sterberaten auf als ledige, verwitwete oder geschiedene Altersgenossen [22].

### **1.2.2 Risikofaktoren für die Entstehung der koronaren Herzkrankheit und ihre sexspezifische Wichtung**

Des Weiteren kann von einer sexspezifisch unterschiedlichen Wichtung der Risikofaktoren für die Entwicklung von Arteriosklerose ausgegangen werden. Wie bereits für die Faktoren Alter und Rauchen erläutert, wirken sich auch der arterielle Hypertonus, die Dyslipidämie und der Diabetes Mellitus bei Frauen und Männern unterschiedlich aus.

Im Falle der arteriellen Hypertonie steigt der Blutdruck in beiden Fällen mit zunehmendem Lebensalter an, wobei unabhängig vom Geschlecht eine strenge Korrelation zwischen der Höhe des arteriellen Blutdrucks und der Inzidenz der

KHK besteht. Nach dem 60. Lebensjahr steigt er jedoch bei Frauen deutlich stärker an als bei Männern [23], so dass bei Frauen über 75 Jahren die geschätzte Prävalenz der arteriellen Hypertonie sogar bei 80% liegt [5]. Insbesondere die Steigerung des systolischen Blutdrucks scheint eine Rolle zu spielen [24]. Dabei ist zu bedenken, dass sich nur etwa 36% aller Hypertonikerinnen im Rahmen einer Untersuchung der „Woman`s Health Initiative“ in den USA regelmäßig einer Blutdruckkontrolle unterzogen und somit Frauen erst verzögert behandelt wurden [25].

Bei der Dyslipidämie spielen insbesondere LDL- und HDL-Cholesterin eine Rolle für die Entstehung von arteriosklerotischen Plaques. Prämenopausale Frauen weisen aufgrund des positiven Einfluss des Östrogens auf den Lipidmetabolismus im Vergleich zu gleichaltrigen Männern einen deutlich geringeren LDL-Spiegel auf [17]. Mit dem Absinken der Östrogenproduktion zu Beginn der Menopause kommt es bei Frauen zu einem kontinuierlichen Anstieg des LDL-Spiegels um jährlich 0,05 mmol/l, während dies bei Männern im Alter zwischen 50 und 64 Jahren weniger ausgeprägt erfolgt [26]. In Folge dessen übersteigt der LDL-Spiegel postmenopausaler Frauen im weiteren Verlauf den der Männer gleichen Alters [17]. HDL dagegen wirkt protektiv, da es eine entscheidende Rolle beim Rücktransport von Cholesterin aus den Zielzellen in die Leber spielt. Durchschnittlich liegt der HDL-Spiegel prämenopausaler Frauen um 0,25 mmol/l höher als der gleichaltriger Männer [27]. Studien haben gezeigt, dass bei Frauen der HDL-Spiegel ausschlaggebend für das Risiko einer KHK ist [28]. Dabei besteht zwischen diesen Faktoren eine inverse Beziehung.

Über einen langen Zeitraum wurde angenommen, dass Diabetes mellitus einen stärkeren Risikofaktor für die Frau darstellt. Zurzeit liegen widersprüchliche Ergebnisse vor. In einer Metaanalyse von Kanaya aus dem Jahr 2002 [29] wurde dieser Zusammenhang widerlegt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede des relativen Risikos zwischen Männern und Frauen gefunden werden. In einer Metaanalyse von 2006 fanden Huxley et al. [30] ein 50% erhöhtes relatives Risiko für die Entwicklung einer KHK bei Frauen mit Diabetes gegenüber ebenfalls daran erkrankten Männern. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass Frauen auf endogen produziertes Stickstoffmonoxid (NO) mit einer verstärkten Vasodilatation reagieren und von einer Einschränkung dieses Mechanismus durch diabetische Vasopathien stärker beeinträchtigt werden [31]. Des Weiteren

vermindern Hyperglykämien die östrogenvermittelte NO-Produktion [32]. Diese Faktoren tragen anscheinend zu einem sexspezifischen Unterschied im Risikoprofil diabetischer Frauen bei.

### 1.2.3 Östrogentheorie und KHK

Das Risiko kardiovaskulärer Ereignisse bei Frauen steigt ab Beginn der Menopause. Postmenopausale Frauen in jedem Altersabschnitt haben im Vergleich zu gleichaltrigen prämenopausalen Frauen eine erhöhte Inzidenz für die Entstehung einer koronaren Herzkrankheit [33]. Diese Beobachtung und die Erkenntnis, dass dieser postmenopausale Anstieg nicht allein durch eine Zunahme der Risikofaktoren erklärt werden konnte [34] hat dazu geführt, dass vermehrt nach kardioprotektiven Wirkmechanismen des Östrogens gesucht wurde. Das weibliche Steroidhormon unterliegt im Laufe des Lebens großen Schwankungen und kann während der Schwangerschaft auf Werte bis zu 70 mmol/l ansteigen, entspricht jedoch in der Menopause mit 0,14-0,21 mmol/l in etwa dem durchschnittlichen männlichen Wert [35].

In vitro und in vivo Untersuchungen liefern viel versprechende Ergebnisse zur Wirkung der Östrogene auf das kardiovaskuläre System: In vitro Behandlungen von HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) mit physiologischen Östrogenkonzentrationen führten zu einer schnellen endothelialen NO-Freisetzung und damit zur Vasorelaxation. Vermittelt wurde dieser kardioprotektive Effekt durch den Östrogenrezeptor [36, 37].

Auch in vivo konnte gezeigt werden, dass sich der Blutfluss in den Koronararterien durch Gabe von Östrogenen bei postmenopausalen Frauen verbesserte [38]. Im Gegensatz dazu zeigten die männlichen Probanden keine Verbesserung des Blutflusses durch  $17\beta$ -Östradiol. Dies lässt auf eine sexspezifische Ausprägung der Rezeptoren in den Koronararterien schließen [39].

Bis zur Veröffentlichung der Ergebnisse der „Womens`s Health Initiative“ (WHI) im Jahr 2006 erhielten zahlreichen Frauen zur Linderung postmenopausaler Symptome eine Hormonersatztherapie. Gleichzeitig erhoffte man sich einen positiven Einfluss der exogen zugeführten Östrogene auf das kardiovaskuläre System, basierend auf den viel versprechenden in vitro und in vivo Daten. Während die verminderte endogenen Östrogenfreisetzung während der

Menopause zu einem Anstieg der Plasmatriglyzeride, des LDL-Cholesterins, des Lipoproteins (a) sowie zu einem Absinken des HDL-Spiegels führte [40], bewirkte die orale Gabe von Östrogenen ein günstigeres Plasmalipidprofil [41]. Des Weiteren gab es Hinweise auf gefäßschützende Funktionen durch exogen verabreichte Östrogene [42]. Erst mit Hilfe randomisierter Studien zur Primär- und Sekundärprävention konnten die Indikationen für eine Hormonersatztherapie bei postmenopausalen Frauen genauer untersucht werden. Sowohl die Ergebnisse der „Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study“ (HERS-II), als auch der WHI legten nahe, dass eine Hormonersatztherapie mit Östrogen und Progesteron in der späten Menopause zu einer Zunahme kardiovaskulärer Ereignisse, thrombembolischer Komplikationen sowie zu einem erhöhten Risiko an Brustkrebs zu erkranken führte [43]. In einer weiteren Studie der WHI aus dem Jahr 2006, welche nur mit Östrogen durchgeführt wurde, zeigte keinen Schutz vor Myokardinfarkt durch Hormonersatztherapie bei gesunden postmenopausalen Frauen. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Studien wird allerdings ein geringeres Risiko für KHK bei Frauen zwischen 50 und 59 nach 7 Jahren Östrogeneinnahme diskutiert [44].

Zusammenfassend bieten endogen freigesetzte Östrogene durch unterschiedliche und zum Teil noch unbekannte Mechanismen Schutz vor Arteriosklerose, während die Substitution von Östrogenen in der Menopause weiterhin umstritten ist. Die Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe empfiehlt eine individuelle Nutzen-Risiko-Abwägung gemeinsam mit der Patientin. Frauen mit bereits bestehender KHK, Hypertonus und Thrombophilie wird von einer Hormonersatztherapie eher abgeraten.

Eine Übersicht über die protektive Wirkungsweisen der endogen freigesetzten Östrogene gibt Abbildung 2:

1. antiinflammatorische Wirkung durch Hemmung der:

- Endothelzellaktivierung
- Aktivierung inflammatorischer Transkriptionsfaktoren
- Chemotaxis der Monozyten

## 2. antiatherogene Wirkung durch Hemmung der:

- Ausschüttung von Wachstumsfaktoren der Makrophagen
- Proliferation und Migration der glatten Muskelzellen
- Anhäufung von Schaumzellen in der Intima

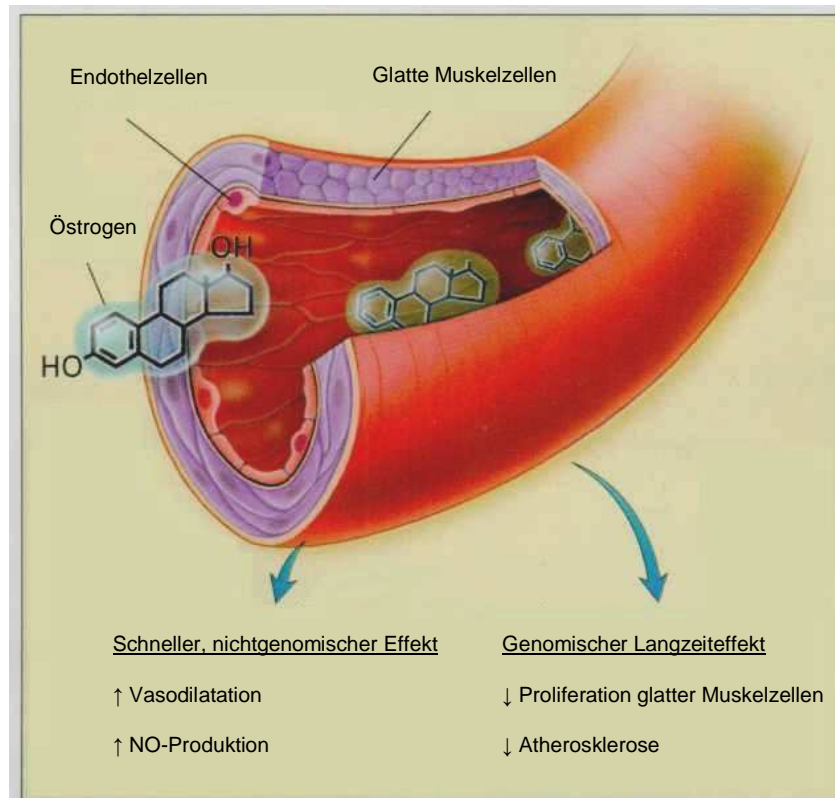


Abbildung 2: **Protektive Effekte von Östrogen auf das Gefäßsystem.** Modifiziert nach: Mendelsohn und Karas: N Engl J Med, Volume 340: 1999,1801-1811.

Mendelsohn und Karas unterscheiden dabei zwischen einer schnellen, nichtgenomischen und langsameren genomischen Wirkungen. Erstere erfolgt rezeptorvermittelt über einen intrazellulären Kalziumanstieg, der zu einer Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) führt. Die verstärkte Produktion von NO führt über cGMP zu einer verminderten Kalziumausschüttung in glatten Gefäßmuskelzellen und damit zur Vasorelaxation. Der genomische Effekt beruht auf einer Erhöhung der Transkriptionsrate durch die Bindung von dimerisierten Östrogenrezeptoren an das so genannte „estrogen response element“ (ERE).

Im Unterschied dazu scheint die exogene Gabe von Östrogen-/ Progesteron-Präparaten im Rahmen einer Hormonersatztherapie bei postmenopausalen Frauen zu einer Zunahme an kardiovaskulären Ereignissen führen. Zwei Faktoren spielen dabei eine entscheidende Rolle: der Zeitpunkt, an dem die Hormonersatztherapie begonnen wird sowie das Präparat, welches zum Einsatz kommt.

#### **1.2.4 Genetische Ausstattung**

In einer altersstandardisierten Untersuchung der KHK-Sterberaten, welche sich über 52 verschiedene Länder erstreckte, blieb das Verhältnis von betroffenen Frauen zu Männern konstant bei 1:1,8. Unabhängig von den enormen Unterschieden im Lebensstil der einzelnen Nationen, konnte somit eine sexspezifische Verteilung untermauert werden [45]. Einen Hinweis auf einen genetischen Hintergrund bietet beispielsweise eine immunologische Studie in der höhere IgM-Spiegel bei Frauen festgestellt wurden. Das Gen für IgM liegt auf dem X-Chromosom und bietet dem weiblichen Geschlecht dadurch eine bessere Möglichkeit auf Entzündungsprozesse wie der Arteriosklerose zu reagieren [46]. Auch in tierexperimentellen Studien konnten moderate sexspezifische Unterschiede in den Expressionsmustern zahlreicher Gene festgestellt werden, die nicht nur die Gonosomen, sondern auch die Autosomen betrafen [47].

### **1.3 Begründung für die Verwendung von HUVEC als gewähltes Zellkulturmodell**

An der Entstehung der Arteriosklerose sind sowohl äußere als auch genetische Faktoren beteiligt. Erstere führen bei beiden Geschlechtern zu einer Schädigung der Endothelfunktion, z.B. durch Risikofaktoren wie Rauchen, Alter, Diabetes Mellitus, arterieller Hypertonus und Dyslipidämie. Über eine veränderte Freisetzung vasoaktiver Substanzen kommt es zur gesteigerten Aufnahme von Lipoproteinen in die Intima sowie durch Adhäsion von T-Lymphozyten und Monozyten zur Bildung von Schaumzellen. Der Einfluss dieser äußeren Faktoren gilt als gesichert und war Gegenstand zahlreicher Studien. Darüber hinaus haben die weiblichen Geschlechtshormone einen Einfluss auf Genese und Progression der arteriosklerotischen Plaques und die dabei involvierten Entzündungsprozesse.

Zur Untersuchung möglicher Unterschiede in der genetischen Ausstattung von Männern und Frauen eignen sich am besten Nabelschnurzellen aus den folgenden Gründen. Zum einen ist der Einfluss von Umweltfaktoren auf das Endothel in diesem Zellkulturmodell weitgehend reduziert. Zum anderen sind Einflüsse durch männliche und weibliche Geschlechtshormone weniger ausgeprägt als im Erwachsenenalter. Insbesondere die Konzentration von Östrogenen im Nabelschnurblut kann als annähernd gleich betrachtet werden. Im Allgemeinen sind Nabelschnurzellen als Endothelzellmodell anerkannt und in unserem Labor etabliert.

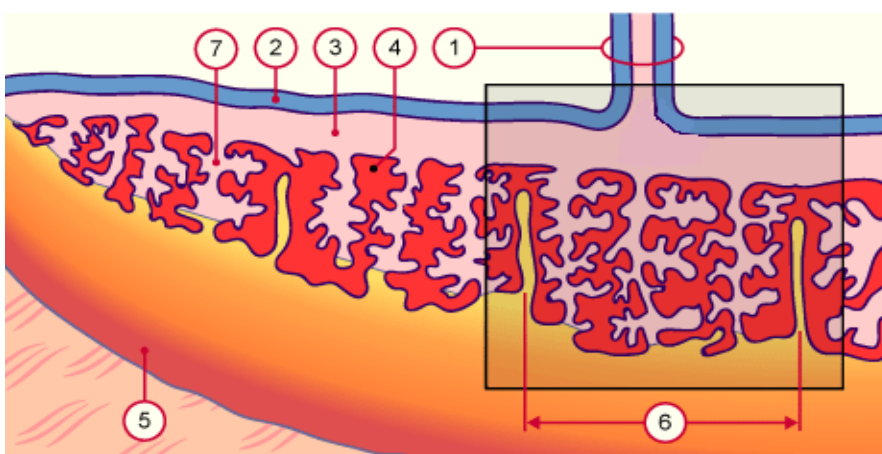
### 1.3.1 Eigenschaften

Mit spezifischen monoklonalen Antikörpern konnte nachgewiesen werden, dass HUVEC den Östrogenrezeptor  $\beta$  (ER $\beta$ ) exprimieren. Die Expressionsrate konnte durch 17 $\beta$  Östradiol auf mRNA- und Proteinebene verstärkt werden. Ebenfalls wurde in HUVEC der Progesteronrezeptor A nachgewiesen, dessen Expression unter dem Einfluss von Progesteron hochreguliert wurde [48].

### 1.3.2 Geschlechtsdeterminierung der Zellen

Abbildung 3: Schematischer Aufbau der Plazenta

- 1 Nabelschnur
- 2 Amnion
- 3 Chorionplatte
- 4 Intervillöser Raum (mütterliches Blut)
- 5 Basalplatte
- 6 Kotyledone
- 7 Chorionzotte



Modifiziert nach: [www.embryology.ch](http://www.embryology.ch)®. Entwickelt von den Universitäten Freiburg, Lausanne und Bern mit freundlicher Genehmigung.

Die Plazenta entsteht aus dem fetalen Trophoblasten und aus der mütterlichen Gebärmutter Schleimhaut. Die fetale Seite der Plazenta - also Chorionplatte (3) und Nabelschnur (1) - ist mit weißlich trübem Amnionepithel (2) bedeckt. Zwischen der Chorionplatte und der mütterlichen Basalplatte (5) befindet sich der mit mütterlichem Blut gefüllte intervillöse Raum (4). Dieser wird durch bindegewebige Plazentasepten von der Basalplatte aus in so genannte Kotyledonen (6) unterteilt. Zur Versorgung des Embryos werden die Chorionzotten von mütterlichem Blut aus den Spiralarterien umspült. Die kindlichen Gefäße entstehen im Chorion; einige sprießen in die Chorionzotten ein, andere ziehen über den Haftstiel zum sich entwickelnden Embryo, wo sie sich mit den vom Embryo gebildeten Gefäßanlagen vereinigen.

Die Nabelschnur entwickelt sich mehrheitlich aus dem Haftstiel. Der Haftstiel verlängert sich im Verlauf der Schwangerschaft, windet sich stark und wird zur Nabelschnur. Mit der Entwicklung der Amnionhöhle wird die Nabelschnur von Amnionepithel umhüllt und enthält gegen Ende der Schwangerschaft nur noch die Nabelarterien und eine Nabelvene. Umgeben werden diese Strukturen von Bindegewebe, das aus dem extra-embryonalen Mesoblast stammt. Die Nabelschnur des Embryos, der in der Amnionhöhle schwimmt, verlängert sich mit zunehmender Entwicklung des Embryos.

HUVECs eignen sich zur Untersuchung der differentiell regulierten Genexpression, da sich das venöse Nabelschnur-Endothel aus der fetalen Anlage entwickelt. Die extrahierte RNA stammt entweder von einem weiblichen oder von einem männlichen Fetus und wird für den Vergleich der sexspezifischen, basalen Genregulation verwendet.

### **1.3.3 Fetale Entwicklung und Hormoneinflüsse**

Entscheidend für die Geschlechtsdetermination beim Fetus ist das Vorhandensein des TDF, „testes-determining-factor“. Er ist in der SRY-Region, „sex-determining-region of Y“ lokalisiert und leitet die männliche Geschlechtsentwicklung ein [49]. Das Anti-Müller-Hormon der Sertolizellen führt dabei zu einer Regression der weiblichen Anlagen oder „Müller-Gänge“, während das in den Leydigzellen produzierte Testosteron zu einer Stimulation der Wolff-Gänge und der Entwicklung der äußeren Genitalien führt. Fehlt der „testes-



determining-factor“ läuft automatisch die weibliche Entwicklung über eine wegfallende Hemmung der „Müller-Gänge“ ab [50, 51].

Zwar beginnt bereits mit der Entwicklung der Gonaden ab der achten Schwangerschaftswoche die Östrogen- bzw. Testosteronproduktion, doch konnte in zahlreichen Studien kein Unterschied zwischen den Östrogenkonzentrationen männlicher und weiblicher Feten im Serum der Nabelschnurvene gefunden werden [52-56]. Tatsächlich geht man im Allgemeinen davon aus, dass das Ovar der weiblichen Feten während der Schwangerschaft weitgehend inaktiv bleibt und die gefundenen Östrogenkonzentrationen in beiden Geschlechtern überwiegend auf die plazentale und adrenale Steroidsynthese zurückzuführen ist. Der männliche Fetus hingegen entwickelt bereits im ersten Drittel der Schwangerschaft einen Feedbackmechanismus über die hypothalamo-hypophysär-gonadale Achse [57]. Dabei konnte der fetale Hoden als Quelle der Testosteronproduktion bestätigt werden [58, 59]. Diese Konzentration sinkt im zweiten Drittel der Schwangerschaft mit der abgeschlossenen sexuellen Differenzierung wieder ab [59].

Einige Studien fanden einen signifikanten Unterschied zwischen der Testosteronkonzentration des venösen Nabelschnurblutes von männlichen und weiblichen Neugeborenen [53, 54], wobei die männlichen Neugeborenen im Mittel eine Testosteronkonzentration von 0,297 ng/ml und die weiblichen eine Konzentration von 0,212 ng/ml aufwiesen [54]. Bei Herruzo wurden folgende Werte gefunden:  $6,39 \pm 3,3$  ng/ml bei männlichen und  $4,1 \pm 1,62$  ng/ml bei weiblichen Neugeborenen [53].

Dagegen konnten neuere Studien keine Unterschiede der Östrogen- wie auch Testosteronspiegel zwischen den Geschlechtern nachweisen [52, 60].

Eine Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnte im Versuchsaufbau und im Verwenden von gemischtem Nabelschnurblut liegen. Das Blut der Nabelschnurarterie fließt vom Kind zur Plazenta. Hier kommt es zu einer Extraktion der Androgene, die im weiteren Verlauf zu Östrogenen aromatisiert werden [61], so dass sich in der Nabelschnurvene, die das Kind versorgt, nur marginal erhöhte Testosteronkonzentrationen für männliche Feten finden ließen [60].

Zusammenfassend ist der Einfluss der Östrogene auf die basale Genexpression der HUVEC eher unwahrscheinlich.

#### 1.3.4 Fetaler Kreislauf

Eine genauere Charakterisierung der Einflüsse des Nabelschnurblutes auf die Zellen der Umbilikalvene zeigt die Darstellung des fetalen Kreislaufs in Abbildung 4.

Von der Plazenta ausgehend gelangt sauerstoffreiches Blut über die Umbilikalvene zum Fetus. Im Fetus erfolgt die Umgehung der Leber durch den so genannten *Ductus venosus*, welcher später mit der *Vena cava inferior* zusammenfließt. Diese führt sauerstoffarmes Blut, so dass nun Mischblut in den rechten Vorhof gelangt. Dort mündet auch die *Vena cava superior* ein, welche ebenfalls sauerstoffarmes Blut führt. Der rechte Vorhof ist mit dem linken über das *Foramen ovale* verbunden, so dass das Blut den Lungenkreislauf umgeht, um direkt in die Aorta und den Körperkreislauf zu gelangen. Das Blut, welches aus dem rechten Ventrikel in die Pulmonalarterie fließt, wird über eine weitere Shuntverbindung, den *Ductus arteriosus Botalli* der *Aorta descendens* zugeführt. Das sauerstoffarme Blut kehrt über die beiden Umbilikalarterien zurück zur Plazenta.

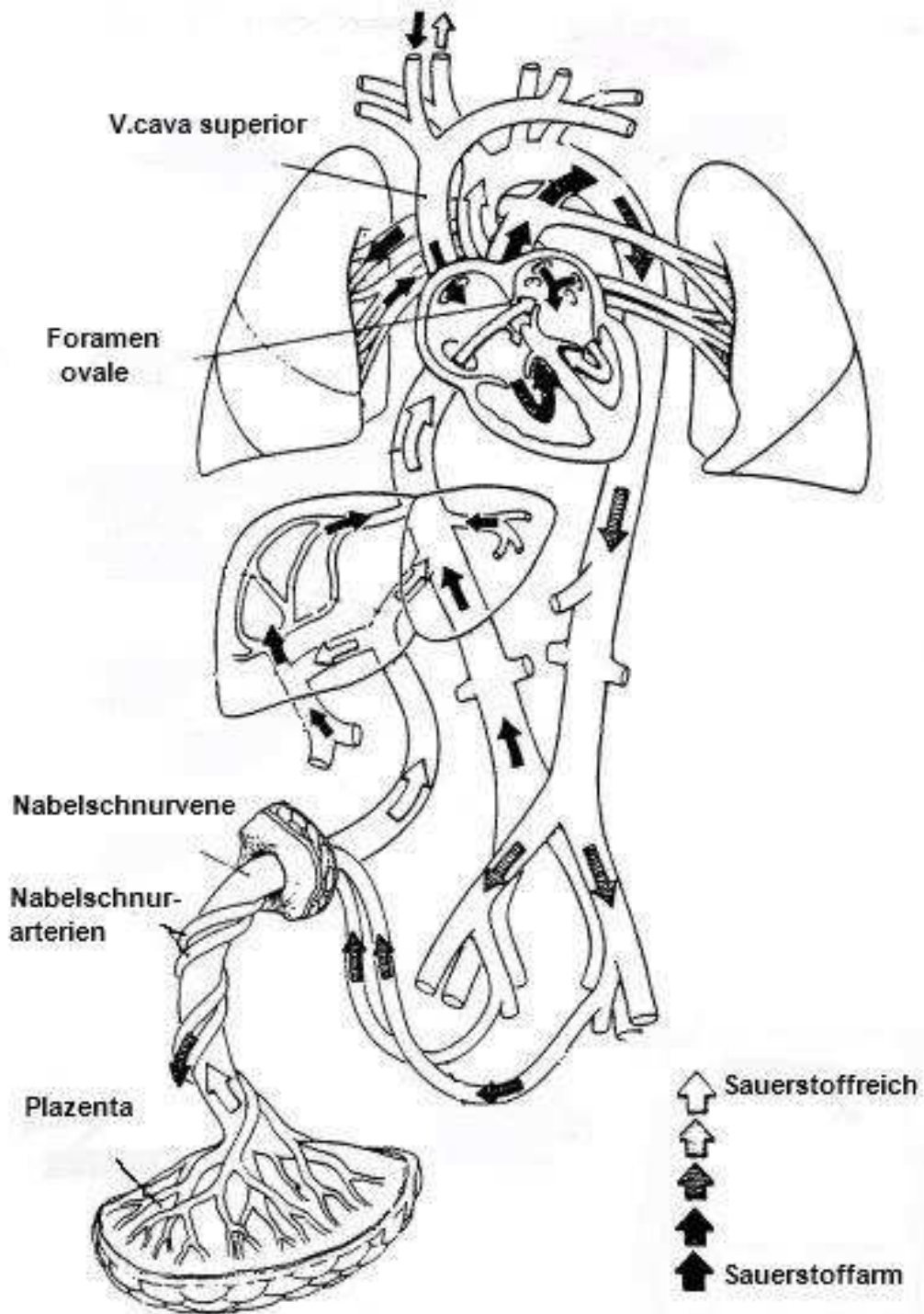


Abbildung 4: **Der fetale Kreislauf.** Das sauerstoffreiche Blut ist mit weißen Pfeilen von der Plazenta kommend dargestellt. Je geringer der Gehalt an  $O_2$ , desto dunkler wird der Pfeil. In den Nabelschnurarterien, die das Blut zur Plazenta zurückführen, ist sauerstoffarmes Blut vorhanden. Modifiziert nach: [narenthorn.or.th/fetal\\_circulation](http://narenthorn.or.th/fetal_circulation)

### 1.3.5 Zielsetzung der Arbeit

Das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse bei Frauen steigt deutlich ab Beginn der Menopause. Der perimenopausal graduierlich abnehmende Östrogenspiegel hat nicht nur einen negativen Einfluss auf zahlreiche Risikofaktoren der KHK, sondern auch auf die vaskuläre Reaktivität.

Neben hormonellen Einflüssen und Unterschieden im Risikoprofil, könnte auch ein sexspezifisches Genexpressionsprofil eine Rolle bei der Entstehung der KHK spielen. Dabei konzentrierten wir uns im Wesentlichen auf drei Bereiche:

1. Gene mit Einfluss auf die Vasoreaktivität
2. Gene mit Einfluss auf den oxidativen Status
3. Gene mit Einfluss auf die zelluläre Stressantwort

Zur Untersuchung dieser Hypothese boten sich männliche und weibliche Nabelschnurzellen an. Diese Zellen sind von den zuvor skizzierten sexspezifischen Risikofaktoren für die Entwicklung von Arteriosklerose (Lebensstil, Alter, Rauchverhalten, Dyslipidämie, Diabetes mellitus und arterieller Hypertonus) weitgehend unabhängig und eignen sich deshalb zur Untersuchung des sexspezifischen Genexpressionsprofils.

In mehreren Studien wurden keine unterschiedlichen Östrogenkonzentrationen im Nabelschnurblut zwischen männlichen und weiblichen Feten nachgewiesen. Dadurch wirkt sich der kardioprotektive Effekt des Steroidhormons in gleichem Maße auf die männlichen und weiblichen Endothelzellen aus und kann nicht als mögliche Ursache für potentiell unterschiedliche Genexpressionen von arterioskleroserelevanten Genen herangezogen werden.

Die Endothelzellen der humanen Nabelschnurvene (HUVEC) wurden aus den Nabelschnüren isoliert und anschließend kultiviert. Dabei wurde für die männlichen und weiblichen Zellen das gleiche Kulturmedium mit gleichen Hormonkonzentrationen verwendet. Dies ermöglicht eine von hormonellen Faktoren weitgehend unabhängige Untersuchung der Genexpression.

Zusammenfassend sind HUVEC also sehr gut geeignet, um das sexspezifische Genexpressionsprofil zu einem frühest möglichen Zeitpunkt zu untersuchen.

## 2 Methodik

### 2.1 RNA-Extraktion aus dem Blut

Zur sicheren Geschlechtsbestimmung der venösen Nabelschnurzellen diente das Gen *Sex determining region of Y* (SRY) als Nachweis für einen männlichen Chromosomensatz, während das Gen für Interleukin-2-Rezeptor- $\gamma$  zur Bestätigung der Integrität des X-Chromosoms herangezogen wurde. Zusätzlich wurde aus humanem Blut sowohl eine weibliche als auch eine männliche RNA isoliert, um diese als Vergleichsprobe bei der Geschlechtsbestimmung mitzuführen. In der folgenden Untersuchung diente die aus den HUVEC extrahierte RNA zur Durchführung der Realtime RT-PCR, während die DNA als Reserve zur weiteren genetischen Charakterisierung, wie beispielsweise der Bestimmung von Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP), zur Verfügung stand.

#### **Materialien:**

QIAamp RNA Blood-Kit von QIAGEN

#### **Durchführung:**

Hierzu wurde 1 ml humanes Vollblut mit 5 ml EL-Puffer (EL = Erythrozytenlyse) gemischt. Die rötlich trübe Suspension wurde 15 bis 20 Minuten auf Eis inkubiert und währenddessen zweimal kurz gevortext. Im Verlauf klärte sich die Suspension auf, welches auf die beginnende Lyse der Erythrozyten zurückzuführen ist. Danach wurden die Proben bei 4°C und 500 rpm zentrifugiert und der Überstand vollständig verworfen. Die Leukozyten bildeten ein Pellet an der basalen Innenseite des Gefäßes.

Es folgte ein erneuter Waschvorgang mit EL-Puffer von 2 ml. Die Zellen wurden durch kurzes Vortexen resuspendiert und erneut für 10 min bei 500 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum vollständig verworfen. Anschließend wurden 600  $\mu$ l RLT-Puffer mit  $\beta$ -Mercaptoethanol (=  $\beta$ -ME, im Verhältnis 10  $\mu$ l  $\beta$ -ME pro 1 ml RLT Puffer) dazugegeben, um die Leukozyten aufzuschließen. Das Lysat wurde zur Homogenisierung auf eine QIAshredder Spinnsäule gegeben und 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die Spinnsäule wurde danach verworfen. Zum Lysat wurden 400  $\mu$ l 70% Ethanol gegeben.

Alle folgenden Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Die Probe wurde auf eine neue QIAamp Spinnsäule in einem 2 ml Sammelgefäß pipettiert und kurz (15-30 sec) bei 10.000 rpm zentrifugiert. Dabei wurde die RNA an die Silicagel-Membran gebunden.

Die Säule wurde in ein neues 2 ml Sammelgefäß gegeben und in den folgenden Schritten gewaschen. Zuerst mit 700 µl RW1-Puffer mit darauf folgender Zentrifugation für 15-30 sec bei 10.000 rpm. Durchfluss und Auffanggefäß wurden verworfen.

Die QIAamp Spinnsäule wurde auf ein neues 2 ml Sammelgefäß gesteckt und 500 µl RPE Puffer zugegeben. Es folgte eine erneute Zentrifugation für 15-30 sec bei 10.000 rpm. Der Durchfluss wurde verworfen.

Erneut wurde 500 µl RPE Puffer auf die Säule pipettiert und 3 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert.

Die QIAamp Spinnsäule wurde nun auf eine neue 1,5 ml Tube gesteckt und 30 µl RNase freies Wasser direkt auf die Membran pipettiert. Anschließend wurden die Proben eine Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert. Dieser Elutionsschritt kann wiederholt werden, falls im Ansatz mehr als 0,5 ml Vollblut verwendet wurden.

## 2.2 Zellkultur

### Materialien

MCDB 131 Endothelial Cell (EC) Medium		Invitrogen
MCDB 131 Supplement-Mix	1ng/ml bFGF	Biomol
	2% FCS	Sigma
	1 µg/ml Hydrokortison	PromoCell
	2ml ECGS	Invitrogen
	100 U/ml Penicillin	Invitrogen
	100µg/ml Streptomycin	Invitrogen
	5 ml L-Glutamin	Biochrom
	5 U/ml Heparin	Biomol
	0,1ng/ml EGF	Invitrogen
Kollagenase Typ II		Biochrom
Trypsin-EDTA	in HBSS ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	Invitrogen

**Durchführung**

Als Standardbedingungen wurden alle Zellen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Begasung in Zellkulturflaschen (T75) kultiviert. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurde an einer Sterilbank mit laminarer Luftströmung gearbeitet.

Endothelzellen der humanen Nabelschnurvene (HUVEC) wurden mittels Kollagenase Typ II Verdau aus Nabelschnüren isoliert und in EC-Medium Supplement-Mix kultiviert. Bei Konfluenz der Zellen wurde das Medium abgesaugt, der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen und die Zellen mit 1 ml Trypsin-EDTA vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst. Nach einer Inkubationszeit von 3 Minuten bei 37°C wurde das Trypsin durch Verdünnung mit FCS-haltigem Medium inaktiviert. Die trypsinisierten Zellen wurden im Medium resuspendiert und auf neue Zellkulturflaschen verteilt. Für die Experimente wurden die Zellen in 6 -cm Schalen ausplattiert. Es wurden stets HUVEC der Passage zwei verwendet.

**2.3 RNA-Extraktion aus HUVEC****Materialien:**

RNeasy-Kit von QIAGEN

**Durchführung:****1) Homogenisierung:**

Konfluente Zellen der Passage zwei wurden in 1 ml Trizol aufgenommen, in ein 1,5 ml Eppendorftube übertragen und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Trizol ist eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat. Es homogenisiert Gewebe, ohne die RNA-Integrität zu zerstören. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur wurde je 200 µl Chloroform dazugegeben und gründlich geschüttelt.

## 2) Phasentrennung

Daran schloss sich eine Inkubation von 3 min bei Raumtemperatur an, gefolgt von einer Zentrifugation bei 10.000 rpm und 4°C für 12 min. Dabei erfolgte eine Trennung der Lösung in eine untere organische Phase, eine mittlere milchige Phase und eine obere farblose, wässrige Phase.

## 3) Präzipitation

Vorsichtig wurde die RNA enthaltende wässrige Phase mit einer Pipette entnommen und in ein sauberes 1,5 ml Eppendorftube überführt, während die organische Phase mit der gelösten genomischen DNA und die Interphase mit angereicherten Proteinen im Eppendorftube verblieben.

Nach Zugabe von 500 µl Isopropanol und vorsichtiger Vermischung, wurde die RNA für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte eine erneute Zentrifugation bei 10.000 rpm und 4°C für 30 min. Das RNA Präzipitat, welches vor der Zentrifugation häufig nicht sichtbar ist, bildet nun ein gel-artiges Pellet an der Innenwand des Eppendorftube.

## 4) Waschung und Lösen der RNA

Der Überstand wird abpipettiert und verworfen. Das Pellet daraufhin mit 1,5 ml 70% Ethanol (in DEPC-Wasser) gewaschen und erneut bei 10.000 rpm für 20 min zentrifugiert. Es folgt eine erneute Abnahme des Überstandes mit anschließender Zentrifugation bei 10.000 rpm für 2 min und der vollständigen Entfernung des Alkohols.

Schließlich wird das Pellet in 30 µl H<sub>2</sub>O (Aqua ad iniectionabilia, Braun 10 ml, 9466C12) aufgelöst und bei -80°C gelagert.



## 2.4 Photometrische RNA-Vermessung

### Materialien:

Spectrophotometer DU 640

Beckmann

### Durchführung:

Die Konzentration von RNA-Lösungen wurde nach erfolgter Kalibrierung des Photometers mit Aqua dest. spektralphotometrisch über die Extinktion bei 260 nm bestimmt. Um den Reinheitsgrad der Lösung zu ermitteln wurde weiterhin die Extinktion bei 280 nm gemessen.

Die Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm erlaubt mittels des Lambert-Beer-Gesetzes die Berechnung der RNA Konzentration. Zusätzlich wurde die Proteinkontamination mit Hilfe der Ratio OD 260 nm/ OD 280 nm in den Proben ermittelt. Während die Nukleinsäuren zwei Absorptionsmaxima bei 260 nm und 280 nm in einem Verhältnis 2:1 aufweisen, haben Aminosäuren ihr Absorptionsmaxima bei 280 nm. Daraus ergibt sich bei Verunreinigungen der RNA mit Protein eine Ratio der OD 260 nm/ OD<sub>280</sub> nm < 2. Eine Ratio im Bereich 1,6- 2,0 stellt einen akzeptablen Reinheitsgrad dar.

Für die RNA wird die Konzentration wie folgt berechnet:

RNA-Konzentration in ng/µl = OD 260 x Verdünnungsfaktor x 40

## 2.5 Umschreibung von RNA in cDNA

### Materialien:

MMLV Reverse-Transkriptase

Invitrogen

5x Reverse Transkriptase Puffer

Invitrogen

Ultrapure dNTP Set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

Pharmacia Biotech

Dnase I

Ambion

RNasin Ribonuclease Inhibitor

Promega

Oligo-d(T)<sub>16</sub> Primer (DTT)

TIB MOLBIOL

Random Hexamer Primer

TIB MOLBIOL

**Durchführung:**

Für die Reverse Transkription von RNA zu cDNA wurden 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Zum initialen DNase-Verdau wurde die RNA mit 0,5 µl DNase versetzt und der Ansatz mit Aqua ad iniectabilia auf ein Gesamtvolumen von 9 µl gebracht. Der Reaktionsansatz wurde im Thermocycler für 15 Minuten bei 37°C und zur Enzymaktivierung für weitere 5 Minuten bei 75°C inkubiert. Anschließend wurden 2 µl Random Hexamere dem Ansatz hinzugefügt und für 10 Minuten bei 70°C, danach für 5 Minuten auf Eis inkubiert.

Anschließend wurden zu einem 20 µl Gesamtansatz 4 µl 5x Reverse Transkriptase Puffer, 1 µl dNTP (10 mmol/l), 2 µl DTT (100 mmol/l), 0,5 µl RNasin, sowie 1 µl MMLV Reverse Transkriptase gegeben. Der Ansatz wurde für 5 Minuten bei 25°C und weitere 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Aufbewahrung von cDNA-Proben erfolgte bei -80°C.

**2.6 Polyacrylamidgel****Materialien:**

10x TBE-Puffer, pH 8,0	900 mM Tris
	900 mM Borat
	25 mM EDTA
20% Polyacrylamid	Rotiphorese Gel 40 (29 :1) von Roth Serva
10% Ammoniumpersulphat	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine von Sigma
TEMED	
Ladepuffer	80% Glycerol [v/v] 0,25% Bromphenolblau [w/v] 0,25% Xylenxyanol [w/v] in Aqua ad iniectabilia
1% Agarose	Roth
M8-DNA-Größenmarker	Invitrogen

---

100 bp DNA Größenmarker	Invitrogen
10 bp DNA Größenmarker	Invitrogen
Elektrophoresekammer	Easy-Cast
Elektrophorese Stromversorgungsgerät:	Biometra
Elektrophorese - PowerPack P24	
UV-Transluminator	Biometra
Kamera: CF 8/1 FMC	Kappa

**Durchführung:**

Die Produkte der SYBR Green- und Taqman-PCR wurden zur Kontrolle der Produktgröße auf einem Gel aufgetragen. Aufgrund der geringen Größe der DNA-Fragmente wurde ein 20% Polyacrylamidgel gewählt. Zur Herstellung wurden 7,5 ml 20% Polyacrylamid (Acrylamid/Bisacrylamid im Verhältnis 29:1, Rotiphorese Gel 40, welches mit 10x TBE im Verhältnis 1:2 verdünnt wurde) mit 10 µl TEMED und 25 µl 10% APS [w/v] versetzt. Als Fußgel diente ein 1% Agarosegel (1 g in 100 ml 1x TBE-Puffer gelöst). Die Dicke des Gels betrug 1 mm, als Elektrophorese-Puffer wurde 1x TBE verwendet. Aus der Primermatrix wurde das Produkt mit der niedrigsten Zykluszahl ausgewählt, falls es mit der vom Hersteller angegebenen Schmelztemperatur übereinstimmte. 15 µl des PCR-Produkts wurden mit 1,5 µl Ladepuffer versetzt und in die Geltasche pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 200 Volt für eine Dauer von 1 - 1,5 Stunden. Bei dem Lauf wurden zwei DNA-Größenmarker mitgeführt: 100 Basenpaare (bp) und 10 bp oder 100 bp und Marker 8 (M8). Die Anfärbung des Gels erfolgte mit 10 µl Ethidiumbromid (Stammkonzentration 1 µg/ml) pro 100 ml 1x TBE-Puffer. Anschließend wurden die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit einer Spezialkamera und dem Programm Image-Master (Pharmacia Biotech) dokumentiert.

## 2.7 Realtime-RT-PCR

### Materialien:

Realtime GeneAmp 5700 Sequence Detection System	Applied Biosystems
TaqMan Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems

**Tabelle 1:** Realtime-RT-PCR: Primer und Sonden. Es wurden die SYBR Green- und die Taqman-Methode verwendet. Bei letzterer ist der Fluoreszenzfarbstoff an eine Sonde gebunden.

Primer	5' Sequenz 3'
IL2RG hum. F	5` - TCTTgAACCACTgTTTggAgCACT
IL2RG hum. R	5` - CACACTAggCAAggAgAACTTATgTC
IL2Rg hum. Sonde	5` - ACTgggACCACAgCTggACTgAACAATCAgT
SRY hum. F	5` - AgTTTCgCATTCTgggATTCTCT
SRY hum. R	5` - gCgACCCATgAACgCATT
SRY hum. Sonde	5` - TggTCTCgCgATCAgAggCgC
Beta-Actin hum. F	5` - TgA ggCACTCTTCCAgCCTT
Beta-Actin hum. R	5` - CgTCACACTTCATgATggAgTTg
eNOS hum. F	5` - AAgAggAAggAgTCCAgTAACACAgA
eNOS hum. R	5` - ACgAgCAAAggCgCAgAA
eNOS Sonde	5` - TgggCACCCCTCAggTTCTgTgTgTT
eNOS 13A hum. F	5` - TggTAACCAgCACATTTgggA
eNOS 13A hum. R	5` - CAggCgAAACTATTCTgTggTgA
eNOS 13A hum. Sonde	5` - TggAgAgTCTgTCTCCCTgCCAgAAgTg
eNOS 13B hum. F	5` -TggTAACCAgCACATTTgggA
eNOS 13B hum. R	5` - CCTgggCAACATggCgA
eNOS13B hum. Sonde	5` - CCCggAgAATggAgAgAgATggg
eNOS 13C hum. F	5` - TggTAACCAgCACATTTgggA
eNOS 13C hum. R	5` - TgAgCCgTgATTgTACTACTgCACT
eNOS 13C hum. Sonde	5` - AgAATggAgAgggTCTCACTTTgTggCC
Caveolin1 hum. F	5` - TTgTACCATGCATTAAGgAgCTTCCT

Caveolin1 hum. R	5` - TAgACACggCTggTgCACTg
Endothelin-1 hum. F	5` - AAACATTCCAAGAAAaggTTAAggAgTT
Endothelin-1 hum. R	5` - gAAAgAAgAgACCAAAGCAgTTACCA
ACE hum. F	5` - CCTggTgACTgATgAggCTgA
ACE hum. R	5` - TCCACACCACCTgggATgT
SOD-1 hum. F	5` - TggTCCATgAAAAAgCAgATgACT
SOD-1 hum. R	5` - gCCAAACgACTTCCAAGCgT
SOD2 hum. F	5` - AATTgCTgCTTgTCCAAATCAg
SOD2 hum. R	5` - TgCTCCCACACATCAATCCC
Catalase hum. F	5` - ggCAgTTTATTgCAAATTCCATTATAA
Catalase hum. R	5` - gggAAAgTCTCgCCgCAT
HMOX-1 hum. F	5` ggCCAgCAACAAAgTgCAAg
HMOX-1 hum. R	5` - CAgAAAgCTgAgTgTAAggACCCAT
GPX-3 hum. F	5` gCACCATTcggTCTggTCATT
GPX-3 hum. R	5` - CggACATACTTgAgggTAggAA
NOX-4 hum. F	5` - TgTATATTgATggTCCTTTTggAAgTC
NOX-4 hum. R	5` - TCCAATgCCTCCAAGCCAC
p52+66 hum. F	5` - AATACCTCAggAACCCACCCA
p52+66 hum. R	5` - CTCTTCCTCCTCCTCATCCCAT
p66 hum. F	5` - TAgTCCCCTACCCTgTgCTCC
p66 hum. R	5` - CCCAgCCgggTTggC
Hsp70 hum. F	5` - CAAGCAgACgCAgATCTTCACC
Hsp70 hum. R	5` - TgTCTTTcTgTCATggCCCTC
Hsp90 hum. F	5` - ggACCAgAAATCCCgACgATAT
Hsp90 hum. R	5` - TCCCAgTCATTggTCAAgCTCT
ICAM-1 hum. F	5` - gATTgTCATCATCACTgTggTAgCA
ICAM-1 hum. R	5` - TggCggTTATAgAggTACgTgC

**Durchführung:**

Die Realtime-RT-PCR („polymerase-chain-reaction“) erlaubt die Bestimmung der Expressionsrate eines cDNA-Segments in einer Probe. Dabei wird zur Amplifikation das Enzym DNA-Polymerase benutzt, welches kurze spezifische Oligonukleotide, sogenannte „Primer“ benötigt, um das spezifische Genomfragment zwischen zwei Regionen bekannter Nukleotidsequenz zu vermehren. Voraussetzung hierfür ist zum einen die Auswahl genspezifischer Oligonukleotide, zum anderen die Kalibrierung dieses Systems mit cDNA-Lösungen bekannter Expressionsrate. Hierbei wurde Beta-Actin als sogenanntes Housekeeping-Gen verwendet.

**Tabelle 2:** Wichtige Parameter zur Auswahl geeigneter Realtime-RT-PCR Oligonukleotide:

<b><i>Parameter</i></b>	<b><i>Sollgröße</i></b>
<b><u>Primer</u></b>	
Länge	9-40 bp
Schmelzpunkt	58-60°C
GC-Gehalt	20-60%
Nukleotidsequenz	Max. 3 G in Folge
<b><u>Taqman Sonde</u></b>	
Länge	9-40 bp
Schmelzpunkt	68-70°C
GC-Gehalt	20-60%
Nukleotidsequenz	Maximal 3 G,A,T oder C in Folge, kein G am 5`Ende
<b><u>Amplikon</u></b>	
Länge	70-120 bp
Schmelzpunkt	Max. 85°C

Zur Auswahl geeigneter Primer, Sonden und des Amplikons müssen die in Tabelle 2 dargestellten Kriterien beachtet werden. Beispielsweise kann die Sonde nur dann stabil an die gewünschte Zielsequenz hybridisieren, wenn der GC-Gehalt 20-60% beträgt und mehr als drei Nukleotide eines Typs in Folge vermieden werden.

Ansonsten kann der nächste Schritt, die Hydrolyse der Sonde durch die 5'-3' Exonuklease Aktivität der Polymerase, nicht erfolgen.

Um eine ausreichende Spezifität zu erzielen, sollte die Länge der Sonden ca. 9 - 40 bp betragen, wobei die optimale Länge zwischen 24 und 30 Nukleotiden liegt. Längere Sonden verursachen aufgrund von Sekundärstrukturausbildungen Probleme bei der Amplifizierung.

Jede Realtime-RT-PCR stellt eine wiederholte Abfolge von Zyklen dar. Jeder dieser Zyklen besteht aus drei Schritten. Vor dem ersten Zyklus erfolgt die Initiierung des Prozesses für 2 Minuten bei 50°C sowie die Aktivierung der Polymerase für 10 Minuten bei 95°C.

### 1. Schritt: Trennung des DNA-Doppelstrangs („Denaturierung“).

Durch Erhitzen auf eine Temperatur von 95°C für 15 Sekunden werden die beiden Stränge der DNA voneinander getrennt, indem die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen durch Hitze zerstört werden.

### 2. Schritt: Anlagerung („Annealing“) eine Minute bei 60°C

Anlagerung der beiden Primer an die DNA-Einzelstränge. Diese werden so ausgewählt, dass sie komplementär zum 5'- bzw. 3'- Ende der Zielstränge sind, wobei sie die zu amplifizierende Region begrenzen. Die Primer werden relativ zur Menge an Ziel-DNA im Überschuss zum Reaktionsansatz gegeben, so dass sich die beiden komplementären Zielstränge eher mit den Primern als miteinander verbinden. Die Anlagerungstemperatur  $T_a$  liegt normalerweise zwischen 40°C und 60°C. Sie ist abhängig von der Basenzusammensetzung des Primers und der sich daraus ergebenden Schmelztemperatur  $T_m$ .

### 3. Schritt: Verlängerung („Elongation“)

Die Primer dienen als Startpunkte für die DNA-Polymerase, die die matrizenabhängige Synthese des komplementären zweiten Strangs katalysiert. Die Zeitdauer eines Zyklus ist von der Länge des PCR-Produktes abhängig und liegt zwischen 30 Sekunden und 2 Minuten. Die Schritte eins bis drei werden 25- bis 40-mal wiederholt, wobei nach jedem Zyklus die Anzahl amplifizierter Fragmente theoretisch verdoppelt worden ist.

Dabei lassen sich zwei Techniken der Realtime-RT-PCR unterscheiden, die im Folgenden kurz erläutert werden.

### **2.7.1 SYBR-Green-RT-PCR**

Diese Methode baut auf einem herkömmlichen PCR-Ansatz auf, dem ein Fluoreszenzfarbstoff (SYBR Green, Applied Biosystems, Weiterstadt) zugesetzt ist. Ein Fluoreszenzsignal ist erst messbar wenn der Farbstoff in die doppelsträngige DNA interkaliert, so dass die Stärke des emittierten Signals direkt mit der Menge neu synthetisierter DNA korreliert. Zyklus für Zyklus wird der Fluoreszenzanstieg durch eine CCD („charge-coupled device“) Kamera erfasst. Um Verfälschungen der Ergebnisse durch fluktuierende PCR-unabhängige Fluoreszenzen zu vermeiden, wird die Emission des Reporterfarbstoffs durch die Referenzfarbstoffemission dividiert. Der PCR-Zyklus bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt, wird als Threshold (Ct) bezeichnet. Mit Hilfe von Standards, die bei jedem PCR-Lauf mitgeführt werden, können nun aus den gemessenen Ct-Werten die Genexpressionsraten berechnet werden.

### **2.7.2 Taqman-RT-PCR**

Die Taqman-Methode benutzt ein ähnliches Prinzip wie die SYBR-Green Methode, jedoch ist der Fluoreszenzfarbstoff bei diesem Ansatz an eine Sonde gebunden. Die hier verwendeten „Double Dye“ Sonden tragen zwei Fluorochrome auf einer Sonde. Der Reporterfarbstoff befindet sich hier am 5`Ende, der Quencherfarbstoff am 3`-Ende. Solange die Sonde intakt ist, ist die emittierte Lichtstärke des Reporters gering, da das Aussenden des Fluoreszenzsignals durch die räumliche Nähe des Quenchers verhindert wird. Erst wenn die Sonde durch die Exonukleaseaktivität der verwendeten Taq DNA Polymerase hydrolysiert wird, kann ein Fluoreszenzsignal ausgesandt werden. Dieses korreliert direkt mit der Menge an neu synthetisierter DNA.

### **2.7.3 Primermatrix**

Alle Realtime-RT-PCR Untersuchungen wurden in Zweifachansätzen in 96-well Platten zu je 25 µl Volumen durchgeführt. Bei jedem Lauf wurde eine „No template control“ (NTC) mitgeführt, die keine DNA enthielt. Anhand dieser Kontrolle wurden unspezifische Signale erkannt, die für die Festsetzung des Schwellenwerts, der Rauschen von Signal trennt, bedeutend waren. Zur Ermittlung der effektivsten Primerkonzentration wurde zuerst eine Primermatrix erstellt, in der R- und F-Primer



der Konzentrationen von 50 mmol/l, 300 mmol/l und 900 mmol/l in allen Kombinationsmöglichkeiten eingesetzt wurden. Höhere Primer-Konzentrationen erlaubten in der Regel effektivere Amplifizierungen, jedoch stieg gleichzeitig die Menge unspezifisch amplifizierter DNA-Segmente. Beste Ergebnisse wurden mit Primer-Konzentrationen von 300 mmol/l bzw. 900 mmol/l erzielt.

Optional konnte ein weiterer Optimierungsschritt angeschlossen werden mit den Kombinationsmöglichkeiten der Konzentrationen 100 mmol/l, 300 mmol/l und 900 mmol/l.

#### **2.7.4 Standardkurve**

Für jedes zu untersuchende Gen wurde eine Verdünnungsreihe erstellt, mit folgenden Verdünnungsfaktoren für die cDNA: 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64. Im Anschluss erfolgte eine Realtime-RT-PCR mit den gleichen Verhältnissen von Primern, Mastermix und Sonden, wie sie auch in der darauf folgenden PCR gegeben sein sollten. Aus diesen Ergebnissen wurde eine Standardkurve erstellt, wobei auch hier Beta-Actin als Referenzgen diente. Als Steigungsoptimum wurde der Wert -3,4 festgelegt und sollte, um statistisch signifikant zu sein, mindestens aus fünf Werten bestehen.

### **2.8 Microarray**

Die DNA-Array-Technologie baut auf etablierten konventionellen molekulargenetischen Verfahren auf, die auf der Hybridisierung komplementärer Nukleinsäurestränge beruhen. Genspezifische Sonden in definierter Anordnung (Array) werden auf einer festen Matrix aufgebracht und die zu untersuchende zelluläre DNA- oder RNA-Probe wurde hybridisiert. Dabei wurde das *Whole Genome Oligo Microarray* eingesetzt, das alle bekannten humanen Gene berücksichtigte. Folgende Schritte wurden dabei durchgeführt:

1. Qualitätskontrolle der RNA-Proben via Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) mit Berechnung der RIN (RNA Integrity Number), wobei eine RIN von 10 für eine perfekte, eine RIN von 1 für eine schlechte Qualität der RNA steht. Ausreichend für die Durchführung des Microarrays ist eine RIN von mindestens 6.

2. Lineare Amplifikation der RNA mittels „Low RNA Input Linear Amp Kit“ (Agilent Technologies) Für die Synthese der cDNA wurde 1 µg RNA eingesetzt und mittels ND-1000 Spektralphotometer vermessen
3. Gensonden-Immobilisierung mit geordneter Anordnung auf einem Träger (Array bzw. Chip)
4. Fluoreszenz-Markierung des Probenmaterials
5. Hybridisierung der Proben mit den Gensonden auf Basis des „Agilent 60-mer oligo microarray processing protocol“ mittels „Agilent Gene Expression Hybridization Kit“ nach Herstellerangaben
6. Waschung der Microarrays mit 0,005% N-lauroylsarkosin enthaltendem 6 x SSPE Buffer für 1 min bei Raumtemperatur, gefolgt von einer zweiten Waschung mit 0,005% N-lauroylsarkosin enthaltendem 0,06 x SSPE Buffer für 1 min bei 37°C und abschließend eine Waschung mit Acetonitril für 30 sec.
7. Nachweis (Scan-Verfahren), Dokumentation und bioinformatische Auswertung des Experiments anhand der Fluoreszenzsignale mittels „Agilent`s Microarray Scanner System“ und Erstellung einer Liste mit Rohdaten.

## 2.9 Statistische Auswertung

Die ermittelten Daten der Realtime RT-PCR wurden mit der Software SigmaStat (Version 2.0, Jandel Cooperation® 1992-1995) auf signifikante Unterschiede untersucht. Dazu wurden *t*-Tests für zwei unabhängige Stichproben und *Mann-Whitney-U*-Tests durchgeführt.

Die statistische Auswertung des Microarrays erfolgte durch Miltenyi®. Zuerst wurden die Daten mit Hilfe der RosettaResolver® Software (Rosetta Inpharmatics) einer statistischen Analyse unterzogen. Folgende Methoden wurden verwendet: *t*-Test bzw. „Significance Analysis of Microarrays“(SAM). Dabei wurden Gene identifiziert, die konsistent in allen fünf Experimenten differentiell exprimiert waren und anschließend deren Ratio gebildet.

### 3 Ergebnisse

Wir wählten „Human-Umbilical-Vein-Endothelial-cells“ (HUVEC) aus, da bei ihnen im Gegensatz zu anderen Zellen eine Beeinflussung durch umweltbedingte Faktoren weitgehend ausgeschlossen werden konnte. Zuerst wurden HUVEC aus der Vena umbilicalis isoliert. Insgesamt erhielten wir 34 Nabelschnüre, aus denen die RNAs extrahiert wurden, um deren Genexpressionsmuster in der Realtime-RT-PCR miteinander zu vergleichen. Es erfolgte die Umschreibung von 1 µg RNA in cDNA durch die RT-PCR. Die fertige cDNA diente zur Bestimmung der männlichen und weiblichen Genexpressionsmuster. Des Weiteren wurden von jeder Zellkultur auch DNA und Proteine isoliert, die zu einem späteren Zeitpunkt zum einen der Bestimmung von DNA-Polymorphismen und DNA-Repeats dienen sollten, zum anderen der Bestimmung der Proteinexpression im Westernblot. Zusätzlich wurden alle Zellen rückgefroren, mit der Möglichkeit des Wiederauftauens und der Durchführung relevanter Assays z.B. Enzymbestimmungen und Aktivitätstests. Unter anderem diente diese Maßnahme zur Überprüfung einer funktionellen Relevanz potentieller Genexpressionsunterschiede.

#### 3.1 Geschlechtsbestimmung der HUVEC

Zunächst erfolgte die Geschlechtsbestimmung der HUVEC. Hierzu verwendeten wir die Expressionsrate von SRY, einem Gen, welches sich ausschließlich auf dem Y-Chromosom befindet und für die Entwicklung des männlichen Phänotyps verantwortlich ist [62, 63]. Die Expressionsraten für SRY der 34 HUVEC sind in Abbildung 5 dargestellt.

C(t)

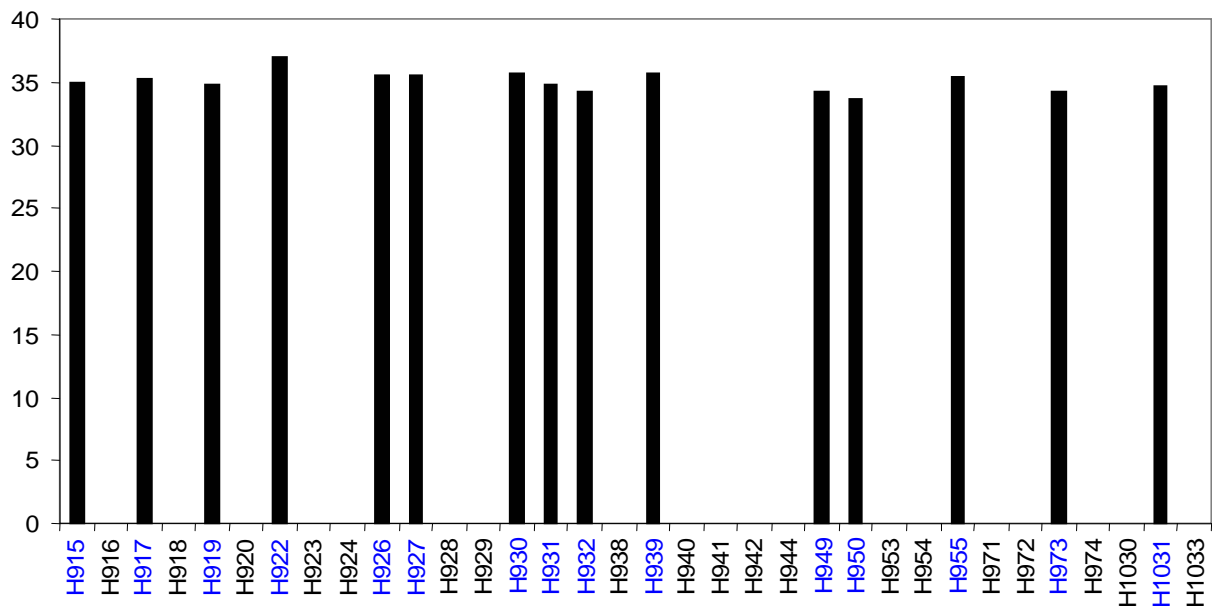


Abbildung 5: **SRY- Expressionsraten der HUVEC.** Nachweis des Gens *Sex determining region of Y* zur Bestimmung des männlichen Chromosomensatzes. Auf der X-Achse sind die 34 Proben dargestellt. Die Y-Achse zeigt die Zykluszahl C(t).

Insgesamt wurden 34 Proben auf die SRY-Expressionsrate überprüft. Die Abbildung zeigt für die cDNA von 15 HUVECs eine deutliche Expression, während die übrigen 19 Proben kein SRY exprimieren. Daraus ergeben sich 15 Proben (hier blau dargestellt), die einem männlichen Chromosomensatz zuzuordnen sind, während 19 RNAs von weiblichen Individuen stammen. Als Ursache für das fehlende Signal für SRY bei den HUVEC kommen potentiell zwei Gründe in Betracht. Zum einen das Fehlen der SRY-Region bei weiblichen HUVEC oder eine mögliche Degradation der RNA. Um letzteres auszuschließen wurden alle Proben auf die Expression von Interleukin-2-Rezeptor- $\gamma$  (IL-2-RG) untersucht. Dieses Gen befindet sich auf dem X-Chromosom. Die Expressionsrate von IL-2-RG ist in der folgenden Abbildung für alle 34 RNAs dargestellt.

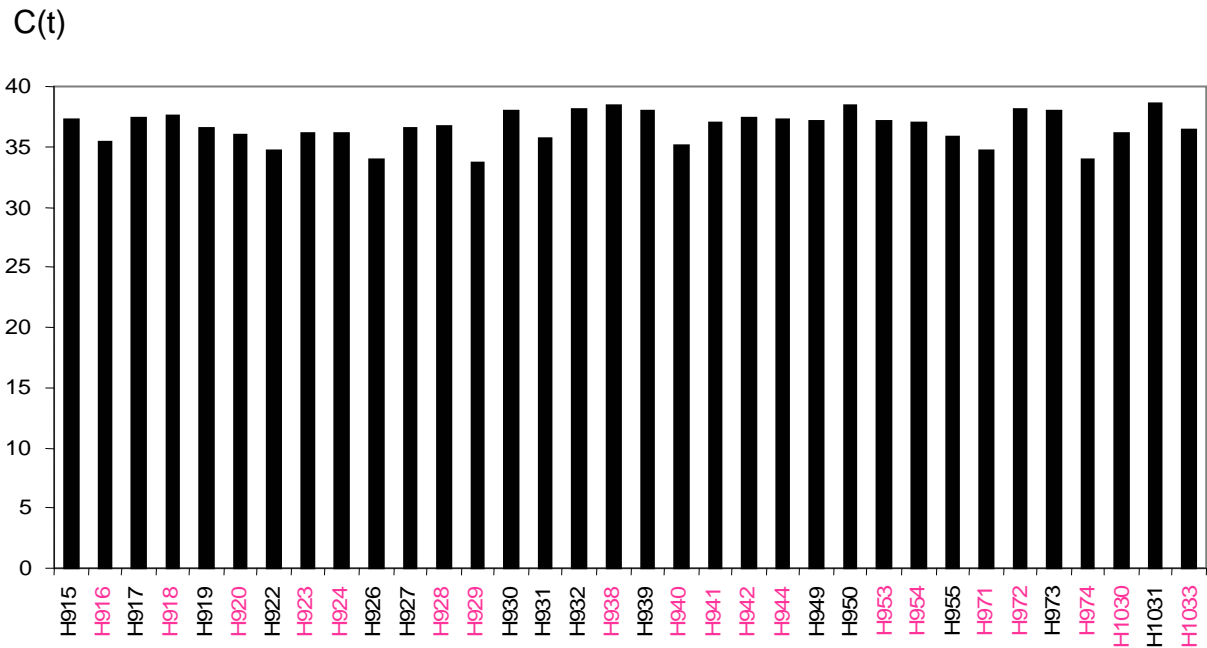


Abbildung 6: **IL-2-RG-Expressionsraten der HUVEC.** Auf der X-Achse sind die 34 Proben abgebildet. Die Y-Achse zeigt die Zykluszahl C(t).

Da sowohl der männliche als auch der weibliche Chromosomensatz mindestens ein X-Chromosom aufweisen, zeigten alle 34 HUVEC eine deutliche Expressionsrate. Als Grund für ein ausbleibendes Signal für SYR bei den weiblichen HUVEC kann daher eine Schädigung der RNA ausgeschlossen werden. Die 19 RNAs, die kein SRY exprimieren (hier rosa dargestellt) können deshalb weiblichen Individuen zugeordnet werden.

### 3.2 Auswahl der zu untersuchenden Gene

Aus der Literatur sind bereits einige Gene beschrieben, die sowohl in Zusammenhang mit der Entstehung von Arteriosklerose gebracht werden konnten, als auch Geschlechtsunterschiede in vitro oder in vivo gezeigt hatten. Deren Primer wurde zu Beginn des Projekts mittels RT-PCR geprüft, wobei einige der ausgewählten Gene nicht die nötigen Voraussetzungen für unsere Studie zeigten. Sie waren in den Endothelzellen der Nabelschnurvene nur sehr gering exprimiert.

### 3.3 Expressionsunterschiede zwischen männlichen und weiblichen HUVEC

Die folgenden Untersuchungen wurden alle mit einer Anzahl von 15 männlichen ( $N_{\text{♂}}=15$ ) und 19 weiblichen ( $N_{\text{♀}}=19$ ) RNAs durchgeführt.

#### 3.3.1 Gene mit Einfluss auf die Vasoreaktivität

##### 3.3.1.1 eNOS und eNOS-Spliceprodukte

Das Molekül Stickstoffmonoxid (NO) spielt eine entscheidende Rolle bei der vaskulären Homöostase und wird vom Enzym endotheliale NO-Synthase (eNOS) synthetisiert. Es ist der stärkste endogene Vasodilatator und weist zudem weitere gefäßprotektive Eigenschaften auf [64].

Anders verhält es sich mit den eNOS-Spliceprodukten 13A-13C, die aufgrund eines Fehlens der Reduktase-Domäne zu einer Verminderung der eNOS-Aktivität führen [65]. Eine erhöhte Expression wirkt sich daher negativ auf die Vasodilatation aus.

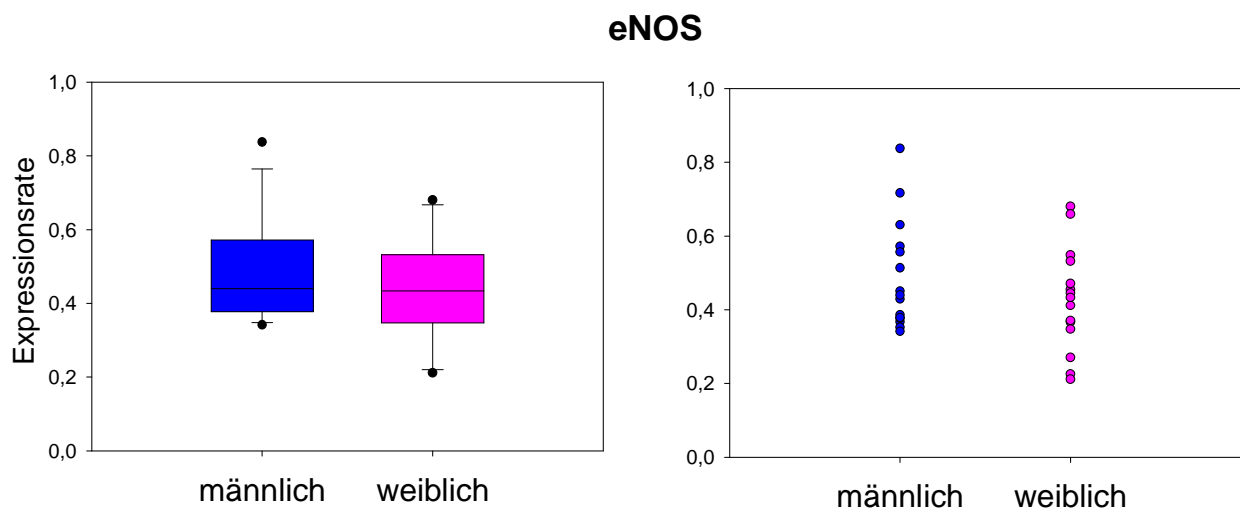


Abbildung 7: **Genexpressionsrate von eNOS bei männlichen und weiblichen HUVEC**

Links wurden die Genexpressionsraten für die männliche (blau) und die weibliche (rosa) RNA als Boxplot aufgetragen. Das Diagramm zeigt Mittelwerte mit Standardabweichungen ( $MW_{\text{♂}} = 0,5 \pm 0,04$ ,  $MW_{\text{♀}} = 0,4 \pm 0,04$ ). Rechts im Scattered Plot, erkennt man eine tendenziell erhöhte eNOS Expression bei den männlichen HUVEC, die allerdings statistisch nicht signifikant ist.

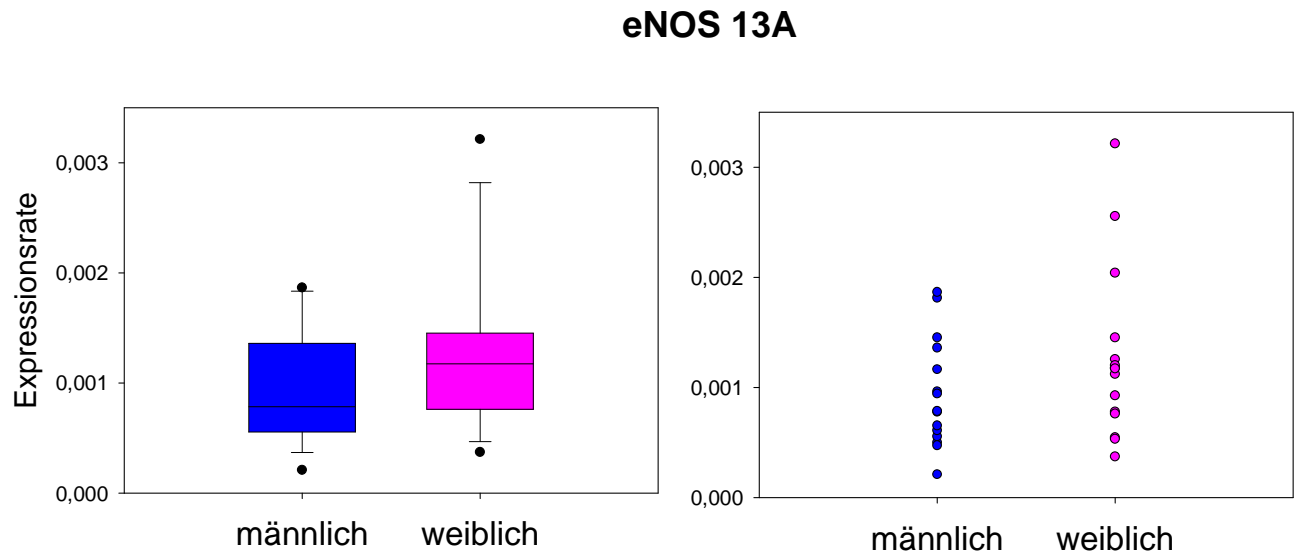


Abbildung 8: **Genexpressionsrate des Spliceprodukts eNOS13A bei männlichen und weiblichen HUVEC**

Im Scattered Plot, welcher sich vor allem zur Darstellung der Einzelwerte eignet, erkennt man einige Ausreißer auf der weiblichen Seite (rosa). Insgesamt zeigt sich der Mittelwert ( $MW_{\text{♂}} = 0,0009 \pm 0,00013$ ,  $MW_{\text{♀}} = 0,0013 \pm 0,0002$ ) der weiblichen Expressionsrate für eNOS13A im Boxplot (links) gegenüber den männlichen HUVEC erhöht. Es besteht jedoch keine statistische Signifikanz.

## eNOS 13B

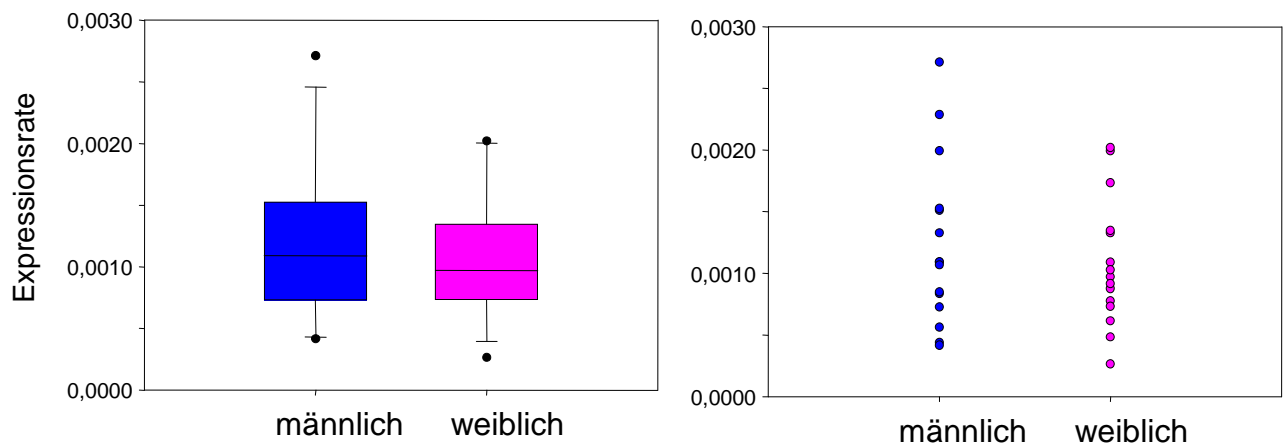


Abbildung 9: **Genexpressionsrate des Spliceprodukts eNOS13B bei männlichen und weiblichen HUVEC**

Im Gegensatz zum Spliceprodukt 13A lassen sich hier sowohl im Boxplot, als auch im Scattered Plot eine leicht erhöhte Genexpressionsrate der männlichen HUVEC erkennen. Das linke Diagramm zeigt Mittelwerte mit Standardabweichungen ( $MW_{\delta} = 0,0012 \pm 0,0002$ ,  $MW_{\text{♀}} = 0,0010 \pm 0,0001$ ). Es besteht jedoch keine statistische Signifikanz.

## eNOS 13C

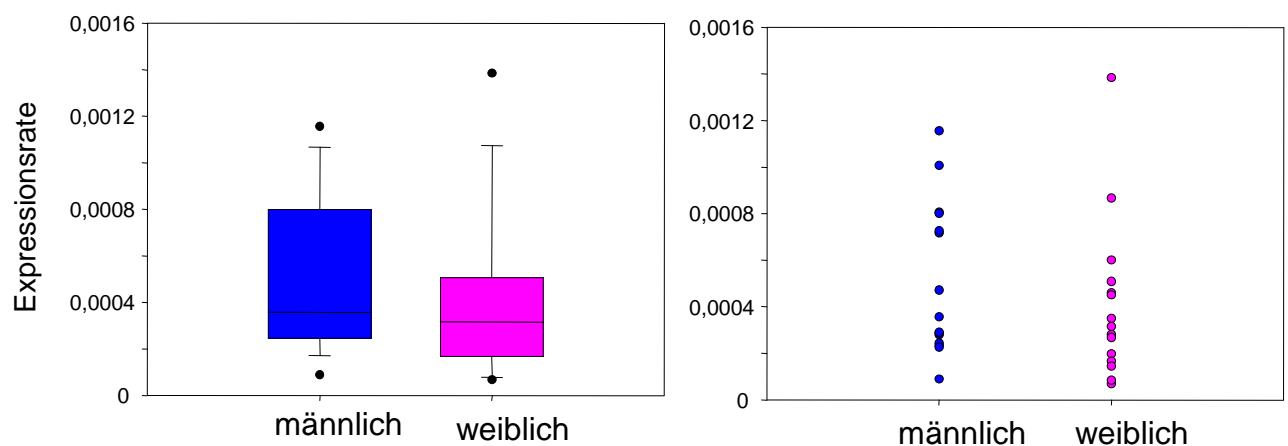


Abbildung 10: **Genexpressionsrate des Spliceprodukts eNOS13C bei männlichen und weiblichen HUVEC**

Sowohl im Boxplot, als auch im Scattered Plot sind keine Unterschiede in den Genexpressionsraten von männlichen und weiblichen Nabelschnurzellen zu erkennen. Das Diagramm zeigt Mittelwerte ( $MW_{\delta} = 0,0005 \pm 0,00008$ ,  $MW_{\text{♀}} = 0,0004 \pm 0,00009$ ).



### 3.3.1.2 Caveolin-1

Caveolae sind omega-förmige, kleine Einbuchtungen der Plasmamembran mit einem Durchmesser von 50-100 nm. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Modulation von Signaltransduktionswegen und bei der Aufrechterhaltung der Homöostase von Cholesterin [66]. Aufgrund des inhibitorischen Einflusses von Caveolin-1 auf die endotheliale NO-Synthase (eNOS) wird das Gen eng mit der endothelialen Dysfunktion in Zusammenhang gebracht und soll an der Entstehung von Arteriosklerose, kardialer Hypertrophie und Kardiomyopathien beteiligt sein [67].

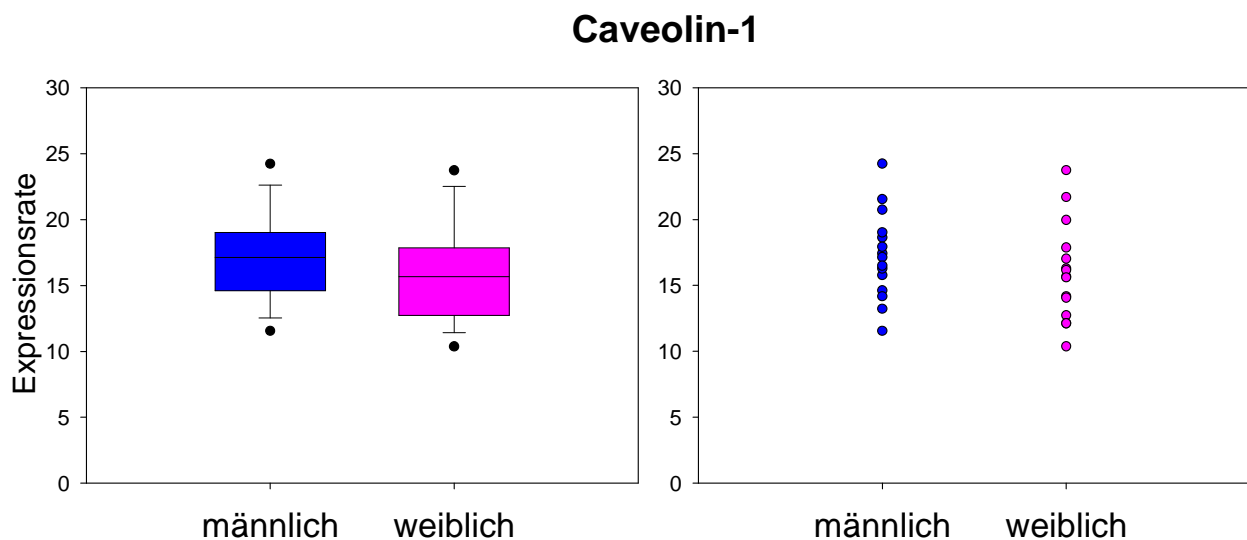


Abbildung 11: **Genexpressionsrate von Caveolin bei männlichen und weiblichen HUVEC**

Boxplot (links) und Scattered Plot (rechts) zeigen annähernd gleiche Genexpressionsraten von Caveolin-1 für männliche und weibliche Nabelschnurzellen. Der Mittelwert liegt bei  $17,25 \pm 0,86$  für die männlichen und bei  $15,97 \pm 0,96$  für die weiblichen HUVEC. Die Genexpressionsraten für Caveolin-1 zeigen keinen signifikanten Unterschied.

### 3.3.1.3 Endothelin-1

Die Familie der Endotheline sind potente endogene Vasokonstriktoren und spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Gefäßtonus [68]. Die vaskulären Effekte werden über zwei verschiedene Rezeptoren vermittelt. Einerseits über den  $ET_A$ -Rezeptor, der sich ausschließlich auf glatten Muskelzellen befindet, andererseits über den  $ET_B$ -Rezeptor, der zusätzlich auf Endothelzellen zu finden ist [69]. Bei den glatten Muskelzellen kommt es rezeptorvermittelt zu einer Kontraktion, während die Aktivierung von  $ET_B$ -Rezeptoren auf den Endothelzellen zu einer Stimulation von eNOS und nachfolgender Vasorelaxation führt [70]. Weiterhin wird ein erhöhter Endothelin-1 Spiegel mit der Entstehung von Arteriosklerose in Verbindung gebracht. Mögliche Mechanismen dafür sind unter anderem eine verstärkte Thrombozytenaggregation, eine Erhöhung des Wachstums und der Proliferation glatter Muskelzellen und die Stimulation proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und  $TNF-\alpha$  durch Endothelin-1 [71].

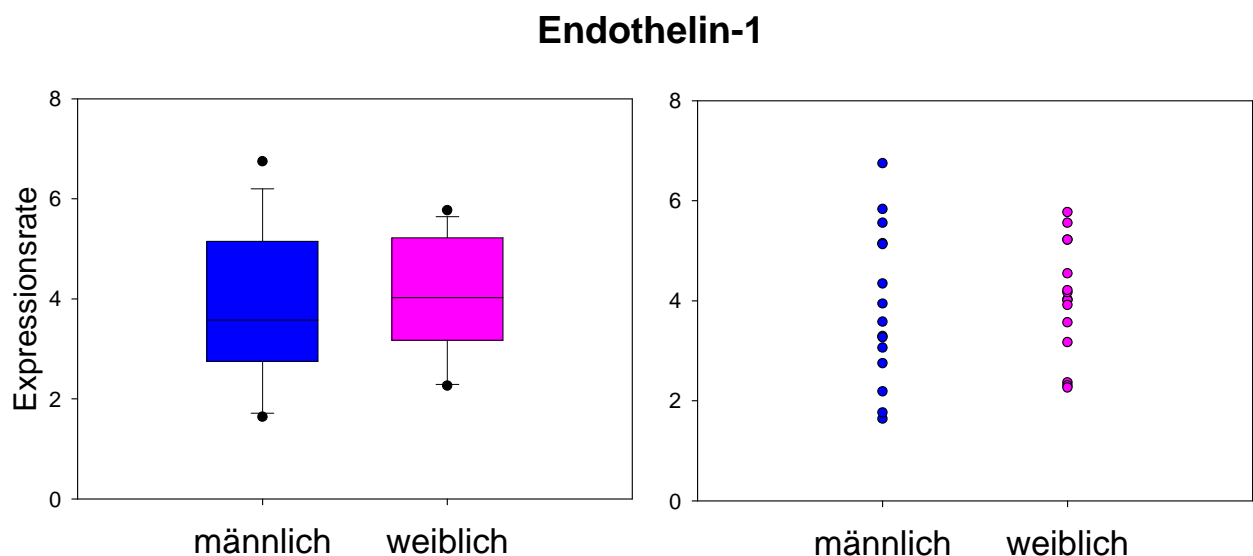


Abbildung 12: **Genexpressionrate von Endothelin-1 bei männlichen und weiblichen HUVEC**

Im Scattered Plot (rechte Seite) zeigen die männlichen Expressionsraten (blau) eine stärkere Streuung um den Mittelwert  $MW_{\delta} = 3,88 \pm 0,4$ . Dieser ist gegenüber dem weiblichen Mittelwert  $MW_{\text{♀}} = 4,02 \pm 0,3$  nur minimal erniedrigt. Es besteht kein signifikanter Unterschied in den Genexpressionsraten zwischen den männlichen und weiblichen Proben.

### 3.3.1.4 ACE

Das angiotensinkonvertierende Enzym (ACE) wandelt Angiotensin I in Angiotensin II um, welches stark vasokonstriktorisch wirkt. Des Weiteren inaktiviert ACE das vasodilatatorische Gefäßhormon Bradykinin. Diese Mechanismen dienen im Zusammenspiel mit dem Renin-Angiotensin-Aldosteron System (RAAS) der Blutdruckkontrolle und der Regulierung des Wasser-Elektrolythaushalts.

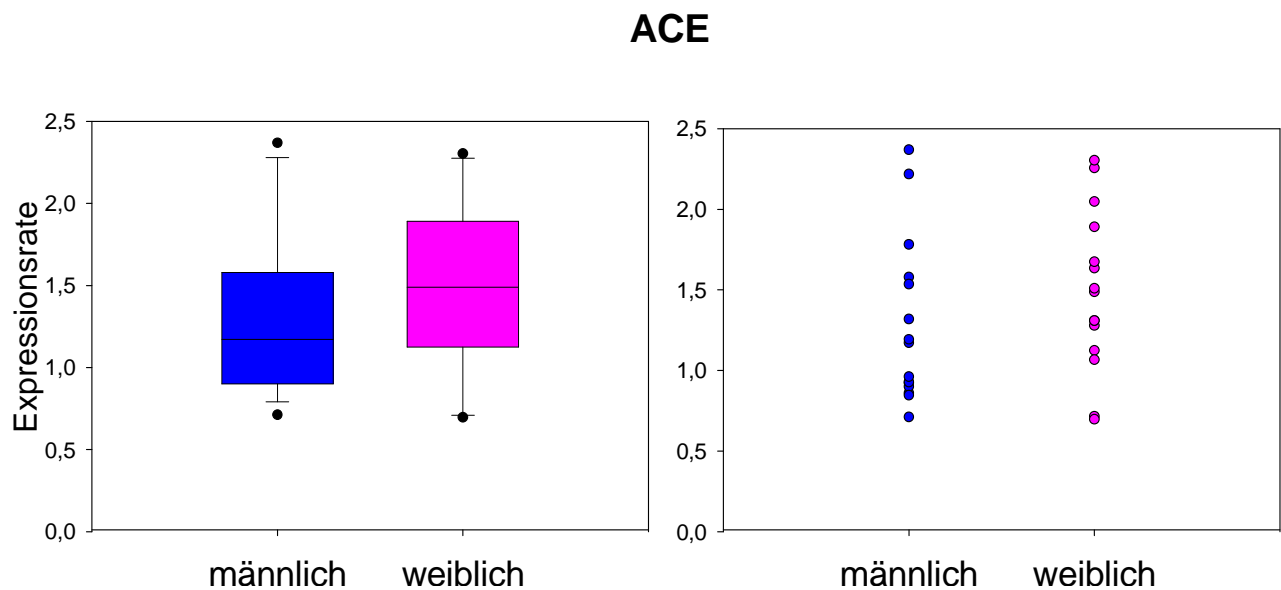


Abbildung 13: **Genexpressionsrate von ACE bei männlichen und weiblichen HUVEC**

In der linken Darstellung erkennt man einen erhöhten Mittelwert für die weiblichen Genexpressionsraten (rosa) gegenüber den männlichen (blau). Ersterer liegt bei  $1,49 \pm 0,13$ , letzterer bei  $1,29 \pm 0,13$ . Dieser Unterschied ist jedoch nicht statistisch signifikant.

### 3.3.2 Gene mit Einfluss auf den oxidativen Status

#### SOD

Die Familie der endothelialen Superoxiddismutasen besteht aus drei Isoformen: die zytosolische Cu/Zn-Superoxiddismutase (SOD-1), die magnesiumhaltige Superoxiddismutase (SOD-2) und die extrazelluläre Cu/Zn-Superoxiddismutase (SOD-3). Sie zählen zu den antioxidativen Enzymen der Mitochondrien und katalysieren den Abbau von Superoxid ( $O_2^-$ ) zu Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) [72]. Dadurch schützen sie die Zelle vor reaktiven Sauerstoffverbindungen. Diese werden mit einem vorzeitigen Alterungsprozess der Zelle in Verbindung gebracht.

#### 3.3.2.1 SOD-1

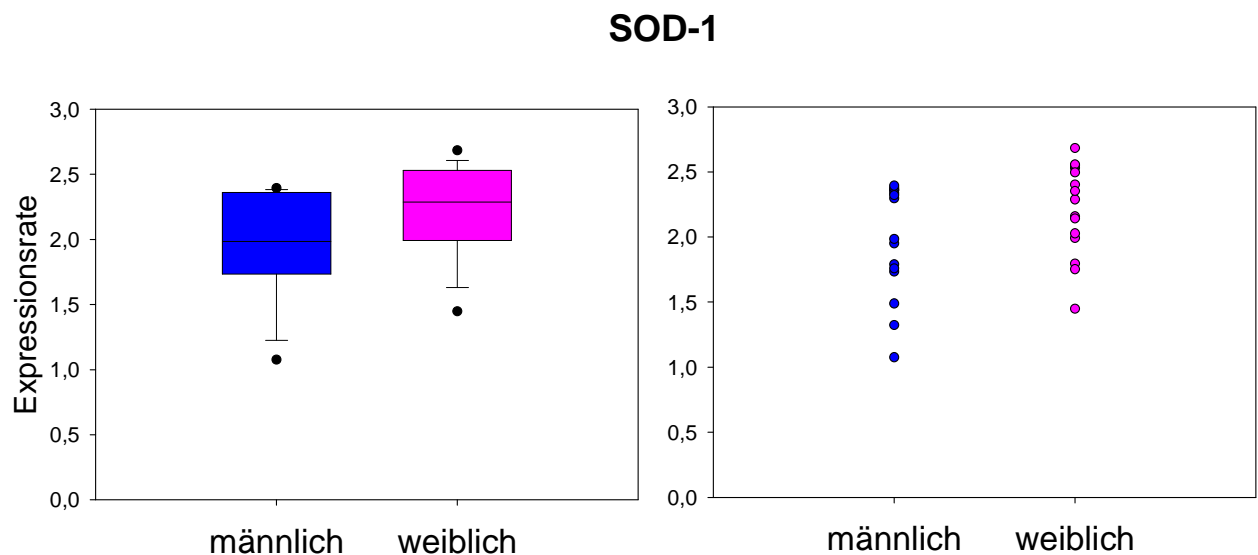


Abbildung 14: **Genexpressionsrate von SOD-1 bei männlichen und weiblichen HUVEC**

Sowohl in der Darstellung als Boxplot (links), wie auch als Scattered Plot (rechts) ist eine leicht erhöhte Expressionsrate für SOD-1 der weiblichen Nabelschnurzellen zu erkennen. Dies wird auch bei den Mittelwerten deutlich:  $MW_{\text{♂}} = 1,97 \pm 0,11$ ,  $MW_{\text{♀}} = 2,21 \pm 0,09$ . Es besteht jedoch keine statistische Signifikanz für diesen Unterschied.

## 3.3.2.2 SOD-2

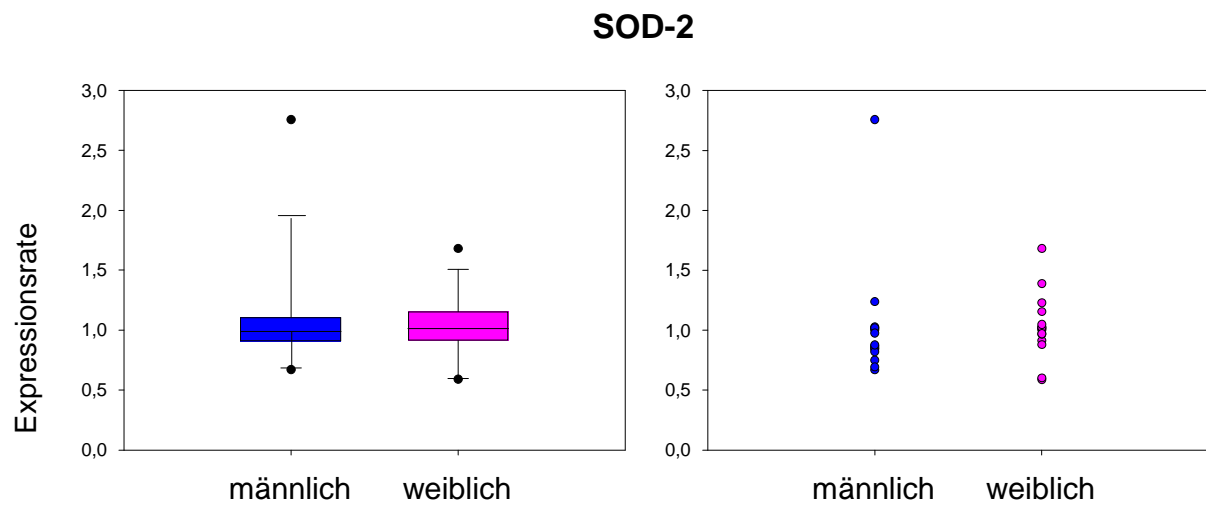


Abbildung 16: **Genexpressionrate von SOD-2 bei männlichen und weiblichen HUVEC**

Trotz des Ausreißers in der männlichen Genexpressionsrate (blau), liegen die Mittelwerte für die männliche und weibliche Expression von SOD-2 mit  $1,0 \pm 0,1$  auf gleicher Höhe.

### 3.3.2.3 Catalase

Catalase ist ebenfalls ein antioxidatives, intrazelluläres Enzym, welches sich überwiegend in den Peroxisomen befindet. Es katalysiert die Reaktion von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) zu Wasser und Sauerstoff und spielt eine wichtige Rolle bei der Anpassung der Zelle an oxidativen Stress.

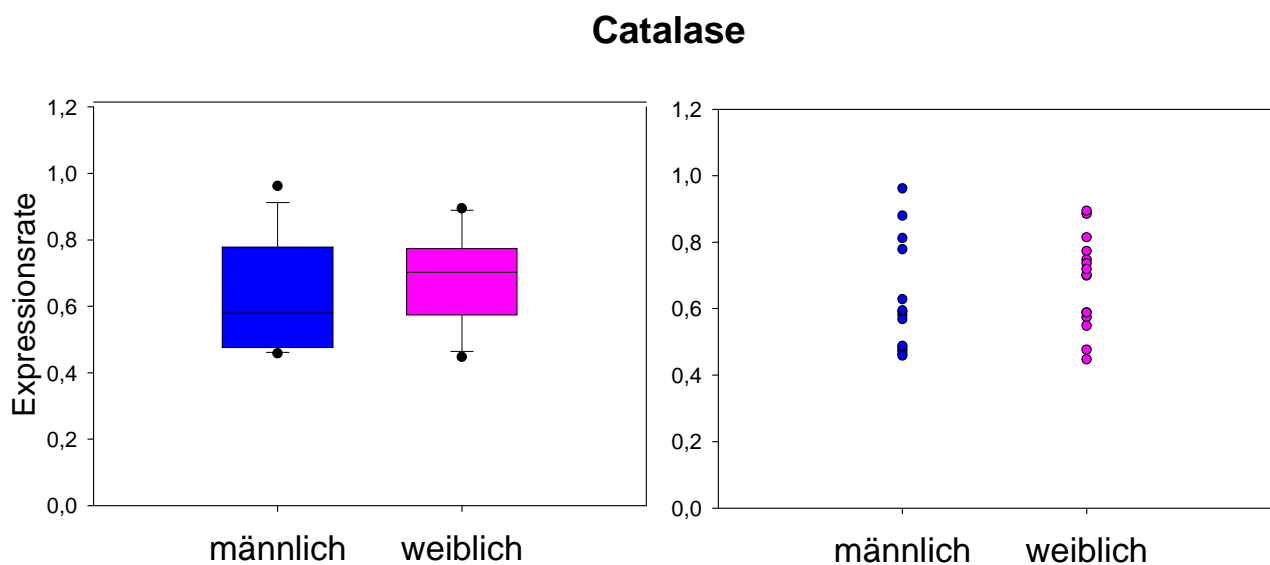


Abbildung 17: **Genexpressionsrate von Catalase bei männlichen und weiblichen HUVEC**

Links die Darstellung als Boxplot, rechts als Scattered Plot: männliche (blau) und weibliche (rosa) Expressionsraten für Catalase zeigen keinen Unterschied. Die Untersuchung erfolgte mit 15 männlichen und 19 weiblichen Proben. Die Darstellung zeigt Mittelwerte mit Standardabweichungen ( $MW_{\text{♂}} = 0,62 \pm 0,04$ ,  $MW_{\text{♀}} = 0,68 \pm 0,03$ ).

### 3.3.2.4 HMOX-1

Beim Menschen sind zwei Isoformen der Hämoxigenase bekannt. Die induzierbare Isoform Hämoxigenase-1 (HO-1) und die konstitutive Isoform Hämoxigenase-2 (HO-2). Sie katalysieren die Reaktion von Häm zu Biliverdin und setzen dabei Eisen und Kohlenstoffmonoxid (CO) frei. Im Zusammenspiel mit CO ist das Enzym an zahlreichen Signaltransduktionswegen beteiligt, mit antioxidativer sowie antiinflammatorischer Wirkung [73].

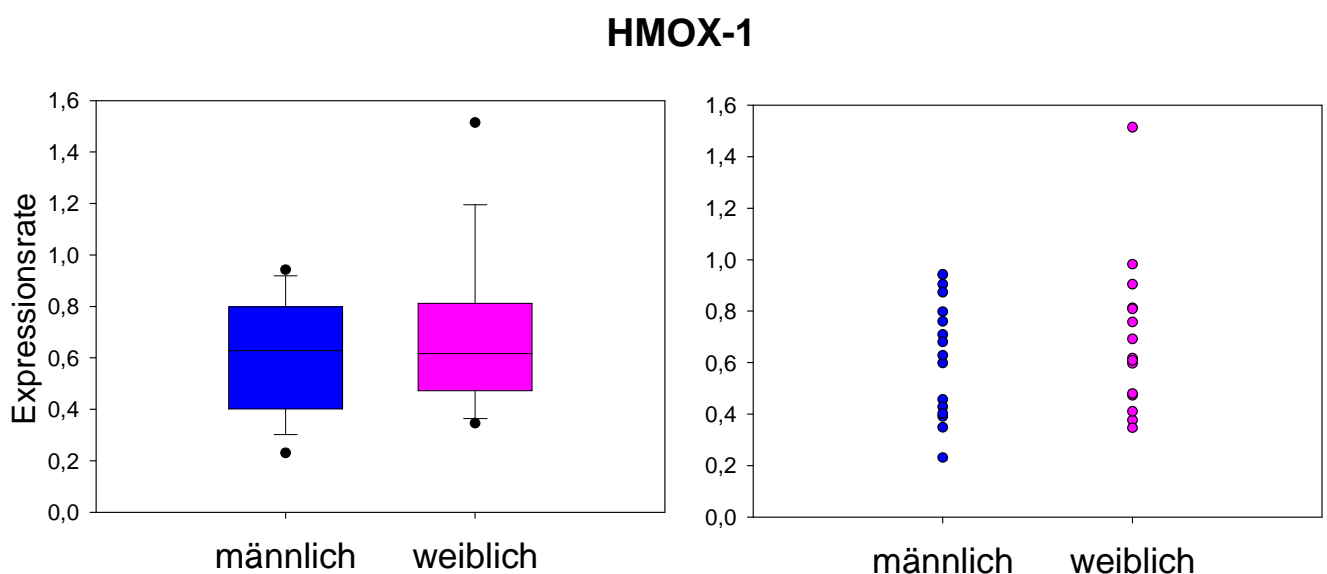


Abbildung 18: **Genexpressionsrate von HMOX-1 bei männlichen und weiblichen HUVEC**

In der Darstellung der Expressionsraten in Form eines Scattered Plot (rechts) erkennt man eine breitere Streuung der weiblichen Proben sowie einen Ausreißer (rosa). Links im Boxplot wird deutlich, dass die Mittelwerte nur einen minimalen Unterschied aufweisen ( $MW_{\delta} = 0,61 \pm 0,06$ ,  $MW_{\text{♀}} = 0,69 \pm 0,08$ ). Es besteht kein signifikanter Unterschied in den Genexpressionsmustern zwischen männlichen und weiblichen HUVEC.

### 3.3.2.5 GPX-3

Die Glutathionperoxidase zählt zu den mitochondrialen, antioxidativen Enzymen, im katalytischen Zentrum enthält sie L-Selenocystein. Das Enzym reduziert Wasserstoff- und Lipidperoxide zu Wasser und Lipid-Alkoholen. Bei dieser Reaktion wird Glutathion (GSH) zu Glutathiondisulfid (GSSG) oxidiert [74].

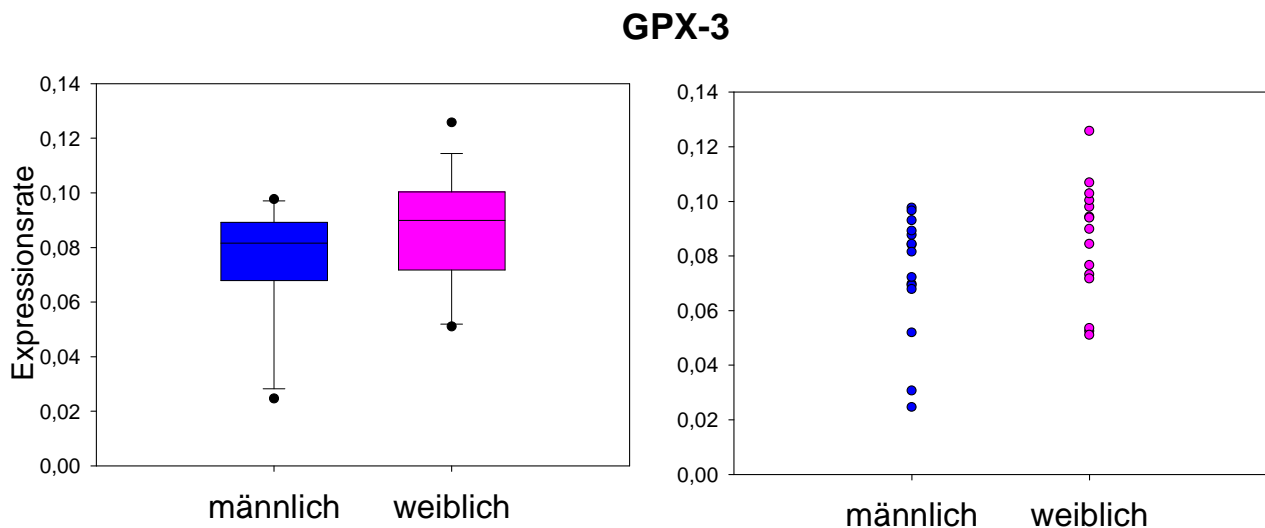


Abbildung 19: **Genexpressionsrate von GPX-3 bei männlichen und weiblichen HUVEC**

In der Einzeldarstellung der Ergebnisse im Scattered Plot (rechts) scheinen die weiblichen HUVEC (rosa) tendenziell eine leicht erhöhte, die männlichen HUVEC (blau) eine leicht verminderte Expressionsrate aufzuweisen. Die Mittelwerte im Boxplot (links) liegen bei  $MW_{\text{♂}} = 0,07 \pm 0,006$  und  $MW_{\text{♀}} = 0,09 \pm 0,006$ . Es besteht keine statistische Signifikanz für diesen Unterschied. Die Daten enthalten 15 männliche und 19 weibliche HUVEC.



### 3.3.2.6 NOX-4

Das NOX-4-Gen kodiert für das Enzym NAD(P)H-Oxidase 4. Letzteres katalysiert die Reaktion von Sauerstoff zu Superoxid ( $O_2^-$ ), welches der Abwehr von Bakterien durch Phagozyten dient. Weiterhin sind die entstehenden Sauerstoffradikale („reactive oxygen species“ = ROS) an zahlreichen Zellvorgängen wie Zellwachstum, Migration und Entzündung beteiligt [75, 76]. Die pathophysiologischen Stimuli, welche an der Regulation der Enzymaktivität von NOX-4 beteiligt sind, stehen in engem Zusammenhang mit der Entstehung von Arteriosklerose [77].

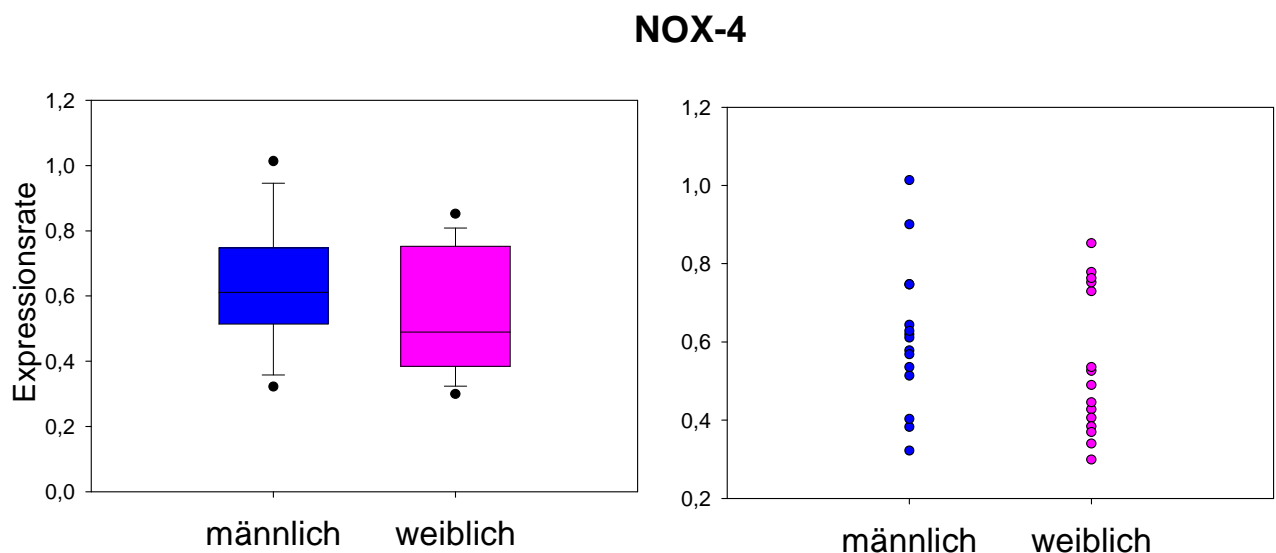


Abbildung 20: **Genexpressionsrate von NOX-4 bei männlichen und weiblichen HUVEC**

Der Scattered Plot (rechts) zeigt für die Einzelauswertung der männlichen Expressionsraten (blau) tendenziell erhöhte Werte gegenüber den weiblichen Expressionsraten (rosa). Insgesamt ist der Mittelwert mit  $MW_{\text{♂}} = 0,61 \pm 0,05$  gegenüber dem weiblichen  $MW_{\text{♀}} = 0,54 \pm 0,05$  nur gering verändert, so dass sich dieser Unterschied nicht als statistisch signifikant erweist. Es wurden 15 männliche und 19 weibliche HUVEC verwendet.

### 3.3.2.7 P52+66<sup>shc</sup>

Das src-homology (Shc) Protein A spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation verschiedener Signaltransduktionswege. Durch alternatives Splicing entstehen drei verschiedene Proteine mit 46, 52 und 66 kDa. Der hier untersuchte Genabschnitt umfasst die Splicing-Varianten p52<sup>shc</sup> und p66<sup>shc</sup>. Die kardiovaskuläre Relevanz von p52+66<sup>shc</sup> ist bisher nicht eindeutig geklärt. In tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass Mutationen des Gens p66<sup>shc</sup> zu einer verlängerten Lebensspanne, einer verminderten Produktion von Sauerstoffradikalen sowie zu einer erhöhten Widerstandsfähigkeit der Zelle gegenüber Apoptose durch oxidativen Stress führte [78].

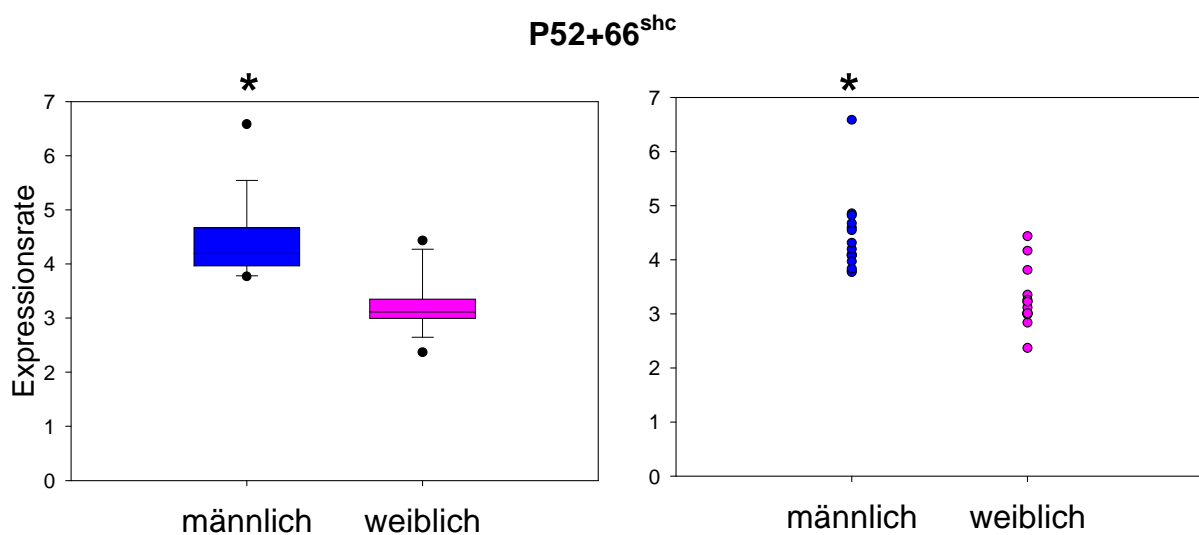


Abbildung 21: **Genexpressionsrate von p52+66<sup>shc</sup> bei männlichen und weiblichen HUVEC**

Sowohl im Boxplot (links), als auch im Scattered Plot (rechts) erkennt man eine deutlich erhöhte Genexpressionsrate für p52+66<sup>shc</sup> der männlichen HUVEC (blau) gegenüber den weiblichen (rosa). Der gemessene Unterschied ist mit  $P \leq 0,001$  statistisch signifikant. Die Durchführung erfolgte mit 15 männlichen und 19 weiblichen cDNA-Proben. Die Darstellung als Boxplot zeigt Mittelwerte mit Standardabweichungen ( $MW_{\sigma} = 4,41 \pm 0,18$ ,  $MW_{\varphi} = 3,25 \pm 0,14$ ).

### 3.3.2.8 p66<sup>shc</sup>

Versuchstiere, bei denen das Gen p66<sup>shc</sup> ausgeschaltet wurde, zeigten eine erhöhte Widerstandsfähigkeit der Zelle gegenüber oxidativem Stress sowie eine verlängerte Lebensspanne [79].

P66<sup>shc</sup> dient als Vermittler der Apoptose auf verschiedene Stressfaktoren. Nach Stimulation durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder UV-Strahlung erfolgt die Aktivierung von p66<sup>shc</sup>. Dies führt zu einem Anstieg der intrazellulären Sauerstoffradikale (ROS). Der oxidative Stress bedingt ein vorzeitiges Altern der Zelle sowie den programmierten Zelltod [80].

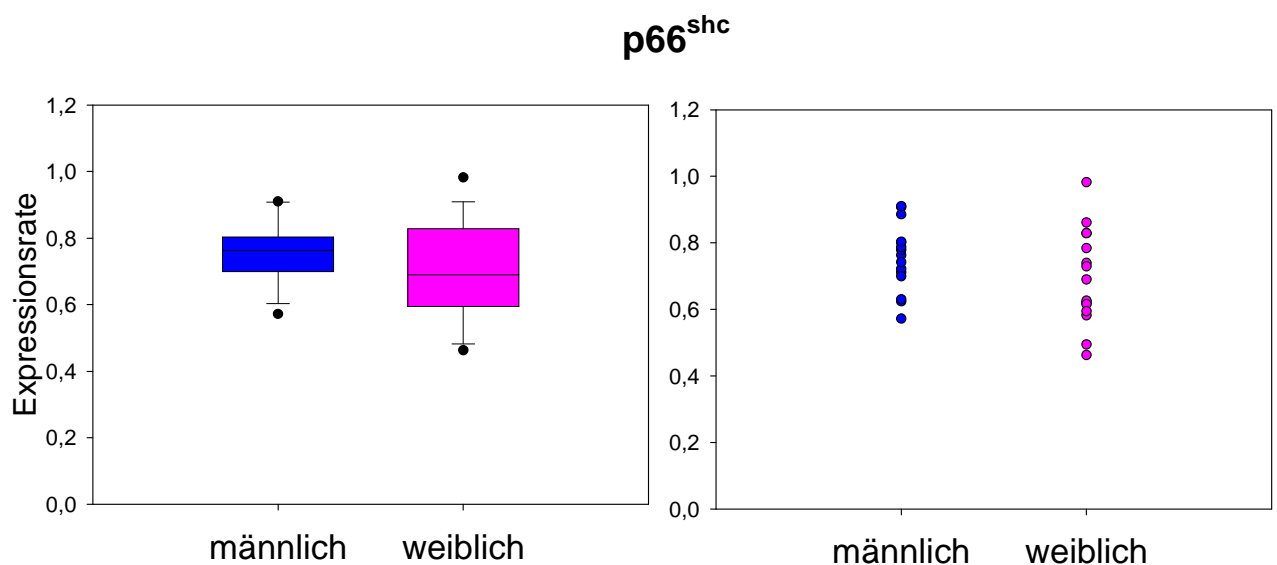


Abbildung 21: **Genexpressionsrate von p66<sup>shc</sup> bei männlichen und weiblichen HUVEC**

In der Darstellung als Scattered Plot (rechts) erkennt man eine breitere Streuung der weiblichen Einzelwerte (rosa) in beide Richtungen. Daraus resultiert insgesamt ein leicht verminderter Mittelwert  $MW_{\text{♀}} = 0,70 \pm 0,04$ . Der männliche liegt bei  $MW_{\text{♂}} = 0,76 \pm 0,03$ . Es besteht keine statistische Signifikanz für diesen Unterschied. Die Durchführung erfolgte mit 15 männlichen und 19 weiblichen Proben.

### 3.3.3 Gene mit Einfluss auf die zelluläre Stressantwort

#### 3.3.3.1 Hsp70

Hitzeschockproteine (Hsp) kommen ubiquitär in allen eukaryotischen Zellen vor und dienen der Stabilisierung von Proteinen bei zellulärem Stress [81]. Als molekulare Chaperone sind sie für die korrekte Faltung und Aktivierung sowie den Erhalt der Sekundärstruktur vieler Proteine verantwortlich. Die Überexpression von Hsp führt zu einer Inhibierung der Apoptose kardialer Zellen durch Ischämie und damit zu einer Begrenzung des Infarktgeschehens [82].

#### Hsp70

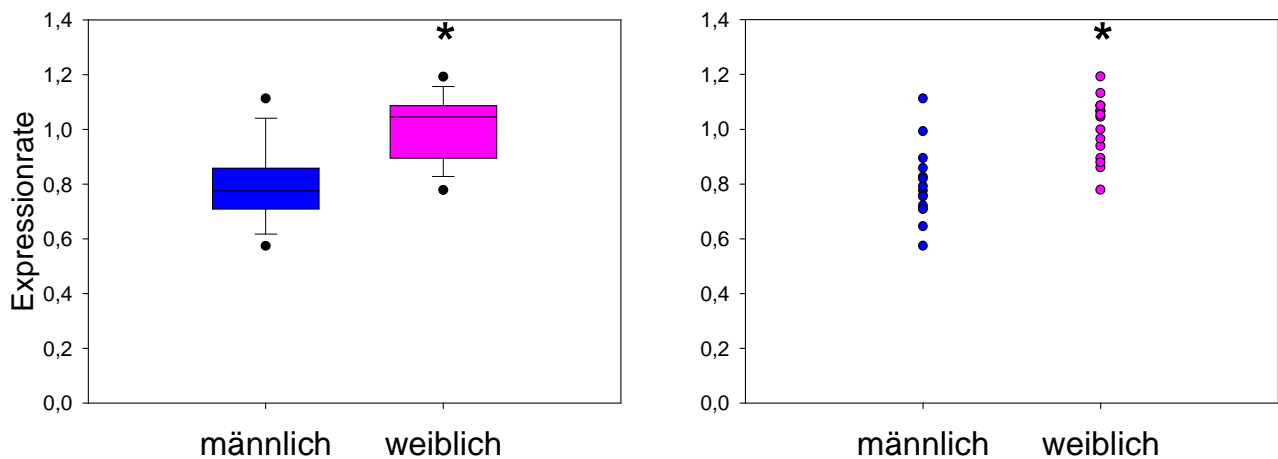


Abbildung 23: **Genexpressionsrate von Hsp70 bei männlichen und weiblichen HUVEC**

Sowohl im Boxplot (links), als auch im Scattered Plot (rechts) ist eine deutlich erhöhte Genexpressionsrate für Hsp70 der weiblichen HUVEC (rosa) gegenüber den männlichen (blau) zu sehen. Die Mittelwerte (MW) liegen bei:  $MW_{\delta} = 0,80 \pm 0,03$  und  $MW_{\text{♀}} = 1,00 \pm 0,03$ . Der gemessene Unterschied ist mit  $P \leq 0,001$  statistisch signifikant. Die Durchführung erfolgte mit 15 männlichen und 19 weiblichen RNAs.

### 3.3.3.2 Hsp90

Zusätzlich zu dem oben beschriebenen Zusammenspiel zwischen den Hitzeschockproteinen, wirkt sich Hsp90 auf das Gefäßsystem aus und führt im Zusammenspiel mit eNOS zur Vasorelaxation [83].

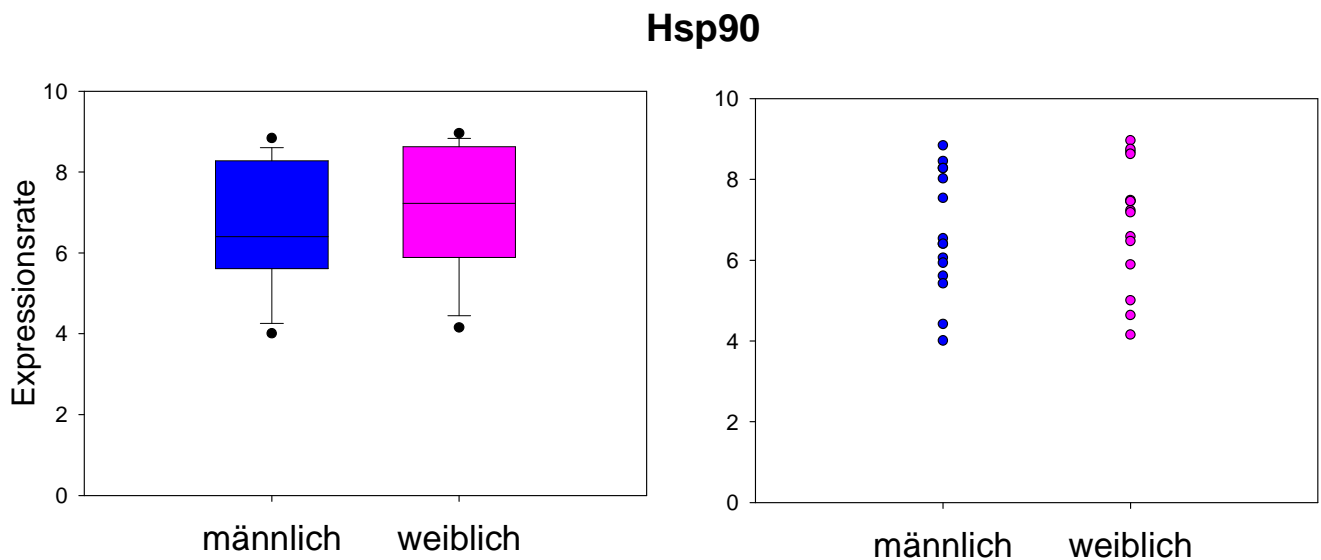


Abbildung 24: **Genexpressionsrate von Hsp90 bei männlichen und weiblichen HUVEC**

Links die Darstellung als Boxplot, rechts als Scattered Plot: männliche (blau) und weibliche (rosa) Expressionsraten für Hsp90 zeigen keinen Unterschied. Die Untersuchung erfolgte mit 15 männlichen und 19 weiblichen HUVEC. Die Darstellung zeigt Mittelwerte mit Standardabweichungen ( $MW_{\text{♂}} = 6,7 \pm 0,4$ ,  $MW_{\text{♀}} = 7,0 \pm 0,4$ ).

### 3.3.3.3 ICAM-1

Das intrazelluläre Adhäsionsmolekül (ICAM-1) spielt eine wichtige Rolle bei verschiedenen immunologischen Vorgängen. Dazu gehören besonders die Emigration von Leukozyten aus Blutgefäßen sowie die Aktivierung von T-Lymphozyten. In diesem Zusammenhang spielt ICAM-1 auch eine Rolle bei vaskulären Entzündungsprozessen und der Entstehung arteriosklerotischer Plaques [84].

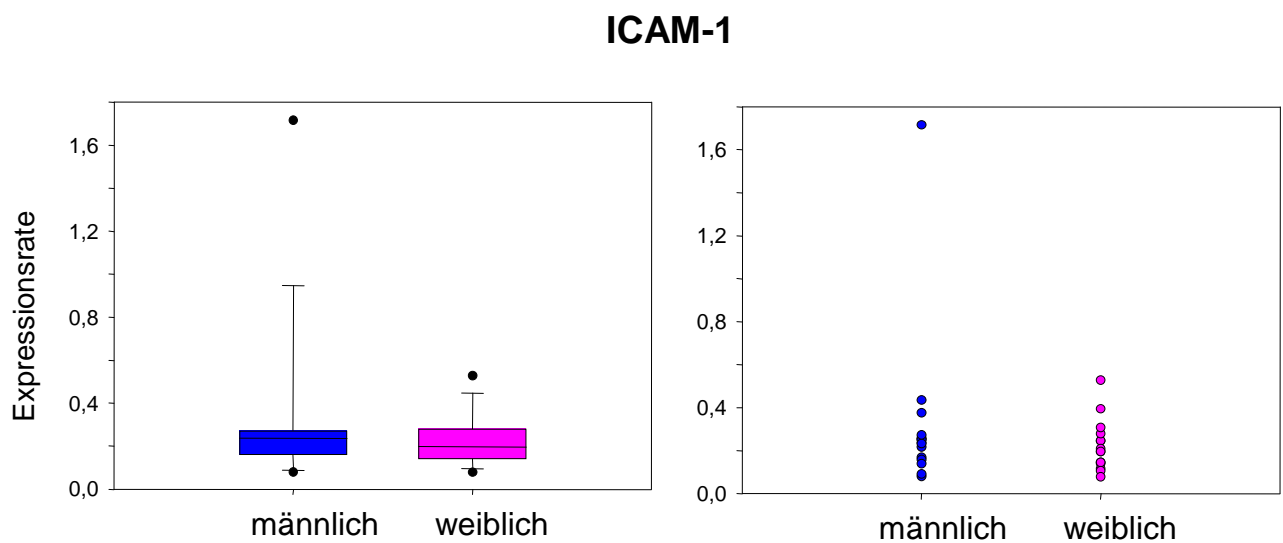


Abbildung 25: **Genexpressionsrate von ICAM-1 bei männlichen und weiblichen HUVEC**  
 Bei Betrachtung der Einzelauswertung von ICAM-1 im Scattered Plot (rechts), zeigen die männlichen HUVEC (blau) einen deutlichen Ausreißer. Dies beeinflusst auch den Mittelwert:  $MW_{\delta} = 0,33 \pm 0,10$ . Bei den weiblichen HUVEC beträgt der Mittelwert  $MW_{\text{♀}} = 0,21 \pm 0,03$ . Es besteht keine statistische Signifikanz für diesen Unterschied. Die Messung erfolgte an 15 männlichen und 19 weiblichen HUVEC.

### **3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Realtime-RT-PCR**

Zusammenfassend ließen sich mittels Real-time-PCR nur signifikante Unterschiede der Genexpressionsraten zwischen männlichen und weiblichen HUVEC in den Genen p52+66<sup>shc</sup> und Hsp70 feststellen. Die Messung der Genexpressionsraten mittels Realtime-RT-PCR war jedoch aufwändig und kostenintensiv. Deshalb entschieden wir uns ein „Whole Genome Array“ durchzuführen. Dazu wurde die RNA von insgesamt 25 männlichen und 29 weiblichen HUVEC isoliert. Die bereits in der Real-time-PCR verwendeten RNA-Proben waren darin enthalten, um die bisher gewonnenen Ergebnisse durch den Array zu überprüfen.

### 3.5 Whole Genome Array

Zunächst erfolgte eine Qualitätskontrolle der insgesamt 54 RNA-Proben, bei der für die männlichen HUVEC drei, für die weiblichen HUVEC vier RNAs als qualitativ unzureichend eingestuft wurden.

#### 3.5.1 Qualitätskontrolle und Zusammenstellung der Gen-Poole

Mittels Agarose-Gelelektrophorese werden die Nukleinsäurestränge nach ihrer Größe aufgetrennt. In der Abbildung 26 ist links ein RNA-Marker bekannter Größe in Basenpaare (bp) dargestellt. Daran schließt sich eine Auswahl von sieben der insgesamt 25 männlichen RNAs an, die als M43-M49 bezeichnet wurden.

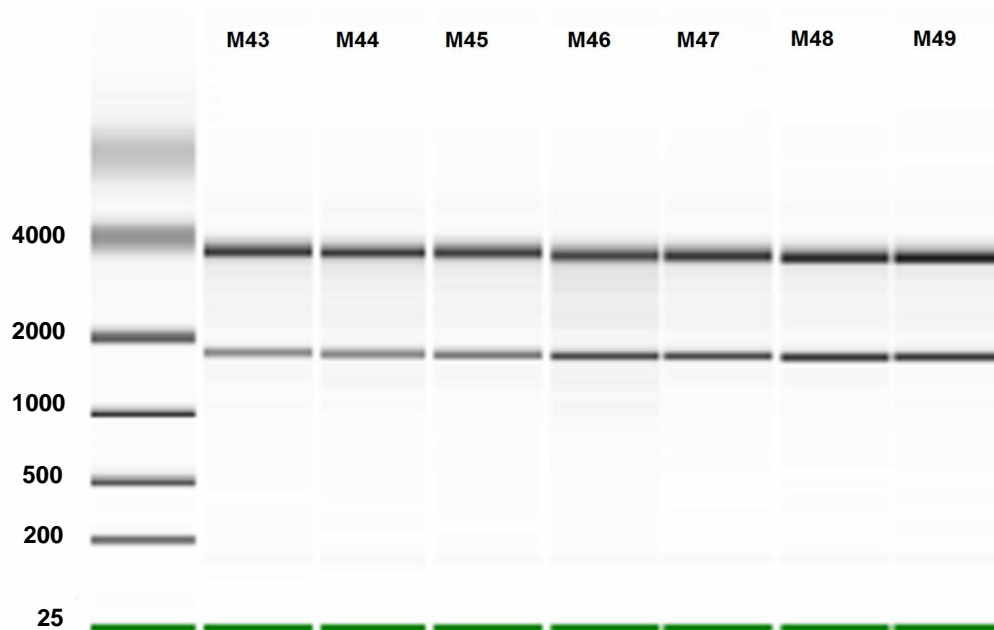


Abbildung 26: **Bestimmung der RNA-Qualität der männlichen HUVEC für die Proben M43-M49**

Die sieben Proben M43-M49 zeigen eine intakte RNA, die für den Array verwendet werden konnten.



Im Folgenden ist eine Auswahl von elf der insgesamt 29 weiblichen RNAs dargestellt, die als F8-F18 bezeichnet wurden:

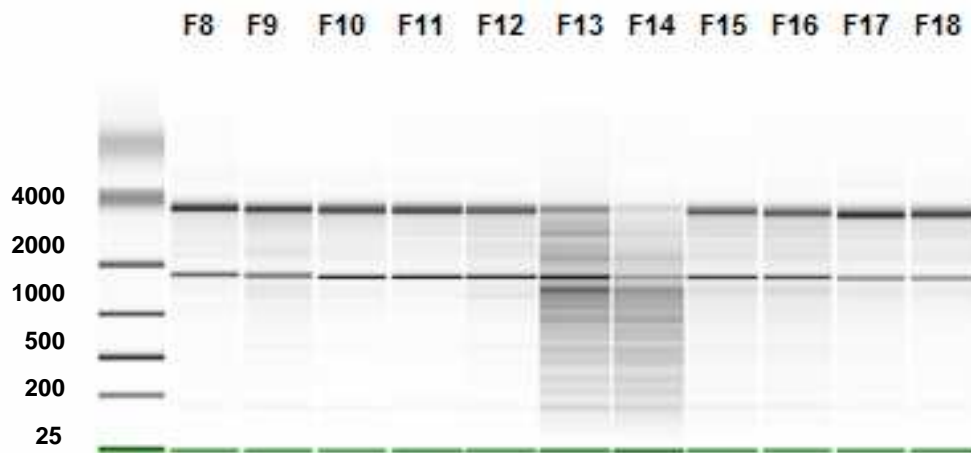


Abbildung 27: **Bestimmung der RNA-Qualität der weiblichen HUVEC für die Proben F8-F18**

Die Proben F8-F12 und F15-F18 zeigen eine intakte RNA, die sich zur Durchführung des Arrays eignet. Im Gegensatz dazu sind die RNA-Proben von F13 und F14 degradiert und gelten daher als qualitativ unzureichend zur Verwendung in einem Expressionsarray.

Um die Gruppen miteinander vergleichen zu können, wurden anschließend fünf Pools zu je vier RNAs jeweils für die männlichen (A6-A10) wie für die weiblichen (A1-A5) HUVEC gebildet. Die weiblichen HUVEC wurden mit F (= female), die männlichen mit M (= male) bezeichnet.

**Tabelle 3: Zusammenstellung der RNA-Poole:**

<b>Pool-Name</b>	<b>Enthaltene HUVEC</b>
A1	F2, F3, F4, F6
A2	F7, F8, F9, F10
A3	F11, F12, F15, F16
A4	F17, F18, F19, F20
A5	F21, F22, F23, F24
A6	M26, M27, M28, M29
A7	M32, M33, M34, M35
A8	M36, M37, M39, M40
A9	M41, M41, M43, M44
A10	M46, M47, M48, M49

### 3.5.2 Expressionsunterschiede

Auf diese Weise konnten die einzelnen männlichen und weiblichen Poole miteinander verglichen werden. Einen Überblick über die Zusammenstellung der Arrays gibt Tabelle 4.

**Tabelle 4: Aufbau der Arrays mit den männlichen und weiblichen RNA-Pools**

Array-Nr.	Männlicher Pool	Weiblicher Pool	Bezeichnung
1	A6	A1	A6-vs.-A1
2	A7	A2	A7-vs.-A2
3	A8	A3	A8-vs.-A3
4	A9	A4	A9-vs.-A4
5	A10	A5	A10-vs.-A5

Die Daten der fünf vergleichenden Einzelarrays (A6-vs.-A1 bis A10-vs.-A5) wurden zu einer Gruppe zusammengefasst und gegen einen fixen Wert getestet. Da es sich um  $\log_2$ -transformierte Ratios handelte, wurden die Daten gegen den Wert „0“ getestet, der in der  $\log_2$ -Skala für „keine differentielle Regulation“ steht und einer Ratio von 1,0 entspricht ( $\log_2 0 = 1$ ). Zusätzlich konnten die

gemessenen Unterschiede zwischen den männlichen und weiblichen Proben mit Hilfe des  $p$ -Werts auf ihre Zuverlässigkeit getestet werden. Daraufhin wurden die Expressionsdaten auf Gene, deren Ratio bei 1,0 lag bzw. deren  $p$ -Wert für die differentielle Expression in mehr als drei von fünf Einzelarrays größer als 0,0001 war, gefiltert. Die so identifizierten differentiell exprimierten Gene wurden in der daran anschließenden *Pathway*-Analyse verwendet. Die angewandten statistischen Verfahren dienten der Identifizierung signifikanter Anreicherungen bestimmter Annotationen im Gen-Set und umfassten nach Filterung 1550 Gene.

Die Expressionsraten galten als differentiell reguliert, wenn sie vom Wert 1, der in der  $\log_2$ -Skala für „keine differentielle Regulation“ stand, abwichen. Dabei bestätigte der Microarray weitgehend die Ergebnisse der Real-Time-PCR. Die Gene ACE, Catalase, Caveolin-1, Endothelin-1, eNOS, GPX-3, Hsp90, ICAM-1, NOX-4, p66<sup>shc</sup>, SOD-1 und SOD-2 zeigten auch im Array keinen signifikanten Unterschied zwischen den Geschlechtern, während Hsp70 analog zum Ergebnis der PCR eine erhöhte Expressionsrate bei den weiblichen HUVEC zeigte.

Abweichend von den Ergebnissen der Real-Time-PCR konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression von p52+66<sup>shc</sup> zwischen männlichen und weiblichen HUVEC gefunden werden. Dieses Gen stellt eine Kombination von Spliceprodukten dar und wird deshalb im Array nicht adäquat erfasst.

Die stärkste differentielle Regulation wurde erwartungsgemäß bei den Genen, welche auf den Gonosomen X und Y lagen, erreicht. Zur Verstärkung der Aussagekraft wurden in den folgenden statistischen Analysen die Gene herausgenommen, welche in mindestens zwei der fünf Einzelarrays eine gegensätzliche Genregulation aufwiesen. In Folge dessen reduzierten sich die überexprimierten Gene auf männlicher Seite auf 300, auf weiblicher Seite auf 544.

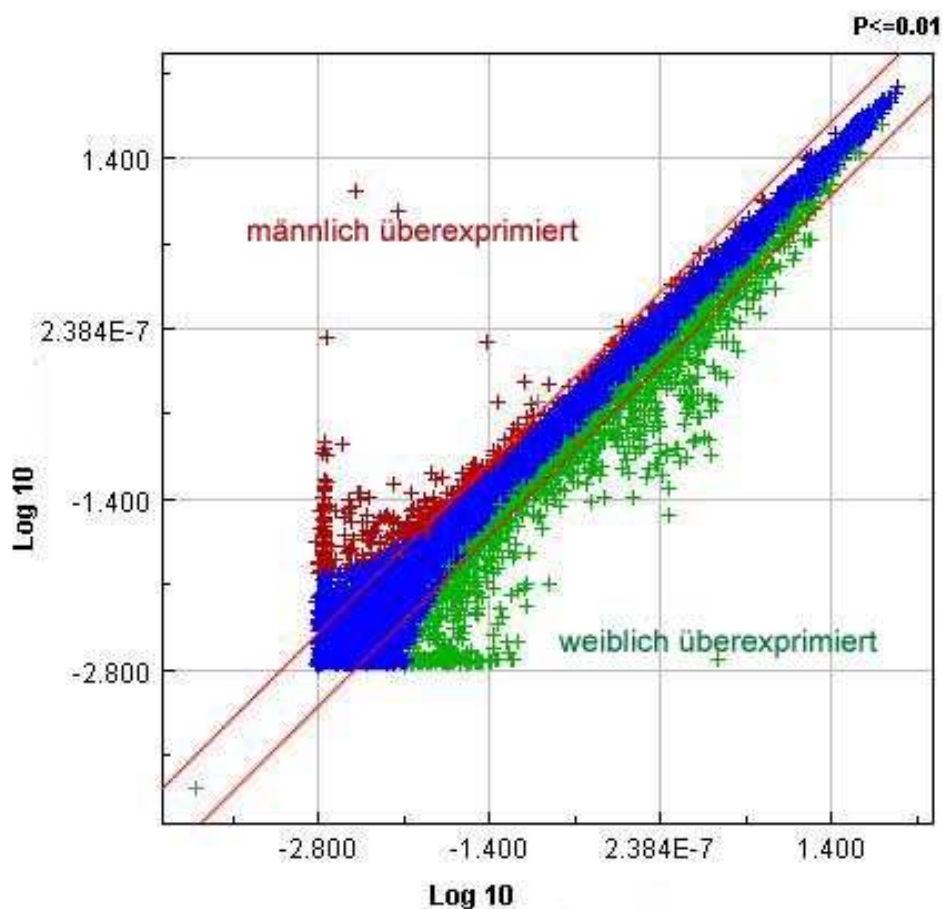


Abbildung 29:  $\text{Log}_{10}$ - Darstellung der Genexpressionsdaten im Array Nr. 5 (A10-vs. A-5)

Die männlichen und weiblichen Expressionsraten sind einander gegenübergestellt. Der blaue Bereich bedeutet eine unveränderte Expressionsrate zwischen den Geschlechtern. Grün steht für eine weibliche, rot für eine männliche Hochregulation der Genexpression.

Im nächsten Schritt wurden die Gene mit Hilfe der TreeRanker® Software (Miltenyi Biotec) biologischen Prozessen zugeordnet. Als Datenbank dienten die Gene des Agilent Whole Genome Oligo Array. Von den insgesamt 844 differentiell regulierten Genen konnten 298 der insgesamt 300 männlich-hochregulierten und 534 der insgesamt 544 weiblich-hochregulierten Gene biologischen Prozessen und Signaltransduktionswegen zugeordnet werden. Das heißt, annähernd doppelt so viele Gene werden bei den weiblichen HUVEC im Vergleich zu den männlichen verstärkt exprimiert. Dies betrifft besonders Gene, die bei der zellulären Immunantwort und Entzündungsprozessen eine Rolle spielen.

Tabelle 5: Auszug differentiell regulierter Gene der weiblichen HUVEC:

<u>1. Major histocompatibility complex</u>	<u>2. Zelladhäsion</u>	<u>3. Entzündung</u>
- major histocompatibility complex, class II, DP beta 1 (-0,331)	- selectin E (endothelial adhesion molecule 1) (-0,703)	- interleukin 17 receptor D (IL17RD) (-1,419)
- major histocompatibility complex, class II, DR alpha (-0,555)	- selectin P (granule membrane protein 140kDa, antigen CD62) (-0,596)	- interleukin 1 receptor, type I (IL1R1) (-0,672)
- major histocompatibility complex, class II, DR beta 5 (-0,351)	- vascular cell adhesion molecule 1 (-0,723)	- interleukin 1 receptor, type II (IL1R2) (-0,718)
- Interferon gamma-inducible protein 30 (-0,531)		- interleukin 1 receptor accessory protein-like 1 (IL1RAPL1) (-0,496)
- major histocompatibility complex, class I-related (-0,742)		- colony stimulating factor 1 receptor (CSF1R), mRNA (-0,675)
		- natural cytotoxicity triggering receptor 1 (-0,665)

In Tabelle 5 sind Gene dargestellt, welche bei den weiblichen HUVEC hochreguliert waren und bei der zellulären Immunantwort (Haupthistokompatibilitätskomplex) sowie

bei Entzündungsprozessen ( Zelladhäsion, Entzündungsmediatoren) eine Rolle spielen. In grün dargestellt ist der  $\log_2$  der unterschiedlichen Expressionsraten zwischen männlichen und weiblichen Individuen. Der Microarray bot erstmals die Möglichkeit die sexspezifische Regulation von immunologischen Prozessen unabhängig von hormonellen Einflüssen zu messen, da Östrogen- und Testosteronkonzentration im venösen Nabelschnurblut annähernd gleich sind. Durch die Verwendung von Nabelschnurzellen spielten umweltbedingte Einflüsse, wie Lebensstilfaktoren oder Ernährungsgewohnheiten eine untergeordnete Rolle auf die Genexpressionsraten. Zusammenfassend kann man sagen, dass weibliche Individuen von Geburt an eine erhöhte Immunreaktivität aufweisen.

## 4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die sexspezifische Genregulation kardiovaskulär relevanter Faktoren an humanen Nabelschnurzellen untersucht. Die Auswahl, der zu untersuchenden Gene erfolgte durch Literaturrecherche und konzentrierte sich auf drei Bereiche:

- Gene mit Einfluss auf die Vasoreaktivität
- Gene mit Einfluss auf den oxidativen Status
- Gene mit Einfluss auf die zelluläre Stressantwort

Da gezeigt werden konnte, dass die Östrogen- und Androgenkonzentration im Nabelschnurblut männlicher und weiblicher Neugeborener nicht unterschiedlich ist, bieten sich humane umbilikale Nabelschnurendothelzellen an, um hormonunabhängige, sexspezifische Unterschiede in der Genexpression weitergehend differentiell zu untersuchen. Die Verwendung von HUVEC ermöglichte weiterhin einen möglichst frühen Untersuchungszeitpunkt für die differentiell regulierte Genexpression zwischen Individuen.

### 4.1 Bedeutung der untersuchten Gene in der Realtime RT-PCR

#### 4.1.1 Gene mit Einfluss auf die Vasoreaktivität

Neben seiner Bedeutung als Grenzschicht zwischen Blutstrom und Gefäßwand besitzt das Endothel wichtige Funktionen bei der Modulation des Vasotonus. Hierbei spielt die Freisetzung und Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) eine zentrale Rolle. Bei der endothelialen Dysfunktion kommt es zu einer veränderten Vasoreaktivität mit Einschränkung der endothelabhängigen Relaxation. In unserer Untersuchung konzentrierten wir uns auf sieben verschiedene Gene, die unter anderem durch ihren Einfluss auf die Vasoreaktivität (Vasokonstriktion/ Vasodilatation) mit der Entstehung von Arteriosklerose in Zusammenhang gebracht werden können.

Die endotheliale NO-Synthase gilt als Schlüsselenzym der vaskulären Homöostase und wird u.a. in Endothelzellen exprimiert [85]. Neben seiner Funktion als stärkster endogener Vasodilatator ist es für eine Reihe gefäßschützender Eigenschaften, wie die

Regulation der Leukozytenadhäsion an das Endothel, Inhibition der Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen, sowie Inhibition der Plättchenaggregation verantwortlich [64]. In zahlreichen Studien konnte eine schnelle Aktivierung der eNOS über den Östrogenrezeptor nachgewiesen werden [86, 87].

Untersuchungen unseres Labors haben gezeigt, dass die Translation alternativ gespleißter mRNA-Transkripte zu verkürzten eNOS-Proteinen führt, denen nahezu die vollständige Reduktase-Domäne fehlt. In Aktivitätsassays konnte gezeigt werden, dass eNOS13A keine eigene eNOS-Aktivität besitzt und nach Koexpression mit full-length eNOS in COS-7 Zellen zu einer Abnahme der eNOS-Aktivität über einen dominant negativen Effekt durch Heterodimerbildung führt [65]. Zuvor war der Zusammenhang zwischen einer hohen Anzahl von CA-Repeats im Intron 13 und einem erhöhten Risiko für koronare Herzkrankheit nachgewiesen worden [88]. Die Untersuchung der Genexpressionsraten mittels Realtime RT-PCR zeigte jedoch keine differentiell regulierte Expression für eNOS und die eNOS-Spliceprodukte 13A, 13B und 13C. Dies könnte ursächlich auch mit der Regulation durch  $17\beta$ -Östradiol zusammenhängen. Das Steroidhormon kommt bei beiden Geschlechtern in einheitlichen Konzentrationen im venösen Nabelschnurblut vor und führt über den Östrogenrezeptor  $\alpha$  zu einer schnellen Aktivierung der endothelialen NO-Synthase.

Als ein Gegenspieler von eNOS kann Caveolin gesehen werden. Es wurde als erstes Protein, das auf den Caveolae lokalisiert ist, entdeckt und ist an den transmembranösen Transportmechanismen der Endothelzelle beteiligt [89]. Es transportiert Cholesterin vom endoplasmatischen Retikulum zur Plasmamembran [66] und konnte in verschiedenen tierexperimentellen Studien als potenter Inhibitor der eNOS identifiziert werden. Durch Ausschaltung des Gens kam es zu einer verstärkten Vasorelaxation [90, 91], wie auch zu einer Hypercholesterinämie [92]. Trotz eines Anstiegs des Cholesterins zeigten die Tiere mit Verlust des Gens für Caveolin-1 eine Verminderung der arteriosklerotischen Läsionen um 70% gegenüber den ApoE-/- Vergleichstieren. Die Autoren vermuteten, dass die Progression der endothelialen Dysfunktion eng mit der Regulation des LDL-Gehalts durch Caveolin-1 verknüpft ist [93]. Die sexspezifischen Expressionsraten von Caveolin zeigten in der hier durchgeführten Untersuchung an HUVEC keinen Unterschied. Eine verminderte Ausprägung von arteriosklerotischen Läsionen beim weiblichen Individuum lässt sich



durch eine differentiell regulierte, basale Expressionsrate von Caveolin-1 eher nicht erklären.

Die Familie der Endotheline besteht aus potenten endogenen Vasokonstriktoren. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Gefäßtonus und der Entstehung der Arteriosklerose [68, 70]. Erstmals 1994 wiesen Haynes et al. die antihypertensive Wirkung von Antagonisten beim Menschen nach [94]. Außerdem konnte Endothelin-1 mit der Entstehung von oxidativem Stress, wie auch Entzündungsprozessen, in Zusammenhang gebracht werden. Diese wirken sich zusätzlich zum arteriellen Hypertonus negativ auf das Gefäßsystem aus [95]. Der Anstieg von Sauerstoffradikalen wird u.a. durch das Enzym NAD(P)H-Oxidase vermittelt [96]. Zusammenfassend spielen erhöhte Endothelin-1-Plasmaspiegel in der Pathogenese einer Reihe kardiovaskulärer Erkrankungen eine entscheidende Rolle, wie zum Beispiel dem Myokardinfarkt [97], der Arteriosklerose [98] und der Herzinsuffizienz [99].

In der Rancho Bernardo Studie mit 961 Teilnehmern konnte eine enge Korrelation zwischen dem Endothelin-1-Plasmaspiegel und der Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit gesehen werden. Bei Frauen betraf dies alle Altersklassen; bei Männern traf dies nur auf die über 75-jährigen zu. Die Endothelin-1-Spiegel waren zudem abhängig von zahlreichen Lebensstilfaktoren wie Rauchverhalten, LDL-Cholesterinspiegel oder Hormoneinnahme sowie dem Alter der Probanden [100].

Da unsere Untersuchungen keinen signifikanten Unterschied der Genexpressionsraten des Endothelin-1-Gens zwischen männlichen und weiblichen Nabelschnurzellen zeigten, könnte man vermuten, dass es erst im Verlauf des Lebens zu einer Modulation der Genexpressionsraten kommt - in Abhängigkeit von exogenen und endogenen Faktoren.

Wie Endothelin-1 führt auch Angiotensin II zu einer ausgeprägten Vasokonstriktion. Es entsteht aus Angiotensin I durch enzymatische Abspaltung von zwei Aminosäuren durch ACE. Zusätzlich inaktiviert ACE das vasodilatatorische Gefäßhormon Bradykinin.

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) kann auf diese Weise auch im Fall einer Hypovolämie oder bei Natriumverlust den Blutdruck aufrechterhalten.

In einer Untersuchung der perikardialen Flüssigkeit bei 44 Patienten mit KHK konnte gezeigt werden, dass ältere Frauen eine niedrigere Expression von ACE als gleichaltrige Männer aufweisen [101]. Zudem besteht eine ausgeprägte hormonelle Regulation. Im Allgemeinen geht man davon aus, dass Östrogene zu einer Verschiebung des Renin-Angiotensin-Gleichgewichts zugunsten der vasodilatatorischen Komponente führen. Dabei kommt es zu einer Verminderung des aktiven Renins sowie des ACE-Spiegels bei gleichzeitiger Erhöhung des Vasokonstriktors Angiotensin II. Durch die verminderte Expression des Angiotensin II Rezeptors ist die Wirkung an der Zielzelle jedoch eingeschränkt [102].

In einer Bevölkerungsstudie mit annähernd 20.000 Probanden konnte gezeigt werden, dass Frauen, die mit einem Angiotensin-II-Rezeptorblocker behandelt wurden im Vergleich zu denen, die ACE-Hemmer einnahmen einen Überlebensvorteil aufwiesen. Bei Männern dagegen zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Medikamenten [103]. Ursächlich für diese Beobachtung könnte einerseits eine differentiell regulierte Expression von ACE sein, wie bereits in der perikardialen Flüssigkeit gezeigt. Andererseits könnte der Einfluss des weiblichen Geschlechtshormons auf die Regulation des RAAS eine Rolle spielen.

Bei unseren Untersuchungen mittels Realtime RT-PCR konnte kein Unterschied der Genexpressionsraten zwischen den Geschlechtern festgestellt werden, obwohl die Konzentrationen von Östrogen im venösen Nabelschnurblut als annähernd gleich gewertet werden konnten. Bisher wurden zudem über 100 Polymorphismen des Gens für ACE in der Region 17q23 identifiziert, welche geschlechtsunabhängig zu einer Veränderung der Expressionsraten führen könnten [104].

#### **4.1.2 Gene mit Einfluss auf den oxidativen Status**

Epidemiologische und experimentelle Studien legen nahe, dass das Geschlecht eine entscheidende Rolle für den Gehalt an Sauerstoffradikalen im Blut spielt. Aorten männlicher Ratten wiesen einen um 34% höheren Gehalt an Sauerstoffradikalen im Vergleich zu weiblichen Tieren auf [105]. Während die Plasmaspiegel von  $H_2O_2$  bei beiden Geschlechtern bei hypertensiven Patienten höher als bei normotensiven lagen, war der Anstieg von  $H_2O_2$  bei Männern stärker ausgeprägt als bei Frauen [106]. Als

Ursache wurde ein sexspezifischer Dimorphismus der antioxidativen Systeme vermutet.

Superoxiddismutasen katalysieren den Abbau von Superoxid ( $O_2^-$ ) zu Wasserstoffperoxyd ( $H_2O_2$ ). Dadurch reduzieren sie den Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies und schützen Proteine vor dem schädigenden Einfluss von oxidativem Stress.

Die Cu/Zn-Superoxiddismutase (SOD-1) zählt zu den antioxidativen Enzymen der Mitochondrien. Sartori-Valinotti et al. fanden eine signifikant erhöhte Expressionsrate von SOD-1 in der Nierenrinde männlicher Ratten, gegenüber den weiblichen Versuchstieren [107]. Sie vermuteten, dass dies auf verstärkten oxidativen Stress der männlichen Tiere zurückzuführen sei, da frühere Studien eine positive Korrelation zwischen oxidativem Stress und einer verstärkten Antwort der antioxidativen Systeme nachgewiesen hatten [108]. Die Messung der Expressionsraten männlicher und weiblicher Nabelschnurzellen mittels Realtime RT-PCR hingegen ergab keinen signifikanten Unterschied. Ursächlich könnten Unterschiede in der Gewebespezifität der Cu/Zn-Superoxiddismutase zu Grunde liegen. Untersuchungen des Nierenmarks durch die Forschungsgruppe, welche zuvor einen sexspezifischen Unterschied der Expression in der Nierenrinde gefunden hatte, ergaben dagegen keinen signifikanten Unterschied für SOD-1 [107]. Weiterhin scheint das männliche Sexualhormon bei der Regulation der Enzymaktivität eine wichtige Rolle zu spielen. Beispielsweise fanden Sullivan et al. einen testosteronabhängigen Anstieg der SOD-1 Aktivität bei männlichen Tieren, welche nach Gonadektomie wieder absank [109]. Ausgehend von annähernd gleichen Testosteronspiegeln im venösen Nabelschnurblut von männlichen und weiblichen Individuen [60] spielte dieser Befund in unserem Modell keine Rolle.

Die Mn-Superoxiddismutase (SOD-2) und die Gluthationperoxidase (GPX-3) sind ebenfalls essentielle Bestandteile der zellulären Abwehr gegen oxidativen Stress. In der Realtime RT-PCR mitochondrialer RNA konnte nachgewiesen werden, dass SOD-2 und GPX-3, isoliert aus Leber- und Gehirngewebe von Ratten, bei den weiblichen Tieren gegenüber den männlichen Tieren 2-fach höher exprimiert wurden [110] und damit den Gehalt an schädlichen Sauerstoffradikalen halbierten. Dies geschieht durch die Aktivierung des ERK1-MAPK/NF $\kappa$ B-Signalwegs über 17 $\beta$ -Östradiol.

Die Ergebnisse von Strehlow et al. bestätigten die zeit- und konzentrationsabhängige Erhöhung der Expressionsrate von SOD-2 durch 17 $\beta$ -Östradiol und konnten zusätzlich eine verstärkte Enzymaktivität in weiblichen VSMC Zellen der Rattenaorta nachweisen [111]. Klinische Daten sprechen dafür, dass dieser Mechanismus auch beim Menschen eine entscheidende Rolle spielt. Experimentelle Studien bei postmenopausalen Frauen zeigten eine verminderte Plasmaaktivität der Superoxiddismutasen im Vergleich zu prämenopausalen Frauen oder solchen die eine Hormonersatztherapie erhielten [112]. Die Enzyme Catalase und Gluthationperoxidase zeigten dagegen keine Unterschiede.

In einer weiteren Untersuchung fiel eine signifikante Verminderung der mitochondrialen Enzymaktivität von SOD-2 im Alter auf [113]. Leider erfolgte in dieser Studie keine sexspezifische Betrachtung.

Unsere Untersuchung konnte die sexspezifischen Unterschiede der Genexpressionsraten von SOD-2 und GPX-3 in Rattengewebe für humane, venöse Nabelschnurzellen nicht bestätigen. Ursächlich hierfür könnte passend zu den oben aufgeführten Ergebnissen eine Regulation durch 17 $\beta$ -Östradiol sein, welches im venösen Nabelschnurblut unabhängig vom biologischen Geschlecht des Feten in annähernd gleichen Konzentrationen vorkommt.

Dagegen konnte beim Menschen im weiblichen Geschlecht, unabhängig vom Menopausenstatus, eine erhöhte erythrozytäre Glutathionperoxidase-Aktivität gegenüber Männern nachgewiesen werden [114]. Auch Ho et al. fanden eine differentiell regulierte Enzymaktivität zugunsten der weiblichen Probanden. Jedoch war der Unterschied zwischen Männern und Frauen nur bei den nichtrauchenden Probanden signifikant [115], so dass von einer zusätzlichen Beeinflussung der Enzymaktivität durch das Rauchverhalten ausgegangen werden muss. Guemouri et al. wiesen weiterhin auf eine signifikante Erhöhung der Glutathionperoxidaseaktivität im Zusammenhang mit Alkoholabusus sowie der Einnahme von Antidepressiva oder Schilddrüsenhormonen hin [114]. Zudem gibt es Hinweise auf eine Erhöhung der Enzymaktivität bei sportlich aktiveren weiblichen Probanden [116].

Das Enzym Catalase katalysiert die Reaktion von Wasserstoffperoxyd ( $H_2O_2$ ) zu Wasser und Sauerstoff. Tierexperimentell zeigten Azevedo et al. eine deutlich erhöhte Enzymaktivität der Catalase in Makrophagen weiblicher Ratten und brachten dies in Zusammenhang mit der geschlechterspezifisch unterschiedlichen Funktionsweise des

Immunsystems. Bei Ovariectomie nahm die Catalase-Aktivität um 48% ab und konnte durch die Gabe von Östrogen vollständig wiederhergestellt werden [117].

Einige Studien konnten auch signifikant erhöhte Plasmaspiegel bei Frauen gegenüber Männern nachweisen [118]. Andere Studien mit einer größeren Fallzahl von 1836 Probanden konnten dieses Ergebnis nicht bestätigen [114]. Zudem gab es keinen Hinweis auf eine Beeinflussung der Enzymaktivität in der Menopause. Ho et al. fanden dagegen einen altersabhängigen, signifikanten Anstieg der erythrozytären Catalase-Aktivität bei Nichtrauchern. Bei Rauchern waren die Enzymaktivität jedoch signifikant vermindert (29.70 +/- 3.07 mU/g Hb vs. 41.63 +/- 4.92 mU/g Hb (P < 0.05) [115].

Beim Menschen scheint der Einfluss von Umweltfaktoren eine größere Rolle als die hormonelle Regulation zu spielen. Eine Studie mit 40 postmenopausalen Frauen zeigte eine signifikant erhöhte Catalase-Aktivität bei gleichzeitiger Verminderung des oxidativen Stresses bei sportlich aktiven Frauen gegenüber weniger aktiven Frauen [116].

Unabhängig von einer Regulation der Enzymaktivität von Catalase durch Umweltfaktoren wie Alter, Rauchverhalten und Fitness, konnte in unserer Untersuchung auf genetischer Ebene keine differentielle Erhöhung der basalen Expressionsrate für Catalase bei menschlichen Nabelschnurzellen festgestellt werden.

Das HMOX-1-Gen kodiert für das Enzym Hämoxygenase-1 (HO-1), welches verstärkt bei Entzündungsprozessen der Gefäße exprimiert wird. Es katalysiert die Oxidation von Häm zu Biliverdin unter Freisetzung von Eisen und Kohlenstoffmonoxid [73]. Durch eine NO-unabhängige Stimulation der Guanylatzyklase führt HO-1 zu einer Vasodilatation. Weiterhin inhibiert das Enzym die Proliferation glatter Muskelzellen und schützt so vor der Entstehung von Arteriosklerose [119, 120]. Für das Gen sind unterschiedliche Polymorphismen bekannt, wobei der AA-Genotyp der HMOX-1 mit einem erhöhten Blutdruck assoziiert ist. Diese Beobachtung trifft allerdings nur auf Frauen zu [121]. Da in unserer Studie keine unterschiedlichen Genexpressionraten mittels Realtime RT-PCR gemessen konnten, wäre eine Untersuchung der Polymorphismen auf DNA-Ebene von weiterführendem Interesse.

Das NOX-4-Gen kodiert für die NAD(P)H-Oxidase 4, welche als membranständiges Enzym die Reduktion von Sauerstoff zu Superoxid ( $O_2^-$ ) katalysiert. Über die

Entstehung von Sauerstoffradikalen ist es an zahlreichen Zellvorgängen wie Zellwachstum, Migration und Entzündung beteiligt [75, 76]. Das Gen NOX-4 wird vorwiegend in der Niere und im Gefäßendothel exprimiert [122]. Ein wichtiger Regulator der NAD(P)H-Oxidase 4 ist Angiotensin II, das zur Aktivierung des Enzyms und zur nachfolgenden Vasokonstriktion führt [123]. Im Tiermodell konnte dieser Zusammenhang bestätigt werden. Nach Gabe des NAD(P)H-Oxidase Inhibitors Apocynin, zeigten sich eine geringere Blutdruckerhöhung und weniger ausgeprägte endotheliale Schäden nach Infusion von Angiotensin [77]. Darüber hinaus kommt es durch eine Inaktivierung von NO zu einer angiotensinunabhängigen Blutdruckerhöhung. Im Tierexperiment konnte weiterhin gezeigt werden, dass die NAD(P)H-abhängige Produktion von Sauerstoffradikalen in der Aorta weiblicher Ratten um 50% geringer war als bei den männlichen Tieren. Diese Geschlechtsunterschiede waren mit einer verminderten Expression von NOX-1 und NOX-4 bei weiblichen Tieren assoziiert [124]. Der Effekt wurde auf die veränderte Genexpression durch 17 $\beta$ -Östradiol zurückgeführt [125].

Bei Messung der basalen Expressionsraten von NOX-4 männlicher und weiblicher HUVEC konnte keine differentielle Regulation festgestellt werden. Neben einer hormonellen Regulation wird NOX-4 mRNA auch bei physikalischen Stimuli, wie beispielsweise *Shear*-Stress, Hypoxie und Ischämie sowie durch TNF- $\alpha$  [126] oder Insulin induziert [127, 128].

Das src-homology (Shc) Protein wird durch das Gen p52+66<sup>shc</sup> kodiert und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Signaltransduktion. Drei verschiedene Gene konnten für dessen Kodierung identifiziert werden: shcA, shcB und shcC. Ersteres wird in humanem Gewebe am häufigsten exprimiert und kommt durch alternatives Splicing in drei verschiedenen Größen vor: 46, 52 und 66 kDa [129]. Über den EGF-Rezeptor (Epidermaler Wachstumsfaktor) aktivieren p52<sup>shc</sup>/p46<sup>shc</sup> den Ras/MAP-Kinase Signalweg und führen zu verstärktem Wachstum. P66<sup>shc</sup> übt dagegen einen inhibitorischen Effekt auf die Signaltransduktion aus, indem es den Fos-Promoter blockiert [129]. Auch der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor 1 (IGF-1) wird von den Splicevarianten gegensätzlich reguliert. P66<sup>shc</sup> inhibiert die Aktivierung von IGF-1 durch p52<sup>shc</sup> und führt damit zu einer Verminderung des IGF-1 vermittelten Zellwachstums [130].

In der Untersuchung an Nabelschnurzellen, zeigten die männlichen HUVEC eine signifikant erhöhte Expressionsrate für das Gen p52+66<sup>shc</sup>. Die kardiovaskuläre Relevanz einer verstärkten Expression der beiden Splicing-Varianten im untersuchten Genabschnitt ist bisher noch nicht eindeutig geklärt.

Die Bedeutung der Splicevariante p66<sup>shc</sup> ist bereits genauer erforscht. Durch Stimulation der Zelle mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder UV-Strahlung kommt es zur Aktivierung von p66<sup>shc</sup> und zu einem Anstieg der intrazellulären Sauerstoffradikale (ROS). Der oxidative Stress bedingt ein vorzeitiges Altern der Zelle sowie den programmierten Zelltod [79]. Fehlt das Gen für p66<sup>shc</sup> wird die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien zugunsten der Glykolyse vermindert. Als Nebenprodukt des mitochondrialen Elektronenflusses, der zur Herstellung von Energie in Form von ATP dient, entstehen grundsätzlich freie Radikale. Die verminderte Produktion von Sauerstoffradikalen in p66<sup>shc</sup><sup>-/-</sup> Zellen ist auf eine Drosselung des mitochondrialen Energiestoffwechsels zurückzuführen [131].

Wie bereits in der Freien-Radikal-Theorie nach Harman beschrieben, hängt die Entstehung von oxidativem Stress eng mit dem Altern der Zelle zusammen [132]. Das Ausschalten des Gens für p66<sup>shc</sup> führt zu einer um 30% verlängerten Lebensspanne bei Mäusen [80]. Im gleichen Modell wurde auch eine verminderte Ausprägung arteriosklerotischer Läsionen am Gefäßsystem beobachtet [133]. Neuere Studien beleuchten die genaueren Hintergründe. Hierfür wurde ein Tiermodell verwendet, in welchem die Ratten aufgrund einer Aortenisthmusstenose Gefäßabschnitte mit unterschiedlichen Blutdrücken aufwiesen. In den hypertensiven Segmenten war die Aktivität der eNOS vermindert, bei einer verstärkten Phosphorylierung von p66<sup>shc</sup> und einer erhöhten Produktion an Sauerstoffradikalen. Man vermutet, dass p66<sup>shc</sup> über diesen Mechanismus eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der endothelialen Dysfunktion spielt [134].

Bisher konnte nur bei hormonsensitiven Krebszellen eine Hochregulation von p66<sup>shc</sup> durch Testosteron, wie auch durch Östrogene nachgewiesen werden [135]. Ob diese Beeinflussung der Expressionsrate auch bei anderen Geweben und Zellen, wie den HUVEC, eine Rolle spielt, bleibt Gegenstand weiterer Studien. In unserer Untersuchung zeigten die Genexpressionsraten von p66<sup>shc</sup> keinen Unterschied zwischen männlichen und weiblichen HUVEC.

### 4.1.3 Gene mit Einfluss auf die zelluläre Stressantwort

Hitzeschockproteine (Hsp) dienen der Stabilisierung von Proteinen bei zellulärem Stress. Als molekulare Chaperone sind sie verantwortlich für die korrekte Faltung der Proteine [136]. Dabei wirken Hsp90 und Hsp70 in einem Zusammenspiel als Multichaperon-Komplex und sind unter anderem für die Bildung von Steroidhormonrezeptoren und Transkriptionsfaktoren verantwortlich. Die Expression der Hitzeschockproteine kann durch verschiedene Stimuli wie beispielsweise Hitze und Ischämie verstärkt werden [81]. Diesen Effekt fand man auch *in vivo*. Es wird angenommen, dass eine Überexpression kardioprotektiv wirkt [82] und dass dieser Schutz induzierbar ist. Eine Aktivierung von Hsp90 durch 17 $\beta$ -Östradiol konnte nachgewiesen werden und führte *in vitro* über eine Erhöhung der Bindung an die endotheliale NO-Synthase (eNOS) zu einer schnellen Vasorelaxation [83, 137]. In unserer Untersuchung war kein sexspezifischer Unterschied der Genexpressionsraten für Hsp90 nachweisbar.

Wir fanden allerdings bei den weiblichen Nabelschnurzellen eine signifikant erhöhte Genexpression für Hsp70. Dieses Ergebnis konnten wir im Microarray bestätigen. Trost et al. stellten fest, dass eine Überexpression dieses induzierbaren Hitzeschockproteins bei Herzinfarkt nicht nur zu einer verminderten Infarktgröße führt, sondern auch vor post-ischämischer myokardialer Dysfunktion schützt. Beispielsweise wiesen Hsp70-positive Mäuse, unabhängig von ihrem Geschlecht, eine verbesserte systolische Kontraktilität auf, nachdem sie einen Zyklus aus Ischämie und Reperfusion durchlaufen hatten [82].

In Tiermodellen konnte bestätigt werden, dass weibliche Herzen im Allgemeinen eine größere Widerstandsfähigkeit gegenüber Schädigungen des Gewebes durch Ischämie und nachfolgender Reperfusion aufweisen. Zudem war die Infarktgröße gegenüber männlichen Tieren vermindert [138]. Eine Beeinflussung durch das weibliche Sexualhormon Östradiol ist nicht ausgeschlossen [139]. Voss et al. konnten diesen geschlechtshormonabhängigen Zusammenhang in einem Experiment an Ratten bestätigen. Weibliche Tiere exprimierten doppelt so viel induzierbares Hsp70. Durch Ovariectomie kam es zu einer Verminderung des Hsp70-Spiegels; Hormonersatztherapie machte diesen Effekt wiederum rückgängig [140]. Dagegen scheint Testosteron die Expression der Hitzeschockproteine auf genomischer Ebene



zu unterdrücken [141]. Wang et al. führten beispielsweise die gemessenen Unterschiede der verbesserten postischämischen myokardialen Funktion bei weiblichen Tieren auf eine differentiell regulierte Entzündungsantwort zwischen den Geschlechtern zurück. Verglichen mit den männlichen Tieren, konnte bei den weiblichen Ratten eine verminderte Expression von TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$  und IL-6 gemessen werden [138].

Die Expressionsrate von ICAM-1, einem intrazellulären Adhäsionsmolekül, unterliegt ebenfalls der Regulation von proinflammatorischen Zytokinen [142]. Die Adhäsionsmoleküle spielen eine entscheidende Rolle beim zellulären Entzündungsprozess, indem sie die Einwanderung von Leukozyten in die Gefäßwand erleichtern. Deshalb können sie auch als Marker für endotheliale Dysfunktion betrachtet werden [143, 144]. In arteriosklerotischen Plaques wird das Gen verstärkt exprimiert [84]. Patienten mit metabolischem Syndrom und Insulinresistenz wiesen erhöhte Plasmaspiegel auf [145]. Dabei korrelierten die Plasmaspiegel von ICAM-1 zwar bei Frauen, nicht jedoch bei Männern höheren Lebensalters mit einer Zunahme der Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse [146, 147]. In einer groß angelegten, prospektiven Studie in Boston 2008 konnte die Progression der Arteriosklerose und eine zunehmende Verengung der Strombahn anhand des ICAM-1 Spiegels für Frauen vorausgesagt werden. Allerdings war die Vorhersage für ein akutes Infarktgeschehen nicht möglich, da nur eine schwache Korrelation zwischen der Plasmakonzentration des Adhäsionsmoleküls und einem thrombotischen Ereignis bestand [148].

Zur Frage der hormonellen Beeinflussung gibt es widersprüchliche Daten. Sowohl Scarabin et al., als auch die Arbeitsgruppe um Van Baal fanden eine Abnahme des ICAM-1 Spiegels bei postmenopausalen Frauen nach kurzzeitiger Hormonersatztherapie [149, 150]. In der bereits erwähnten Bostoner Studie konnte kein signifikanter Unterschied des ICAM-1 Spiegels bei Frauen mit und ohne Hormonersatztherapie festgestellt werden [148].

Die Messung der Genexpressionsrate bei männlichen und weiblichen Nabelschnurzellen ergab keine differentielle Regulation von ICAM-1 bei weitgehend gleicher hormoneller Beeinflussung. Dieses Ergebnis konnte durch den Microarray bestätigt werden. Wie entscheidend allerdings Umweltfaktoren in der Beeinflussung eines kardiovaskulären Risikoprofils sein können, zeigt eine Studie zur mediterranen Ernährung. Darin führt der Konsum von Nüssen signifikant zu einer Verminderung des ICAM-1-Spiegels [151]. Rauchen dagegen bedingt dessen Erhöhung [152].

## **4.2 Potentieller Einfluss von Umweltfaktoren auf die Genexpression in Nabelschnurzellen**

Die bereits erwähnten klassischen Risikofaktoren zur Entstehung der Arteriosklerose wirken sich nicht nur auf das Gefäßsystem der Mutter aus, sondern beeinflussen aller Wahrscheinlichkeit nach auch die Zellen des fetalen Kreislaufs. Die Auswirkung von Nikotin auf die fetale Entwicklung wurde bereits in zahlreichen Studien untersucht. Habek et al. kamen zu dem Ergebnis, dass 5-20 Zigaretten pro Tag zu einer Minderung des Geburtsgewichts um 250 g führt. Eine Minderung um 350 g ließ auf einen Nikotinkonsum von mindestens 20 Zigaretten pro Tag während der Schwangerschaft schließen [153]. Als Ursache wird eine reduzierte eNOS-Aktivität bei Raucherinnen angenommen, welche die dilatatorische Kapazität der Nabelschnurvene einschränkt [154]. Ähnliche Zusammenhänge bestehen auch für andere Risikofaktoren der Arteriosklerose, wie dem arteriellen Hypertonus, der Dyslipidämie und dem Diabetes mellitus [155], welche in ihrer Summe das „Metabolische Syndrom“ bilden. Dabei gilt: Je niedriger das Geburtsgewicht, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit im späteren Leben vom Metabolischen Syndrom betroffen zu sein [156].

Zusammenfassend lässt sich eine Beeinflussung der Genexpressionsraten in den untersuchten HUVEC durch die Lebensweise der Mutter und durch Umwelteinflüsse nicht ausschließen. Die gewonnenen männlichen und weiblichen HUVEC wurden in unserer Untersuchung jedoch für zwei Passagen im gleichen Kulturmedium mit gleichen Konzentrationen von Hormonen und Wachstumsfaktoren kultiviert. Inwiefern die Expressionsraten der Nabelschnurzellen trotzdem von äußeren Einflüssen während der Schwangerschaft betroffen sind, ist nicht geklärt und muss in weiteren Studien untersucht werden. Um eine Beeinflussung der Nabelschnurzellen durch Umwelt- und Ernährungsfaktoren zu minimieren, sollte eine größere Fallzahl für die Untersuchung zur Verfügung stehen.

## **4.3 Erhöhte Immunreaktivität der Frau**

Männer sind, verglichen mit Frauen gleichen Alters, in fast jedem Land von einer höheren Mortalitätsrate betroffen [157]. Diese sexspezifischen Unterschiede können auf eine Kombination aus verschiedenen biologischen, sozialen und

umweltbedingten Faktoren zurückgeführt werden. Beispielsweise neigen Männer eher zu risikobereitem Verhalten und sind dadurch häufiger Opfer von Verkehrsunfällen [158]. Betrachtet man jedoch die Säuglingssterblichkeit, fällt auch hier, unabhängig von sozialen und umweltbedingten Faktoren, eine Benachteiligung des männlichen Geschlechts auf. In 15 Industriennationen überstieg im Jahr 2000 die Mortalitätsrate männlicher Neugeborener die weibliche um das 1,24-fache [159]. Weibliche Neugeborene weisen eine stärker ausgeprägte Immunantwort durch bakterielle und parasitäre Stimuli auf und neigen insgesamt weniger zu Infektionen als männliche Neugeborene [160, 161]. Auch im Erwachsenenalter spielt das Geschlecht eine entscheidende Rolle bei der Anfälligkeit für Infektionskrankheiten. Frauen entwickeln seltener einen septischen Schock als Männer und versterben nur in 26% an den Folgen. Bei Männern sind es 70% [162].

Insgesamt geht man von einer verstärkten Immunreaktivität beim weiblichen Geschlecht aus. Frauen weisen nach Antigenstimulation einen erhöhten Immunglobulinspiegel auf [163]. In tierexperimentellen Studien konnten weibliche Mäuse Infektionskrankheiten schneller bewältigen als männliche [164]. Zudem sind Frauen im Vergleich zu Männern von einer höheren Abstoßungsrate nach Organtransplantationen betroffen [165].

Epidemiologische Untersuchungen konnten den Zusammenhang zwischen Entzündungsprozessen und kardiovaskulären Ereignissen herstellen [166], auch bekannt als „*response to injury*“- Hypothese [167]. Somit könnte auch die erhöhte Immunreaktivität der Frau im Sinne einer Präkonditionierung des weiblichen Immunsystems zur verminderten Ausprägung von Arteriosklerose beim weiblichen Geschlecht beitragen. Im von uns durchgeführten Microarray waren bei den weiblichen HUVEC, im Vergleich zu den männlichen, doppelt so viele Gene verstärkt exprimiert. Diese betrafen überwiegend Gene, die eine entscheidende Rolle bei der zellulären Immunantwort und bei Entzündungsprozessen spielen.

Die erhöhte Immunreaktivität erweist sich allerdings als zweischneidiges Schwert. Zum einen könnte ein potentieller Schutz vor Entzündungsreaktionen, einschließlich der Arteriosklerose bestehen. Zum anderen könnte sie unter bestimmten Voraussetzungen zu einer erhöhten Autoreaktivität führen und die Induktion autoimmuner Erkrankungen bewirken.

**Tabelle 5:** Geschlechtsabhängige Prävalenz ausgewählter Autoimmunerkrankungen, Modifiziert nach: Gleicher et al., J Autoimmun, Volume 28: 2007, 1-6

<b>Autoimmunerkrankung</b>	<b>Ratio (weiblich/männlich)</b>
Hashimoto Thyroiditis	50 : 1
Systemischer Lupus erythematodes	9 : 1
Sjögrens Syndrom	9 : 1 – 20 : 1
Antiphospholipid-Antikörper-Syndrom	9 : 1
Primär biliäre Zirrhose	9 : 1
Rheumatoide Arthritis	3 : 1 – 4 : 1
Multiple Sklerose	2 : 1

Gleicher et al. [168] gehen davon aus, dass 78% aller Autoimmunerkrankungen Frauen betreffen. In Tabelle 5 ist das Verhältnis von betroffenen Frauen zu betroffenen Männern für einige ausgewählte Erkrankungen aus diesem Formenkreis dargestellt. Zwar schwankt die Ratio zwischen den Geschlechtern erheblich. Trotzdem wird deutlich, dass Frauen überdurchschnittlich häufig von Autoimmunerkrankungen betroffen sind. Die Hintergründe werden kontrovers diskutiert. Einen Einfluss scheinen sowohl die Geschlechtshormone, als auch die unterschiedliche genetische Ausstattung zu spielen. Neuere Überlegungen schließen evolutionäre Faktoren mit ein.

#### **4.3.1 Die Rolle der Geschlechtshormone: Wirkt Östrogen pro- oder antiinflammatorisch?**

In den letzten Jahren richtete sich die Aufmerksamkeit zunehmend auf Unterschiede der zellulären und humoralen Immunantwort zwischen Frauen und Männern. Da die Arteriosklerose im Sinne der „response to injury“ Hypothese als Entzündungsreaktion der Gefäße angesehen werden kann [167], spielt das Immunsystem auch für die Entstehung der KHK eine entscheidende Rolle. Aufgrund der geringeren Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse bei Frauen wurde eine entzündungshemmende Wirkung weiblicher Geschlechtshormone angenommen. Hinweise auf eine antiinflammatorische Wirkung des 17β-

Östradiols ergaben Studien zu Morbus Alzheimer und Multipler Sklerose. Letztere zeigte eine Verbesserung der Symptome während der Schwangerschaft [169], während postmenopausale Frauen, die eine Hormonersatztherapie erhielten, ein geringeres Risiko hatten an Alzheimer zu erkranken [170].

Auf der anderen Seite sind Frauen häufiger von autoimmunen Erkrankungen betroffen [171], wodurch eine proinflammatorische Wirkung der Östrogene nahe gelegt wird. Insbesondere für den systemischen Lupus erythematoses (SLE) konnte ein Zusammenhang zwischen der Erkrankung und den weiblichen Geschlechtshormonen hergestellt werden [172]. Dagegen wird bei anderen Erkrankungen aus diesem Formenkreis, wie der rheumatoiden Arthritis (RA) ursächlich eine veränderte Genexpression aufgrund der unterschiedlichen Hormonspiegel vermutet [173]. Entscheidend für die Entwicklung der RA ist ein hormonelles Ungleichgewicht mit verminderten immunsuppressiv wirkenden Androgenspiegeln und erhöhten proinflammatorischen Östrogenspiegeln. Männer, die von RA betroffen sind, weisen niedrigere Testosteron- und DHEA-Spiegel auf, während der Gehalt an Östrogenen erhöht ist und positiv mit der Schwere der Entzündung korreliert [174]. Vermittelt wird dieses gestörte Gleichgewicht durch TNF- $\alpha$ , welches zu einer erhöhten Aromatase-Aktivität und damit zur vermehrten Umwandlung von Androgenen zu Östrogenen führt [175]. Obwohl Geschlechtshormone einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung der RA haben, scheinen sie weniger entscheidend für den Ausbruch der Erkrankung zu sein. Dieser erfolgt überwiegend im späteren Lebensalter, wenn der Östrogenspiegel der Frau wieder absinkt. Zudem erfahren erkrankte Frauen während der Schwangerschaft häufig eine Remission [176]. Im Falle der RA wirkte sich die orale Gabe von Östrogenen außerdem positiv auf die Gelenkdestruktion bei postmenopausalen Frauen aus [177].

Die genannten klinischen Beispiele sind eng mit der humoralen Immunantwort verknüpft. In vitro Studien konnten belegen, dass Östrogene IL-10-vermittelt zu einer erhöhten Antikörperproduktion der B-Zellen führten [178], während Testosteron diese verminderten [179].

Tierexperimentelle Studien zeigten eine deutlich komplexere Interaktion zwischen 17 $\beta$ -Östradiol und dem zellulären Immunsystem. Zum einen wurden Gene für Zytokine, wie das Monozyten-chemoattractant Protein-1 (MCP-1) [180], Interleukin-1 und -6 [181], die maßgeblich an der Entstehung arteriosklerotischer

Läsionen beteiligt sind, durch Östrogengabe vermindert exprimiert. Als weiteren Hinweis auf eine antiinflammatorische Wirkung von Östrogen auf zellulärer Ebene konnte gezeigt werden, dass der postmenopausale Anstieg von IL-6 Spiegels durch Hormonersatztherapie wieder rückgängig gemacht werden konnte [182].

Zu gegenteiligen Ergebnissen kam jedoch eine Studie, welche bei weiblichen Mäusen einen vierfachen Anstieg von IL-1 nach Injektion von Lipopolysacchariden im Vergleich zu den männlichen Tieren fand [183]. Dieser Effekt war rückläufig nach Entfernung der Ovarien [184]. Während der folliculären Phase des Menstruationszyklus wurden die höchsten IL-1-Spiegel gemessen [185]. Dies führte zu der Annahme, dass ein enger Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen Phasen der Reproduktivität und der weiblichen Zytokinproduktion besteht. Beispielsweise spielt Interleukin-1 in der Schwangerschaft eine entscheidende Rolle bei der Implantation des Embryos [186]. Zusammenfassend liegen sehr unterschiedliche Ergebnisse über den Einfluss von Östrogenen auf das zelluläre Immunsystem vor. Diese sind spezie- und konzentrationsabhängig, zeigen widersprüchliche Ergebnisse in vitro und in vivo, während weitere Einflüsse, beispielsweise durch Progesteron, nicht ausgeschlossen werden können [187]. Bisher liegen keine Studien vor, welche die Rolle der Endothelzellen im Zusammenspiel mit Geschlechtshormonen und Immunsystem genauer untersuchen. Der Microarray bot erstmals die Möglichkeit eines Einblicks in diese komplexe Regulation, wobei der hormonelle Einfluss von Östrogen und Testosteron auf die basale Genexpression in den männlichen und weiblichen HUVEC als annähernd gleich eingestuft werden kann, so dass die sexspezifische Regulation immunologischer Prozesse unabhängig davon gemessen werden konnte. Diese ergab eine deutliche Überexpression von Genen immunologischer Prozesse in weiblichen Zellen. Erstaunlicherweise waren überwiegend Gene betroffen, welche in die zelluläre Immunantwort und in Entzündungsprozesse involviert sind, wie zum Beispiel Zelladhäsionsmoleküle, Interleukine und Faktoren mit Einfluss auf den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC). Der MHC ist ein wichtiger Bestandteil der Immunerkennung und als solcher über die Präsentation von Antigenen maßgeblich an der Unterscheidung „körpereigen“ versus „körperfremd“ beteiligt. Ist diese Funktion gestört, kommt es zu autoimmunen Erkrankungen. In einer Metaanalyse verschiedener Studien

konnten bestimmte Genvarianten des MHC als größter Risikofaktor für die Entwicklung des systemischen Lupus erythematoses, der überwiegend junge Frauen im gebärfähigen Alter betrifft, bestätigt werden. Bei der rheumatoiden Arthritis werden diese Varianten zu einem Drittel für das genetische Risiko der Erkrankung verantwortlich gemacht [188].

#### 4.3.2 Genetische Faktoren autoimmuner Erkrankungen

Für die Entstehung einer Autoimmunerkrankung ist die genetische Prädisposition entscheidend. Nicht die Krankheit selbst, sondern nur die Anfälligkeit für die Entwicklung einer Autoimmunerkrankung wird vererbt [189]. Erst im Zusammenspiel mit anderen Faktoren kommt es zur Ausprägung des individuellen Krankheitsbildes. Beispielsweise stammten Kinder, die von Diabetes mellitus Typ I betroffen waren, häufig von Müttern mit klassischen Autoimmunerkrankungen wie SLE oder Rheumatoider Arthritis [189].

Da Frauen, die an Hashimoto Thyroiditis, Primär biliärer Zirrhose oder Systemischer Sklerose leiden, häufiger X-monosomische Lymphozyten (Verlust des zweiten X-Chromosoms) im peripheren Blut aufweisen, wurde die Rolle des X-Chromosoms genauer untersucht [190].

Spolarics et al. sehen im doppelt vorhandenen X-Chromosom den entscheidenden Vorteil der Frau bei der Immunantwort. Während weiblichen Zellen beide elterlichen X-Chromosome zur Verfügung stehen, verfügen männliche Zellen nur über das maternale X. Bei den weiblichen Zellen entscheidet das Zufallsprinzip darüber, welches X aktiviert bzw. deaktiviert ist, und führt somit zu einem zellulären genetischen Mosaik, welches anpassungsfähiger auf die jeweiligen Anforderungen an das Gewebe reagieren kann. Insbesondere Polymorphismen immunologischer Signalwege, die häufig auf dem X-Chromosom kodiert sind, tragen durch diesen Mechanismus zur Optimierung der Immunantwort bei [191]. Erstaunlicherweise entgehen 15% der Gene des zweiten X-Chromosoms dieser Inaktivierung [192].

Ozbakan et al. untersuchten die Verteilungsmuster der zufälligen X-Inaktivierung bei der Systemischen Sklerose und stellten eine ungleiche Verteilung von 90:10 in den Zellen fest [193]. Ebenso zeigte die Autoimmunthyroiditis eine ungleiche Verteilung der zellulären X-Inaktivierung (80:20) [194]. Die Entstehung von

Autoimmunerkrankungen hängt eng mit der Biologie des weiblichen Zellmosaiks zusammen. Eine ungleiche oder aufgehobene Verteilung der X-Inaktivierung, wie beim Turner Syndrom (X0), prädisponiert das Auftreten immunologischer Störungen [195].

#### **4.3.3 Evolutionsbiologische Überlegungen**

Bereits in der Frühschwangerschaft besteht zwischen Mutter und Kind ein Zellaustausch in beide Richtungen [196], der unter der Geburt am stärksten ausgeprägt ist [197]. Das Überleben der fremden Zellen im Körper wird als Mikrochimärismus bezeichnet und mit dem Auslösen autoimmuner Erkrankungen in Zusammenhang gebracht [198]. Gleicher et al. vermuten, dass die erhöhte Morbidität von Frauen an Autoimmunerkrankungen der evolutionsbiologische Preis für eine erfolgreiche Reproduktion ist [168].

#### **4.4 Autoimmunerkrankungen und kardiovaskuläre Komorbidität**

Genetische und biologisch-physiologische Unterschiede scheinen bei Frauen ein deutlich geringeres kardiovaskuläres Risiko als bei altersgleichen Männern zu bedingen. Eine erhöhte Immunreaktivität der Frau könnte im Sinne einer Präkonditionierung des weiblichen Immunsystems ein möglicher Schutzmechanismus vor Arteriosklerose sein.

Offenbar begünstigen jedoch die gleichen Faktoren beim weiblichen Geschlecht ein häufigeres Auftreten von Autoimmunerkrankungen, die ihrerseits wiederum mit einem gesteigerten kardiovaskulären Risiko einhergehen.

Patienten, die an einer Autoimmunerkrankung leiden, haben ein signifikant höheres Risiko sowie eine erhöhte Prävalenz für kardiovaskuläre Erkrankungen. In einer prospektiven Kohortenstudie mit über 114 000 Teilnehmerinnen konnte gezeigt werden, dass Frauen mit rheumatoider Arthritis ein relatives Risiko von 2,0 hatten einen Herzinfarkt zu erleiden [199]. Junge Frauen, die von SLE betroffen sind, weisen ein 2,3-fach erhöhtes Risiko für einen akuten Myokardinfarkt im Vergleich zu Frauen der gleichen Altersgruppe auf [200]. Deshalb können diese beiden



Autoimmunerkrankungen auch als unabhängige Risikofaktoren für die Entstehung der Arteriosklerose gewertet werden [201, 202].

Pathogenetisch besteht über die Auslösung einer endothelialen Dysfunktion eine enge Verknüpfung zwischen der Entstehung von arteriosklerotischen Läsionen und autoimmunen Erkrankungen wie der RA oder SLE. So konnte bereits bei jungen Patienten, die an rheumatoider Arthritis erkrankt waren, jedoch bisher keine klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren aufwiesen, eine Schädigung der endothelialen Funktion nachgewiesen werden [203].

Auf molekularer Ebene spielen Sauerstoffradikale bei beiden Erkrankungen eine Schlüsselrolle. Sie können nicht nur für die Entstehung der Arteriosklerose, sondern auch für die Pathogenese autoimmuner Erkrankungen verantwortlich gemacht werden. Sauerstoffradikale aktivieren die Transkriptionsfaktoren von proinflammatorischen Zytokinen, sowie Zelladhäsionsmolekülen [204] und spielen eine wichtige Rolle bei der Induktion der Apoptose [205] - beide Vorgänge gelten als Schlüsselereignis zur Auslösung autoimmuner Erkrankungen. Im Falle des SLE wurde ein Zusammenhang der klinischen Manifestation mit der Produktion von  $O_2^-$  durch neutrophile Granulozyten festgestellt [206]. Ähnliches gilt für die RA [207].

Sexspezifische Daten haben ergeben, dass an rheumatoider Arthritis erkrankte Frauen ein 1,9-fach erhöhtes Risiko für die Entstehung einer Herzinsuffizienz gegenüber Nichtreumatikerinnen aufweisen, während erkrankte Männer nur 1,3-fach stärker betroffen sind [208]. Leider gibt es bisher keine sexspezifischen Daten zum Infarktrisiko bei männlichen und weiblichen Rheumapatienten.

Aufgrund der vielfältigen Interaktionen von inflammatorischen Komponenten mit RA-Medikamenten und kardiovaskulären Risikofaktoren ist eine individuelle Risikoabschätzung jedoch schwierig und bedarf weiterer klinischer Studien.

## 5 Zusammenfassung

Wir wollten der Frage nachgehen, ob es neben hormonellen Ursachen, einen Unterschied im Genexpressionsmuster kardiovaskulär relevanter Faktoren zwischen männlichem und weiblichem Geschlecht gibt.

Bei den Todesursachen in Deutschland stehen Herz-/Kreislaufkrankungen mit Abstand an erster Stelle. Dabei galten Herzinfarkt und die Entstehung der Arteriosklerose über lange Zeit als typische Männerkrankheiten, da Frauen bis zur Menopause in geringerem Ausmaß betroffen sind. Mit dem Beginn der Menopause steigt das Risiko einer Herz-Kreislauf-Erkrankung bei Frauen deutlich.

Um diesen sexspezifischen Unterschied zu erklären, existieren verschiedene Theorien, wie beispielsweise die Östrogentheorie. In tierexperimentellen Studien konnte östrogenvermittelt eine Vervielfachung der Aktivität antioxidativer Enzyme im Zusammenhang mit einer verlängerten Lebensspanne bei weiblichen Tieren nachgewiesen werden. Weiterhin wirken Östrogene antiinflammatorisch durch Hemmung der Endothelzellaktivierung, der Aktivierung inflammatorischer Transkriptionsfaktoren sowie Hemmung der Chemotaxis von Monozyten. Ihre antiatherogene Wirkung entfalten sie durch eine Verminderung der Ausschüttung von Wachstumsfaktoren der Makrophagen, der Proliferation und Migration glatter Muskelzellen sowie der Hemmung der Anhäufung von Schaumzellen in der Intima.

Wir untersuchten, ob es von Geburt an sexspezifische Unterschiede in der Genexpression gibt. Dazu isolierten wir RNA von weiblichen und männlichen venösen Nabelschnurzellen. HUVECs bieten gute Voraussetzungen, die unterschiedliche genetische Ausstattung von Männern und Frauen zu untersuchen, da gezeigt werden konnte, dass die Hormonkonzentrationen im Nabelschnurblut männlicher und weiblicher Feten nicht unterschiedlich sind.

Die Auswahl der zu untersuchenden Gene konzentrierte sich auf drei Bereiche:

1. Gene mit Einfluss auf die Vasoreaktivität
2. Gene mit Einfluss auf den oxidativen Status
3. Gene mit Einfluss auf die zelluläre Stressantwort

Mittels Realtime RT-PCR wurden die Genexpressionsraten von insgesamt 19 Genen gemessen. 17 davon zeigten keine differentielle Regulation zwischen männlichen und weiblichen HUVEC (eNOS und eNOS-Spliceprodukte, Caveolin-1,

Endothelin-1, ACE, SOD-1, SOD-2, Catalase, HMOX-1, GPX-3, NOX-4, p66<sup>shc</sup>, Hsp90, ICAM-1). Dagegen war das Gen p52+66<sup>shc</sup> bei den männlichen Zellen und das Gen Hsp70 bei den weiblichen Zellen signifikant hochreguliert.

Um einen umfassenderen Überblick über die genetischen Unterschiede zu erhalten, entschieden wir uns ein Whole Genome Array durchzuführen. In fünf Pools zu je vier RNA's konnten die Genexpressionsmuster der männlichen und weiblichen HUVEC miteinander verglichen werden. Der Array bestätigte zum größten Teil die Ergebnisse der Realtime RT-PCR. Darüber hinaus waren von den insgesamt 840 differentiell regulierten Genen 530 bei den weiblichen Zellen verstärkt exprimiert. Diese betrafen überwiegend Gene, die bei der zellulären Immunantwort und bei Entzündungsprozessen eine Rolle spielen. Die Ergebnisse des Array stützen die Annahme von einer erhöhten weiblichen Immunreaktivität. Diese könnte sich jedoch als zweischneidiges Schwert erweisen. Einerseits könnte damit die Voraussetzung für eine bessere Abwehr von Infektionskrankheiten und eine schnellere Antwort auf Entzündungsreaktionen, wie der Arteriosklerose, verbunden sein. Andererseits wissen wir, dass Frauen häufiger von Autoimmunerkrankungen betroffen sind und dadurch einen unabhängigen Risikofaktor für die Entstehung von Arteriosklerose aufweisen.

Zur Entstehung einer erhöhten Immunreaktivität gibt es verschiedene Erklärungsmodelle. Sowohl hormonelle, als auch genetische und evolutionsbiologische Überlegungen werden diskutiert. In dieser Untersuchung konnte erstmals gezeigt werden, dass weibliche HUVEC, unabhängig von einer hormonellen Regulation durch Östrogen sowie von äußeren Faktoren, eine erhöhte basale Expressionsrate für Gene immunologischer Signalwege aufweisen.

## 6 Abkürzungen und Symbole

°C	Grad Celsius
©	Urheberrecht
♀	weiblich
♂	männlich
β-ME	β-Mercaptoethanol
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
A	Adenin
ACE-1	Angiotensinkonvertierendes Enzym
Apo E	Apolipoprotein E
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATP	Adenosintri-phosphat
BH <sub>4</sub>	(6R)-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin
Bp	Basenpaar(e)
C	Cytosin
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
CCD	Charge-coupled device, Messung des Fluoreszenzanstiegs mit Hilfe einer speziellen Kamera
CD	Cluster of differentiation, immunphänotypische Oberflächenmerkmale von Zellen
cDNA	komplementäre DNA, entsteht nach reverser Transkription von RNA
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CO	Kohlenstoffmonoxid
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CSF	Colony stimulating factor, Kolonie-stimulierender Faktor
Ct	Threshold, Schwellenwert
Cu/ Zn	Kupfer/ Zink
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintri-phosphat
dCTP	Desoxycytosintri-phosphat
dGTP	Desoxyguanidintri-phosphat
DHEA	Dehydroepiandrosterone
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid, Desoxribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxynucleotidtri-phosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintri-phosphat
EC	Endothelial Cell
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EL	Erythrozytenlyse
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay

eNOS	endotheliale Nitric Oxide Synthase
ER ( $\beta$ )	Östrogenrezeptor ( $\beta$ )
ERE	Estrogen response element
ET	Endothelin
F	Forward, vorwärts
G	Gramm
G	Guanin
GPX	Glutathionperoxidase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HDL	High density Lipoprotein
HMOX-1	Hämoxygenase-1, Gen
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HO-1/-2	Hämoxygenase-1/-2
Hsp70	Hitzeschockprotein 70
Hsp90	Hitzeschockprotein 90
Hum.	Human, menschlich
HUVEC	Humane umbilikale venöse Endothelzellen
ICAM	Intrazelluläre Adhäsionsmoleküle
IGF	Insulin-like Growth Factor, insulinähnlicher Wachstumsfaktor
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL2-RG	Interleukin-2-Rezeptor $\gamma$
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
Kg	Kilogramm
K	Kalium
KHK	Koronare Herzkrankheit
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KOH	Kaliumlauge
LDL	Low Density Lipoprotein
Log	Logarithmus
M	Molar
mA	Milliampere
MAP	Mitogen activated Protein
MCF-7	Michigan Cancer Foundation, hormonabhängige humane Mammakarzinomzelllinie
MCP-1	Monozyten-chemoattractant Protein-1
Mg	Milligramm
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
MHC	Major Histocompatibility Complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
Min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar

Mm	Millimeter
MMLV	Molony murine leukemia virus
mmol/l	Millimol pro Liter
Mn	Mangan
mRNA	messenger RNA
MW	Mittelwert
N	Number, Anzahl
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NaOH	Natronlauge
Ng	Nanogramm
Nm	Nanometer
nmol/l	Nanomol pro Liter
NO	Stickstoffmonoxid
NOX	NAD(P)H-Oxidase
Nt	Nukleotid(e)
NTC	No template control, Probe ohne DNA
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxid
OD	Optische Dichte
Oligo-d(T)	Oligodesoxythymidin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration in mol/l
poly-A	Polyadenyl-
R	Reverse, rückwärts
RA	Rheumatoide Arthritis
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron System
Ras	Rat sarcoma, Protoonkogen
RIN	RNA integrity number, Bestimmung der RNA Integrität
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuclease
ROS	Reactive oxygen species, Sauerstoffradikale
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
Sec	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Shc	Src-homology protein A
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
SNP	Single Nucleotid Polymorphism, Einzelnukleotidpolymorphismen
SOD	Superoxiddismutase
SRY	Sex determining region of Y, geschlechtsbestimmende Region des Y-Chromosoms
STAT5	signal transducer and activator of transcription 5
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA
TDF	Testes determining factor, Hoden determinierender Faktor

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
T-Lymphozyt	Thymus-abhängiger Lymphozyt
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Units
UPM	Universal-Primer-Mix
UV	Ultraviolett
V.	Vena, Vene
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VSMC	Vascular smooth muscle cell, glatte Gefäßmuskelzelle
WHO	World Health Organisation

---

## 7 Literaturverzeichnis

1. Löwel, H., et al., *Koronare Herzkrankheit und akuter Myokardinfarkt*. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. 2006, Berlin: Robert Koch-Institut. p38.
2. MacKay, J. and G.A. Mensah, *The Atlas of Heart Disease and Stroke*. Vol. 1. 2004: Nonserial Publication World Health Organization. p112.
3. Yusuf, S., et al., *Global burden of cardiovascular diseases: part I: general considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization*. *Circulation*, 2001. **104**(22): p. 2746-53.
4. Holm, K., et al., *Coronary artery disease in women: assessment, diagnosis, intervention, and strategies for life style change*. *AWHONNS Clin Issues Perinat Womens Health Nurs*, 1993. **4**(2): p. 272-85.
5. Kannel, W.B., *The Framingham Study: historical insight on the impact of cardiovascular risk factors in men versus women*. *J Gend Specif Med*, 2002. **5**(2): p. 27-37.
6. Bello, N. and L. Mosca, *Epidemiology of coronary heart disease in women*. *Prog Cardiovasc Dis*, 2004. **46**(4): p. 287-95.
7. Harman, D., *The aging process: major risk factor for disease and death*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(12): p. 5360-3.
8. Kuulasmaa, K., et al., *Estimation of contribution of changes in classic risk factors to trends in coronary-event rates across the WHO MONICA Project populations*. *Lancet*, 2000. **355**(9205): p. 675-87.
9. Enriquez, J.R., et al., *Women tolerate drug therapy for coronary artery disease as well as men do, but are treated less frequently with aspirin, beta-blockers, or statins*. *Gend Med*, 2008. **5**(1): p. 53-61.
10. Golan, L., et al., *Tobacco use amongst high school students in the Czech Republic*. *Cent Eur J Public Health*, 2004. **12**(1): p. 32-5.
11. Njolstad, I., E. Arnesen, and P.G. Lund-Larsen, *Smoking, serum lipids, blood pressure, and sex differences in myocardial infarction. A 12-year follow-up of the Finnmark Study*. *Circulation*, 1996. **93**(3): p. 450-6.
12. Ohwada, H.I. and T. Nakayama, *Smoking patterns of university woman students in Miyagi, Japan: the Miyagaku Study*. *J Epidemiol*, 2003. **13**(6): p. 296-302.
13. Nessa, A., S.A. Latif, and N.I. Siddiqui, *Risk of cardiovascular diseases with oral contraceptives*. *Mymensingh Med J*, 2006. **15**(2): p. 220-4.
14. Hermanson, B., et al., *Beneficial six-year outcome of smoking cessation in older men and women with coronary artery disease. Results from the CASS registry*. *N Engl J Med*, 1988. **319**(21): p. 1365-9.
15. Kuhn, F.E. and C.E. Rackley, *Coronary artery disease in women. Risk factors, evaluation, treatment, and prevention*. *Arch Intern Med*, 1993. **153**(23): p. 2626-36.



- 
16. Rich-Edwards, J.W., et al., *The primary prevention of coronary heart disease in women*. N Engl J Med, 1995. **332**(26): p. 1758-66.
  17. Jousilahti, P., et al., *Sex, age, cardiovascular risk factors, and coronary heart disease: a prospective follow-up study of 14 786 middle-aged men and women in Finland*. Circulation, 1999. **99**(9): p. 1165-72.
  18. Haynes, S.G. and M. Feinleib, *Women, work and coronary heart disease: prospective findings from the Framingham heart study*. Am J Public Health, 1980. **70**(2): p. 133-41.
  19. Kritz-Silverstein, D., D.L. Wingard, and E. Barrett-Connor, *Employment status and heart disease risk factors in middle-aged women: the Rancho Bernardo Study*. Am J Public Health, 1992. **82**(2): p. 215-9.
  20. Haertel, U., et al., *Cross-sectional and longitudinal associations between high density lipoprotein cholesterol and women's employment*. Am J Epidemiol, 1992. **135**(1): p. 68-78.
  21. Berkman, L.F. and S.L. Syme, *Social networks, host resistance, and mortality: a nine-year follow-up study of Alameda County residents*. Am J Epidemiol, 1979. **109**(2): p. 186-204.
  22. Hu, Y.R. and N. Goldman, *Mortality differentials by marital status: an international comparison*. Demography, 1990. **27**(2): p. 233-50.
  23. Perlman, J.A., et al., *Cardiovascular risk factors, premature heart disease, and all-cause mortality in a cohort of northern California women*. Am J Obstet Gynecol, 1988. **158**(6 Pt 2): p. 1568-74.
  24. Gorodeski, G.I., *Update on cardiovascular disease in post-menopausal women*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2002. **16**(3): p. 329-55.
  25. Wassertheil-Smoller, S., et al., *Hypertension and its treatment in postmenopausal women: baseline data from the Women's Health Initiative*. Hypertension, 2000. **36**(5): p. 780-9.
  26. Johnson, C.L., et al., *Declining serum total cholesterol levels among US adults. The National Health and Nutrition Examination Surveys*. Jama, 1993. **269**(23): p. 3002-8.
  27. Pilote, L., et al., *A comprehensive view of sex-specific issues related to cardiovascular disease*. Cmaj, 2007. **176**(6): p. S1-44.
  28. Bass, K.M., et al., *Plasma lipoprotein levels as predictors of cardiovascular death in women*. Arch Intern Med, 1993. **153**(19): p. 2209-16.
  29. Kanaya, A.M., D. Grady, and E. Barrett-Connor, *Explaining the sex difference in coronary heart disease mortality among patients with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis*. Arch Intern Med, 2002. **162**(15): p. 1737-45.
  30. Huxley, R., F. Barzi, and M. Woodward, *Excess risk of fatal coronary heart disease associated with diabetes in men and women: meta-analysis of 37 prospective cohort studies*. BMJ, 2006. **332**(7533): p. 73-8.
  31. Steinberg, H.O., et al., *Type II diabetes abrogates sex differences in endothelial function in premenopausal women*. Circulation, 2000. **101**(17): p. 2040-6.

- 
32. Sowers, J.R., *Insulin and insulin-like growth factor in normal and pathological cardiovascular physiology*. Hypertension, 1997. **29**(3): p. 691-9.
  33. Rosano, G.M. and M. Fini, *Postmenopausal women and cardiovascular risk: impact of hormone replacement therapy*. Cardiol Rev, 2002. **10**(1): p. 51-60.
  34. Kannel, W.B., et al., *Menopause and risk of cardiovascular disease: the Framingham study*. Ann Intern Med, 1976. **85**(4): p. 447-52.
  35. Mendelsohn, M.E., *Mechanisms of estrogen action in the cardiovascular system*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2000. **74**(5): p. 337-43.
  36. Chen, Z., et al., *Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen*. J Clin Invest, 1999. **103**(3): p. 401-6.
  37. Pappas, T.C., B. Gametchu, and C.S. Watson, *Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding*. Faseb J, 1995. **9**(5): p. 404-10.
  38. Rosano, G.M., et al., *Beneficial effect of oestrogen on exercise-induced myocardial ischaemia in women with coronary artery disease*. Lancet, 1993. **342**(8864): p. 133-6.
  39. Collins, P., et al., *17 beta-Estradiol attenuates acetylcholine-induced coronary arterial constriction in women but not men with coronary heart disease*. Circulation, 1995. **92**(1): p. 24-30.
  40. de Aloysio, D., et al., *The effect of menopause on blood lipid and lipoprotein levels. The Icarus Study Group*. Atherosclerosis, 1999. **147**(1): p. 147-53.
  41. Lobo, R.A., et al., *Effects of lower doses of conjugated equine estrogens and medroxyprogesterone acetate on plasma lipids and lipoproteins, coagulation factors, and carbohydrate metabolism*. Fertil Steril, 2001. **76**(1): p. 13-24.
  42. Grodstein, F., et al., *Postmenopausal hormone therapy and mortality*. N Engl J Med, 1997. **336**(25): p. 1769-75.
  43. Rossouw, J.E., et al., *Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial*. JAMA, 2002. **288**(3): p. 321-33.
  44. Hsia, J., et al., *Conjugated equine estrogens and coronary heart disease: the Women's Health Initiative*. Arch Intern Med, 2006. **166**(3): p. 357-65.
  45. Kalin, M.F. and B. Zumoff, *Sex hormones and coronary disease: a review of the clinical studies*. Steroids, 1990. **55**(8): p. 330-52.
  46. Escobar, V., et al., *The human X-chromosome and the levels of serum immunoglobulin M*. Clin Genet, 1979. **15**(3): p. 221-7.
  47. Yang, X., et al., *Tissue-specific expression and regulation of sexually dimorphic genes in mice*. Genome Res, 2006. **16**(8): p. 995-1004.
  48. Toth, B., et al., *Human umbilical vascular endothelial cells express estrogen receptor beta (ERbeta) and progesterone receptor A (PR-A), but not ERalpha and PR-B*. Histochem Cell Biol, 2008 **130** (2): p399-405.

- 
49. Merchant-Larios, H. and N. Moreno-Mendoza, *Onset of sex differentiation: dialog between genes and cells*. Arch Med Res, 2001. **32**(6): p. 553-8.
  50. Jost, A., et al., *Studies on sex differentiation in mammals*. Recent Prog Horm Res, 1973. **29**: p. 1-41.
  51. Sinclair, A.H., *Human sex determination*. J Exp Zool, 1998. **281**(5): p. 501-5.
  52. Furuhashi, N., et al., *Concentrations of luteinizing hormone--human chorionic gonadotropin, beta subunit of human chorionic gonadotropin, follicle-stimulating hormone, estradiol, cortisol, and testosterone in cord sera and their correlations*. Am J Obstet Gynecol, 1982. **143**(8): p. 918-21.
  53. Herruzo, A.J., et al., *Sex differences in serum hormone levels in umbilical vein blood*. Int J Gynaecol Obstet, 1993. **41**(1): p. 37-41.
  54. Maccoby, E.E., et al., *Concentrations of sex hormones in umbilical-cord blood: their relation to sex and birth order of infants*. Child Dev, 1979. **50**(3): p. 632-42.
  55. Vatten, L.J., et al., *Alpha-foetoprotein in umbilical cord in relation to severe pre-eclampsia, birth weight and future breast cancer risk*. Br J Cancer, 2002. **86**(5): p. 728-31.
  56. Yuen, B.H. and E.K. Mincey, *Human chorionic gonadotropin, prolactin, estriol, and dehydroepiandrosterone sulfate concentrations in cord blood of premature and term newborn infants: relationship to the sex of the neonate*. Am J Obstet Gynecol, 1987. **156**(2): p. 396-400.
  57. Tapanainen, J., et al., *Hormonal changes during the perinatal period: FSH, prolactin and some steroid hormones in the cord blood and peripheral serum of preterm and fullterm female infants*. J Steroid Biochem, 1984. **20**(5): p. 1153-6.
  58. Huhtaniemi, I., M. Ikonen, and R. Vihko, *Presence of testosterone and other neutral steroids in human fetal testes*. Biochem Biophys Res Commun, 1970. **38**(4): p. 715-20.
  59. Tapanainen, J., et al., *Age-related changes in endogenous steroids of human fetal testis during early and midpregnancy*. J Clin Endocrinol Metab, 1981. **52**(1): p. 98-102.
  60. van de Beek, C., et al., *Relationships between sex hormones assessed in amniotic fluid, and maternal and umbilical cord serum: what is the best source of information to investigate the effects of fetal hormonal exposure?* Horm Behav, 2004. **46**(5): p. 663-9.
  61. Rainey, W.E., K.S. Rehman, and B.R. Carr, *The human fetal adrenal: making adrenal androgens for placental estrogens*. Semin Reprod Med, 2004. **22**(4): p. 327-36.
  62. Lasiene, K., et al., *[Human Y chromosome: structure and biological role]*. Medicina (Kaunas), 2006. **42**(11): p. 871-6.
  63. Quintana-Murci, L. and M. Fellous, *The Human Y Chromosome: The Biological Role of a "Functional Wasteland"*. J Biomed Biotechnol, 2001. **1**(1): p. 18-24.
  64. Albrecht, E.W., et al., *Protective role of endothelial nitric oxide synthase*. J Pathol, 2003. **199**(1): p. 8-17.
  65. Lorenz, M., et al., *Alternative splicing in intron 13 of the human eNOS gene: a potential mechanism for regulating eNOS activity*. Faseb J, 2007. **21**(7): p. 1556-64.

- 
66. Murata, M., et al., *VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(22): p. 10339-43.
  67. Xu, Y., et al., *Caveolae and endothelial dysfunction: filling the caves in cardiovascular disease*. Eur J Pharmacol, 2008. **585**(2-3): p. 256-60.
  68. Lavallee, M., et al., *Crosstalk between endothelin and nitric oxide in the control of vascular tone*. Heart Fail Rev, 2001. **6**(4): p. 265-76.
  69. Haynes, W.G., et al., *Forearm vasoconstriction to endothelin-1 is mediated by ETA and ETB receptors in vivo in humans*. J Cardiovasc Pharmacol, 1995. **26 Suppl 3**: p. S40-3.
  70. Miyauchi, T. and T. Masaki, *Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system*. Annu Rev Physiol, 1999. **61**: p. 391-415.
  71. Luscher, T.F. and M. Barton, *Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs*. Circulation, 2000. **102**(19): p. 2434-40.
  72. Miao, L. and D.K. Clair, *Regulation of Superoxide Dismutase Genes: Implications in Diseases*. Free Radic Biol Med, 2009 epub, ahead of print.
  73. Peterson, S.J. and W.H. Frishman, *Targeting heme oxygenase: therapeutic implications for diseases of the cardiovascular system*. Cardiol Rev, 2009. **17**(3): p. 99-111.
  74. Brigelius-Flohe, R., *Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors*. Biol Chem, 2006. **387**(10-11): p. 1329-35.
  75. Griending, K.K., D. Sorescu, and M. Ushio-Fukai, *NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease*. Circ Res, 2000. **86**(5): p. 494-501.
  76. Cai, H., *Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences*. Cardiovasc Res, 2005. **68**(1): p. 26-36.
  77. Virdis, A., et al., *Role of NAD(P)H oxidase on vascular alterations in angiotensin II-infused mice*. J Hypertens, 2004. **22**(3): p. 535-42.
  78. Cosentino, F., et al., *Final common molecular pathways of aging and cardiovascular disease: role of the p66Shc protein*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(4): p. 622-8.
  79. Trinei, M., et al., *A p53-p66Shc signalling pathway controls intracellular redox status, levels of oxidation-damaged DNA and oxidative stress-induced apoptosis*. Oncogene, 2002. **21**(24): p. 3872-8.
  80. Migliaccio, E., et al., *The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals*. Nature, 1999. **402**(6759): p. 309-13.
  81. Yellon, D.M. and D.S. Latchman, *Stress proteins and myocardial protection*. J Mol Cell Cardiol, 1992. **24**(2): p. 113-24.
  82. Trost, S.U., et al., *Protection against myocardial dysfunction after a brief ischemic period in transgenic mice expressing inducible heat shock protein 70*. J Clin Invest, 1998. **101**(4): p. 855-62.
  83. Garcia-Cardena, G., et al., *Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90*. Nature, 1998. **392**(6678): p. 821-4.

- 
84. Davies, M.J., et al., *The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis*. J Pathol, 1993. **171**(3): p. 223-9.
  85. Palmer, R.M., A.G. Ferrige, and S. Moncada, *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor*. Nature, 1987. **327**(6122): p. 524-6.
  86. Chambliss, K.L., et al., *Estrogen receptor alpha and endothelial nitric oxide synthase are organized into a functional signaling module in caveolae*. Circ Res, 2000. **87**(11): p. E44-52.
  87. Haynes, M.P., et al., *Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells*. Circ Res, 2000. **87**(8): p. 677-82.
  88. Stangl, K., et al., *High CA repeat numbers in intron 13 of the endothelial nitric oxide synthase gene and increased risk of coronary artery disease*. Pharmacogenetics, 2000. **10**(2): p. 133-40.
  89. Rothberg, K.G., et al., *Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats*. Cell, 1992. **68**(4): p. 673-82.
  90. Drab, M., et al., *Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice*. Science, 2001. **293**(5539): p. 2449-52.
  91. Razani, B., et al., *Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities*. J Biol Chem, 2001. **276**(41): p. 38121-38.
  92. Frank, P.G., et al., *Genetic ablation of caveolin-1 confers protection against atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(1): p. 98-105.
  93. Gratton, J.P., P. Bernatchez, and W.C. Sessa, *Caveolae and caveolins in the cardiovascular system*. Circ Res, 2004. **94**(11): p. 1408-17.
  94. Haynes, W.G. and D.J. Webb, *Contribution of endogenous generation of endothelin-1 to basal vascular tone*. Lancet, 1994. **344**(8926): p. 852-4.
  95. Dhaun, N., J. Goddard, and D.J. Webb, *The endothelin system and its antagonism in chronic kidney disease*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(4): p. 943-55.
  96. Amiri, F., et al., *Endothelium-restricted overexpression of human endothelin-1 causes vascular remodeling and endothelial dysfunction*. Circulation, 2004. **110**(15): p. 2233-40.
  97. Miyauchi, T., et al., *Increased plasma concentrations of endothelin-1 and big endothelin-1 in acute myocardial infarction*. Lancet, 1989. **2**(8653): p. 53-4.
  98. Lerman, A., et al., *Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis*. N Engl J Med, 1991. **325**(14): p. 997-1001.
  99. Wei, C.M., et al., *Endothelin in human congestive heart failure*. Circulation, 1994. **89**(4): p. 1580-6.
  100. Kanaya, A.M., E. Barrett-Connor, and C.L. Wassel Fyr, *Endothelin-1 and prevalent coronary heart disease in older men and women (the Rancho Bernardo Study)*. Am J Cardiol, 2007. **99**(4): p. 486-90.

- 
101. Bechtloff, R., et al., *Gender and age-dependent differences in the bradykinin-degradation within the pericardial fluid of patients with coronary artery disease*. *Int J Cardiol*, 2009.
  102. Prime, D.D., K.B. Brosnihan, and D.M. Herrington, *Effects of hormone therapy on blood pressure and the renin-angiotensin system in postmenopausal women*. *Minerva Cardioangiol*, 2007. **55**(4): p. 477-85.
  103. Hudson, M., et al., *Sex differences in the effectiveness of angiotensin receptor blockers and angiotensin converting enzyme inhibitors in patients with congestive heart failure--a population study*. *Eur J Heart Fail*, 2007. **9**(6-7): p. 602-9.
  104. Jeunemaitre, X., *Genetics of the human renin angiotensin system*. *J Mol Med*, 2008. **86**(6): p. 637-41.
  105. Brandes, R.P. and A. Mugge, *Gender differences in the generation of superoxide anions in the rat aorta*. *Life Sci*, 1997. **60**(6): p. 391-6.
  106. Lacy, F., et al., *Plasma hydrogen peroxide production in human essential hypertension: role of heredity, gender, and ethnicity*. *Hypertension*, 2000. **36**(5): p. 878-84.
  107. Sartori-Valinotti, J.C., et al., *Sex differences in oxidative stress and the impact on blood pressure control and cardiovascular disease*. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2007. **34**(9): p. 938-45.
  108. Fortepiani, L.A., and J.F. Reckelhoff, *Increasing oxidative stress with molsidomine increases blood pressure in genetically hypertensive rats but not normotensive controls*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005. **289**(3): p. R763-70.
  109. Sullivan, J.C., J.M. Sasser, and J.S. Pollock, *Sexual dimorphism in oxidant status in spontaneously hypertensive rats*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2007. **292**(2): p. R764-8.
  110. Vina, J., et al., *Why females live longer than males? Importance of the upregulation of longevity-associated genes by oestrogenic compounds*. *FEBS Lett*, 2005. **579**(12): p. 2541-5.
  111. Strehlow, K., et al., *Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen*. *Circ Res*, 2003. **93**(2): p. 170-7.
  112. Unfer, T.C., et al., *Influence of hormone replacement therapy on blood antioxidant enzymes in menopausal women*. *Clin Chim Acta*, 2006. **369**(1): p. 73-7.
  113. Fujimoto, H., H. Kobayashi, and M. Ohno, *Age-Induced Reduction in Mitochondrial Manganese Superoxide Dismutase Activity and Tolerance of Macrophages Against Apoptosis Induced by Oxidized Low Density Lipoprotein*. *Circ J*, 2009.
  114. Guemouri, L., et al., *Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood*. *Clin Chem*, 1991. **37**(11): p. 1932-7.
  115. Ho, S.P., et al., *Antioxidant enzyme activities in healthy Chinese adults: influence of age, gender and smoking*. *Respirology*, 2005. **10**(3): p. 305-9.
  116. Pialoux, V., et al., *Effect of cardiorespiratory fitness on vascular regulation and oxidative stress in postmenopausal women*. *Hypertension*, 2009. **54**(5): p. 1014-20.

- 
117. Azevedo, R.B., et al., *Regulation of antioxidant enzyme activities in male and female rat macrophages by sex steroids*. Braz J Med Biol Res, 2001. **34**(5): p. 683-7.
  118. Mariani, E., et al., *Antioxidant enzyme activities in healthy old subjects: influence of age, gender and zinc status: results from the Zincage Project*. Biogerontology, 2006. **7**(5-6): p. 391-8.
  119. Duckers, H.J., et al., *Heme oxygenase-1 protects against vascular constriction and proliferation*. Nat Med, 2001. **7**(6): p. 693-8.
  120. Poss, K.D. and S. Tonegawa, *Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(20): p. 10925-30.
  121. Ono, K., T. Mannami, and N. Iwai, *Association of a promoter variant of the haeme oxygenase-1 gene with hypertension in women*. J Hypertens, 2003. **21**(8): p. 1497-503.
  122. Paravicini, T.M., and R.M. Touyz, *NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities*. Diabetes Care, 2008. **31** Suppl 2: p. S170-80.
  123. Seshiah, P.N., et al., *Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators*. Circ Res, 2002. **91**(5): p. 406-13.
  124. Miller, A.A., et al., *Effect of gender on NADPH-oxidase activity, expression, and function in the cerebral circulation: role of estrogen*. Stroke, 2007. **38**(7): p. 2142-9.
  125. Wagner, A.H., M.R. Schroeter, and M. Hecker, *17beta-estradiol inhibition of NADPH oxidase expression in human endothelial cells*. Faseb J, 2001. **15**(12): p. 2121-30.
  126. Moe, K.T., et al., *Differential upregulation of Nox homologues of NADPH oxidase by tumor necrosis factor-alpha in human aortic smooth muscle and embryonic kidney cells*. J Cell Mol Med, 2006. **10**(1): p. 231-9.
  127. Mahadev, K., et al., *The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and plays an integral role in insulin signal transduction*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(5): p. 1844-54.
  128. Lyon, D., et al., *Integrated Review of Cytokines in Maternal, Cord, and Newborn Blood: Part I--Associations With Preterm Birth*. Biol Res Nurs, 2009.
  129. Migliaccio, E., et al., *Opposite effects of the p52shc/p46shc and p66shc splicing isoforms on the EGF receptor-MAP kinase-fos signalling pathway*. Embo J, 1997. **16**(4): p. 706-16.
  130. Xi, G., X. Shen, and D.R. Clemmons, *p66shc negatively regulates insulin-like growth factor I signal transduction via inhibition of p52shc binding to Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate-1 leading to impaired growth factor receptor-bound protein-2 membrane recruitment*. Mol Endocrinol, 2008. **22**(9): p. 2162-75.
  131. Nemoto, S., et al., *The mammalian longevity-associated gene product p66shc regulates mitochondrial metabolism*. J Biol Chem, 2006. **281**(15): p. 10555-60.
  132. Finkel, T., and N.J. Holbrook, *Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing*. Nature, 2000. **408**(6809): p. 239-47.

- 
133. Napoli, C., et al., *Deletion of the p66Shc longevity gene reduces systemic and tissue oxidative stress, vascular cell apoptosis, and early atherogenesis in mice fed a high-fat diet*. Proc Natl Acad Sci USA, 2003. **100**(4): p. 2112-6.
  134. Lee, S.K., et al., *Alteration of p66shc is associated with endothelial dysfunction in the abdominal aortic coarctation of rats*. FEBS Lett, 2008. **582**(17): p. 2561-6.
  135. Lee, M.S., et al., *p66Shc protein is upregulated by steroid hormones in hormone-sensitive cancer cells and in primary prostate carcinomas*. Int J Cancer, 2004. **108**(5): p. 672-8.
  136. Wegele, H., L. Muller, and J. Buchner, *Hsp70 and Hsp90--a relay team for protein folding*. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 2004. **151**: p. 1-44.
  137. Russell, K.S., et al., *Estrogen stimulates heat shock protein 90 binding to endothelial nitric oxide synthase in human vascular endothelial cells. Effects on calcium sensitivity and NO release*. J Biol Chem, 2000. **275**(7): p. 5026-30.
  138. Wang, M., et al., *Sex differences in the myocardial inflammatory response to ischemia-reperfusion injury*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005. **288**(2): p. E321-6.
  139. Zhai, P., et al., *Effect of estrogen on global myocardial ischemia-reperfusion injury in female rats*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **279**(6): p. H2766-75.
  140. Voss, M.R., et al., *Gender differences in the expression of heat shock proteins: the effect of estrogen*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **285**(2): p. H687-92.
  141. Kohno, H., et al., *Receptor-mediated suppression of cardiac heat-shock protein 72 expression by testosterone in male rat heart*. Endocrinology, 2007. **148**(7): p. 3148-55.
  142. Lawson, C. and S. Wolf, *ICAM-1 signaling in endothelial cells*. Pharmacol Rep, 2009. **61**(1): p. 22-32.
  143. Ponthieux, A., et al., *Biological determinants of serum ICAM-1, E-selectin, P-selectin and L-selectin levels in healthy subjects: the Stanislas study*. Atherosclerosis, 2004. **172**(2): p. 299-308.
  144. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
  145. Kressel, G., et al., *Systemic and vascular markers of inflammation in relation to metabolic syndrome and insulin resistance in adults with elevated atherosclerosis risk*. Atherosclerosis, 2008 **202** (1): 263-71.
  146. Jenny, N.S., et al., *Soluble intracellular adhesion molecule-1 is associated with cardiovascular disease risk and mortality in older adults*. J Thromb Haemost, 2006. **4**(1): p. 107-13.
  147. Zakai, N.A., et al., *Inflammation and hemostasis biomarkers and cardiovascular risk in the elderly: the Cardiovascular Health Study*. J Thromb Haemost, 2007. **5**(6): p. 1128-35.
  148. Albert, M.A., et al., *Differential effect of soluble intercellular adhesion molecule-1 on the progression of atherosclerosis as compared to arterial thrombosis: a prospective analysis of the Women's Health Study*. Atherosclerosis, 2008. **197**(1): p. 297-302.



- 
149. Scarabin, P.Y., et al., *Hormone replacement therapy and circulating ICAM-1 in postmenopausal women--a randomised controlled trial*. *Thromb Haemost*, 1999. **81**(5): p. 673-5.
  150. Van Baal, W.M., et al., *Short-term hormone replacement therapy: reduced plasma levels of soluble adhesion molecules*. *Eur J Clin Invest*, 1999. **29**(11): p. 913-21.
  151. Salas-Salvado, J., et al., *Components of the Mediterranean-type food pattern and serum inflammatory markers among patients at high risk for cardiovascular disease*. *Eur J Clin Nutr*, 2008. **62**(5): p. 651-9.
  152. Demerath, E., et al., *The relationship of soluble ICAM-1, VCAM-1, P-selectin and E-selectin to cardiovascular disease risk factors in healthy men and women*. *Ann Hum Biol*, 2001. **28**(6): p. 664-78.
  153. Habek, D., et al., *Fetal tobacco syndrome and perinatal outcome*. *Fetal Diagn Ther*, 2002. **17**(6): p. 367-71.
  154. Andersen, M.R., L.R. Walker, and S. Stender, *Reduced endothelial nitric oxide synthase activity and concentration in fetal umbilical veins from maternal cigarette smokers*. *Am J Obstet Gynecol*, 2004. **191**(1): p. 346-51.
  155. Valsamakis, G., et al., *Causes of intrauterine growth restriction and the postnatal development of the metabolic syndrome*. *Ann N Y Acad Sci*, 2006. **1092**: p. 138-47.
  156. Barker, D.J., et al., *Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth*. *Diabetologia*, 1993. **36**(1): p. 62-7.
  157. Barford, A., et al., *Life expectancy: women now on top everywhere*. *BMJ*, 2006. **332**(7545): p. 808.
  158. Laapotti, S. and E. Keskinen, *Differences in fatal loss-of-control accidents between young male and female drivers*. *Accid Anal Prev*, 1998. **30**(4): p. 435-42.
  159. Drevenstedt, G.L., et al., *The rise and fall of excess male infant mortality*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(13): p. 5016-21.
  160. Read, J.S., J.F. Troendle, and M.A. Klebanoff, *Infectious disease mortality among infants in the United States, 1983 through 1987*. *Am J Public Health*, 1997. **87**(2): p. 192-8.
  161. Bouman, A., M.J. Heineman, and M.M. Faas, *Sex hormones and the immune response in humans*. *Hum Reprod Update*, 2005. **11**(4): p. 411-23.
  162. Schroder, J., et al., *Gender differences in human sepsis*. *Arch Surg*, 1998. **133**(11): p. 1200-5.
  163. Eiding, D. and T.J. Garrett, *Studies of the regulatory effects of the sex hormones on antibody formation and stem cell differentiation*. *J Exp Med*, 1972. **136**(5): p. 1098-116.
  164. Daniels, C.W. and M. Belosevic, *Serum antibody responses by male and female C57Bl/6 mice infected with Giardia muris*. *Clin Exp Immunol*, 1994. **97**(3): p. 424-9.

- 
165. Fox, A.A. and N.A. Nussmeier, *Does gender influence the likelihood or types of complications following cardiac surgery?* Semin Cardiothorac Vasc Anesth, 2004. **8**(4): p. 283-95.
  166. Ridker, P.M., et al., *Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men.* N Engl J Med, 1997. **336**(14): p. 973-9.
  167. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis.* Nature, 2002. **420**(6917): p. 868-74.
  168. Gleicher, N. and D.H. Barad, *Gender as risk factor for autoimmune diseases.* J Autoimmun, 2007. **28**(1): p. 1-6.
  169. Confavreux, C., et al., *Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. Pregnancy in Multiple Sclerosis Group.* N Engl J Med, 1998. **339**(5): p. 285-91.
  170. Sherwin, B.B., *Estrogen and cognitive aging in women.* Trends Pharmacol Sci, 2002. **23**(11): p. 527-34.
  171. Beeson, P.B., *Age and sex associations of 40 autoimmune diseases.* Am J Med, 1994. **96**(5): p. 457-62.
  172. Yacoub Wasef, S.Z., *Gender differences in systemic lupus erythematosus.* Gend Med, 2004. **1**(1): p. 12-7.
  173. Zandman-Goddard, G., E. Peeva, and Y. Shoenfeld, *Gender and autoimmunity.* Autoimmun Rev, 2007. **6**(6): p. 366-72.
  174. Tengstrand, B., et al., *Abnormal levels of serum dehydroepiandrosterone, estrone, and estradiol in men with rheumatoid arthritis: high correlation between serum estradiol and current degree of inflammation.* J Rheumatol, 2003. **30**(11): p. 2338-43.
  175. Cutolo, M., et al., *Anti-TNF and sex hormones.* Ann N Y Acad Sci, 2006. **1069**: p. 391-400.
  176. de Man, Y.A., et al., *Disease activity of rheumatoid arthritis during pregnancy: Results from a nationwide prospective study.* Arthritis Rheum, 2008. **59**(9): p. 1241-8.
  177. Carlsten, H., *Immune responses and bone loss: the estrogen connection.* Immunol Rev, 2005. **208**: p. 194-206.
  178. Kanda, N. and K. Tamaki, *Estrogen enhances immunoglobulin production by human PBMCs.* J Allergy Clin Immunol, 1999. **103**(2 Pt 1): p. 282-8.
  179. Kanda, N., T. Tsuchida, and K. Tamaki, *Testosterone inhibits immunoglobulin production by human peripheral blood mononuclear cells.* Clin Exp Immunol, 1996. **106**(2): p. 410-5.
  180. Pervin, S., et al., *Estradiol suppresses MCP-1 expression In vivo : implications for atherosclerosis.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. **18**(10): p. 1575-82.
  181. Miller, A.P., et al., *Estrogen modulates inflammatory mediator expression and neutrophil chemotaxis in injured arteries.* Circulation, 2004. **110**(12): p. 1664-9.
  182. Rachon, D., et al., *Effects of oestrogen deprivation on interleukin-6 production by peripheral blood mononuclear cells of postmenopausal women.* J Endocrinol, 2002. **172**(2): p. 387-95.

- 
183. Li, P., et al., *Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock*. Cell, 1995. **80**(3): p. 401-11.
184. Hu, S.K., Y.L. Mitcho, and N.C. Rath, *Effect of estradiol on interleukin 1 synthesis by macrophages*. Int J Immunopharmacol, 1988. **10**(3): p. 247-52.
185. Lynch, E.A., C.A. Dinarello, and J.G. Cannon, *Gender differences in IL-1 alpha, IL-1 beta, and IL-1 receptor antagonist secretion from mononuclear cells and urinary excretion*. J Immunol, 1994. **153**(1): p. 300-6.
186. Chaouat, G., et al., *TH1/TH2 paradigm in pregnancy: paradigm lost? Cytokines in pregnancy/early abortion: reexamining the TH1/TH2 paradigm*. Int Arch Allergy Immunol, 2004. **134**(2): p. 93-119.
187. Morishita, M., M. Miyagi, and Y. Iwamoto, *Effects of sex hormones on production of interleukin-1 by human peripheral monocytes*. J Periodontol, 1999. **70**(7): p. 757-60.
188. Fernando, M.M., et al., *Defining the role of the MHC in autoimmunity: a review and pooled analysis*. PLoS Genet, 2008. **4**(4): p. e1000024.
189. Gleicher, N., R. Weiner, and M. Vietzke, *The impact of abnormal autoimmune function on reproduction: Maternal and fetal consequences*. J Autoimmun, 2006. **27**(3): p. 161-165.
190. Invernizzi, P., et al., *X chromosome monosomy: a common mechanism for autoimmune diseases*. J Immunol, 2005. **175**(1): p. 575-8.
191. Spolarics, Z., *The X-files of inflammation: cellular mosaicism of X-linked polymorphic genes and the female advantage in the host response to injury and infection*. Shock, 2007. **27**(6): p. 597-604.
192. Carrel, L. and H.F. Willard, *X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females*. Nature, 2005. **434**(7031): p. 400-4.
193. Ozbalkan, Z., et al., *Skewed X chromosome inactivation in blood cells of women with scleroderma*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(5): p. 1564-70.
194. Ozcelik, T., et al., *Evidence from autoimmune thyroiditis of skewed X-chromosome inactivation in female predisposition to autoimmunity*. Eur J Hum Genet, 2006. **14**(6): p. 791-7.
195. Sybert, V.P. and E. McCauley, *Turner's syndrome*. N Engl J Med, 2004. **351**(12): p. 1227-38.
196. Lo, Y.M., et al., *Two-way cell traffic between mother and fetus: biologic and clinical implications*. Blood, 1996. **88**(11): p. 4390-5.
197. Bianchi, D.W. and R. Romero, *Biological implications of bi-directional fetomaternal cell traffic: a summary of a National Institute of Child Health and Human Development-sponsored conference*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2003. **14**(2): p. 123-9.
198. Khosrotehrani, K. and D.W. Bianchi, *Multi-lineage potential of fetal cells in maternal tissue: a legacy in reverse*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 8): p. 1559-63.
199. Solomon, D.H., et al., *Cardiovascular morbidity and mortality in women diagnosed with rheumatoid arthritis*. Circulation, 2003. **107**(9): p. 1303-7.

- 
200. Ward, M.M., *Premature morbidity from cardiovascular and cerebrovascular diseases in women with systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 1999. **42**(2): p. 338-46.
  201. Esdaile, J.M., et al., *Traditional Framingham risk factors fail to fully account for accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(10): p. 2331-7.
  202. Warrington, K.J., et al., *Rheumatoid arthritis is an independent risk factor for multi-vessel coronary artery disease: a case control study*. Arthritis Res Ther, 2005. **7**(5): p. R984-91.
  203. Vaudo, G., et al., *Endothelial dysfunction in young patients with rheumatoid arthritis and low disease activity*. Ann Rheum Dis, 2004. **63**(1): p. 31-5.
  204. Ortona, E., et al., *Redox state, cell death and autoimmune diseases: a gender perspective*. Autoimmun Rev, 2008. **7**(7): p. 579-84.
  205. Orrenius, S., *Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death*. Drug Metab Rev, 2007. **39**(2-3): p. 443-55.
  206. Alves, C.M., et al., *Superoxide anion production by neutrophils is associated with prevalent clinical manifestations in systemic lupus erythematosus*. Clin Rheumatol, 2008. **27**(6): p. 701-8.
  207. Cedergren, J., et al., *Intracellular oxidative activation in synovial fluid neutrophils from patients with rheumatoid arthritis but not from other arthritis patients*. J Rheumatol, 2007. **34**(11): p. 2162-70.
  208. Nicola, P.J., et al., *The risk of congestive heart failure in rheumatoid arthritis: a population-based study over 46 years*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(2): p. 412-20.

---

## 8 Erklärung

„Ich, Janina Koschate, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Unterschiede im Genexpressionsmuster kardiovaskulär relevanter Faktoren in männlichen und weiblichen Nabelschnurzellen* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

---

## 9 Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. med. V. Stangl und Herrn Dr. Mario Lorenz für die freundliche Überlassung des Themas sowie für die Betreuung der Arbeit.

Außerdem gilt mein herzlicher Dank all den Mitarbeiterinnen des kardiologischen Forschungslabors, die mich beim Erheben der Daten bzw. bei der Laborarbeit unterstützten.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.