

**Aus der Universitätsklinik für Neurochirurgie Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Tatagiba**

**Assoziation genetischer Polymorphismen
von bFGF, CRABP-I, PDGFRB und TGF- β 1
mit der Ätiopathogenese von Moyamoya**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Vera-Sarina Peters
aus
Stuttgart

2011

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. B. Krschek

2. Berichterstatter: Frau Professor Dr. D. Berg

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

A	Einleitung	Seite 1
1.	Moyamoya-Krankheit	Seite 2
1.1.	Geschichte	2
1.2.	Epidemiologie	2
1.3.	Ätiologie	6
1.4.	Pathogenese und Histologie	9
1.5.	Symptome	12
1.6.	Diagnostik	15
1.7.	Therapie	20
1.8.	Prognose	24
2.	Zytokine	Seite 26
2.1.	bFGF (basic Fibroblast Growth Factor)	27
2.2.	CRABP-I (Cellular Retinoic Acid Binding Protein I)	29
2.3.	PDGF (Platelet-Derived Growth Factor)	31
2.3.a.	Isoformen	31
2.3.b.	Rezeptoren	33
2.3.c.	Signalwege	34
2.3.d.	Physiologische Funktionen von PDGF	36
2.3.e.	Rolle von PDGF bei pathologischen Prozessen	40
2.4.	TGF- β (Transforming Growth Factor Beta)	42
2.4.a.	TGF- β Superfamilie	42
2.4.b.	TGF- β Familie	44
2.4.c.	Rezeptoren	47
2.4.d.	TGF- β 1	48
3.	Hintergrund und Zielsetzung der Studie	Seite 54
3.1.	bFGF bei MMD	56
3.2.	CRABP-I bei MMD	57
3.3.	PDGF bei MMD	58
3.4.	TGF- β 1 bei MMD	59

B	Patienten, Material und Methoden	Seite 61
	1. Studiendesign	Seite 61
	1.1. Fallgruppe	61
	1.2. Kontrollgruppe	69
	2. Material und Methoden	Seite 72
	2.1. Blutentnahme	72
	2.2. DNS-Extraktion und Präparation	73
	2.3. DNS-Analyse	74
	2.3.a. DNS-Amplifizierung mit Hilfe von PCR	74
	2.3.a.a. PCR-Protokoll	76
	2.3.b. DNS-Sequenzierung	78
	2.3.b.a. Sequenzierungsprotokoll	78
	2.3.c. Magnetseparation	79
	2.3.c.a. Protokoll Magnetseparation	80
	2.3.d. Genetische Analyse	80
	2.3.e. Analyse-Software	80
	2.4. Statistik	81
	2.5. SNP(Single Nucleotid Polymorphisms)-Auswahl	81
C	Ergebnisse	Seite 86
	1. Positive SNPs	Seite 87
	2. Negative SNPs	Seite 88
D	Diskussion	Seite 93
	1. bFGF	Seite 94
	2. CRABP-I	Seite 96
	3. PDGFRB	Seite 97
	4. TGF-β1	Seite 103

E Zusammenfassung Seite 109

Anhang:

Abkürzungsverzeichnis Seite 112

Abbildungsverzeichnis Seite 115

Tabellenverzeichnis Seite 116

Literaturverzeichnis Seite 117

Veröffentlichungen Seite 147

Danksagung Seite 148

Curriculum Vitae Seite 149

A Einleitung

Die Moyamoya-Krankheit (Engl.: Moyamoya Disease, kurz: Moyamoya oder MMD) ist eine chronische zerebrovaskuläre Krankheit, charakterisiert durch fortschreitende bilaterale Verengung (Stenosierung) und/oder Verschluss (Okklusion) großer intrakranieller Arterien sowie ein ausgedehntes Netzwerk aus Kollateralgefäßen („MMD-Gefäße“) an der Basis des Gehirns (s. Abb.1) [6]. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die DNS bei MMD-Erkrankten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen auf Polymorphismen im Genbereich ausgewählter Zytokine untersucht und ein möglicher Bezug zur bislang ungeklärten Ätiopathogenese der Krankheit hergestellt.

Nach einem informativen Überblick über die Krankheit Moyamoya unter Einbezug aktueller Forschungserkenntnisse und einer detaillierten Darstellung bzgl. der untersuchten Zytokine, folgt die Darlegung und Diskussion der Untersuchungen.

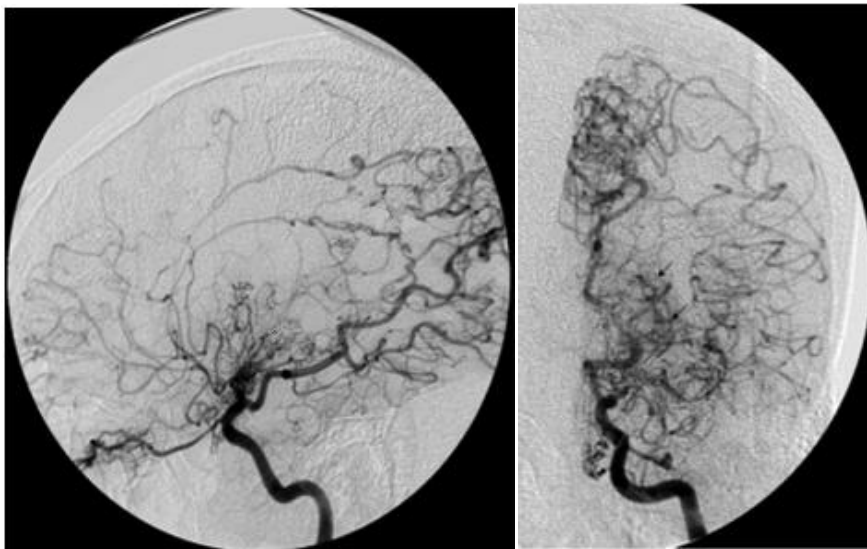


Abb. 1: Angiographische Darstellung der linken Arteria carotis interna (ACI) eines 25-jährigen Patienten mit MMD-Krankheit in lateraler Projektion (links) und anteroposteriorer Projektion (rechts). Erkennbar sind Stenosen im distalen Bereich der ACI, in den proximalen Anteilen der Arteria cerebri media (MCA) und der Arteria cerebri anterior (ACA).

Quelle: modifiziert nach (Bacigaluppi, Dehdashti et al. 2009) [7]

1. Moyamoya-Krankheit

1.1. Geschichte

Erstmals beschrieben wurde MMD im Jahre 1957 als “hypogenesis of bilateral internal carotid arteries“ von Takeuchi und Shimizu basierend auf der spezifischen intrakraniellen vaskulären Morphologie der Krankheit [8]. Es folgten weitere Beschreibungen in den nachfolgenden Jahren, wie z.B. “kapillare diffuse zerebrale Angioektasie“ von Krayenbuhl and Yasargil im Jahre 1965 [9].

Erst im Jahre 1969 prägten Suzuki und Takaku die Bezeichnung „Moyamoya“. Diese Bezeichnung bedeutet frei übersetzt aus dem Japanischen etwas, wie „der in die Luft ausgeblasene Rauch einer Zigarette“ und beschreibt damit zutreffend die angiographische Darstellung der Krankheit, welche durch eine Vielzahl an Gefäßkollateralen speziell an der Basis des Gehirns ein wolkiges, nebliges Bild aufweist [10].

Neben der heute geläufigen Bezeichnung „Moyamoya“ existiert noch die seltener benutzte, offizielle Bezeichnung der Krankheit “Spontaneous occlusion of the circle of Willis” [11], nach welcher das 1977 vom japanischen Ministerium für Gesundheit und Soziales (Engl.: Ministry of Health and Welfare) gegründete Komitee „Research Committee on the Spontaneous Occlusion of the Circle of Willis (MMD Disease)“ benannt wurde [12].

Wie auch viele andere Arbeitsgruppen ist dieses Komitee involviert in Forschungen bezüglich bislang ungeklärter Fragen über MMD, wie z.B. im Bereich Ätiologie und Epidemiologie.

1.2. Epidemiologie

Seit dem ersten Bericht über MMD im Jahre 1957 in Japan, folgten Berichte über MMD weltweit, u.a. auch über Personen europäischer und amerikanischer Herkunft.

Der anfänglich vertretene Irrglaube MMD sei als Krankheit auf die japanische Abstammung oder allgemein eine asiatische Abstammung begrenzt, konnte damit bald widerlegt werden [6, 13, 14].

Auf Grund der geringen Gesamtinzidenz, variabler Studiendesigns und falsch positiver oder falsch negativer Diagnosen gibt es nur verhältnismäßig wenige epidemiologische Berichte über MMD, die zudem in ihren Ergebnissen teilweise stark divergieren.

Im Folgenden soll daher ein grober Überblick über den momentanen Wissensstand diesbezüglich dargestellt werden.

MMD hat die höchste Inzidenz im asiatischen Raum, speziell in Japan, mit annähernd einem Betroffenen pro eine Million Personen pro Jahr. In Europa hingegen finden sich Schätzungen zu Folge nur ein zehntel so viele Betroffene [15].

In epidemiologischen Untersuchungen fanden sich nach Schätzungen des „Research Committee on MMD Disease“ in Japan für das Jahr 2003 und 2004 circa 7500 bis 7700 behandelte Personen [16, 17].

Dies entspricht annäherungsweise einer Verdopplung der Behandelten bezogen auf die davor liegenden zehn Jahre, wie Untersuchungen aus dem Jahre 1994 zeigen mit einer Anzahl von ca. 3900 Behandelten [16]. Insgesamt lässt sich seit der ersten Japan-weit durchgeführten epidemiologischen Untersuchung im Jahre 1986 eine stetige Zunahme der Behandelten vermerken, was sich nach Kuriyama et al. nicht nur über verbesserte diagnostische Methoden erklären lässt (s. Abb. 2) [16].

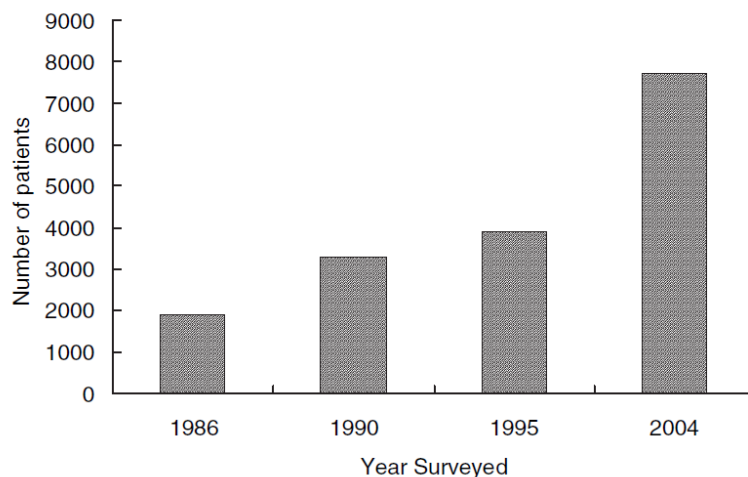


Abb. 2: Anzahl von MMD-Fällen im zeitlichen Verlauf in Japan. Quelle: (Kuriyama, Kusaka et al. 2008) [16]

Nach Wakai et al. finden sich für das Jahr 1995 Prävalenz- und Inzidenzraten von 3,16 und 0,35 pro 100 000 Personen pro Jahr in Japan [18].

Kuriyama et al. berichteten für das Jahr 2003 hingegen über eine Inzidenzrate von 0,54 pro 100 000 Personen pro Jahr, wobei sich diese Zunahme nicht mit Sicherheit nur auf eine erhöhte Inzidenz zurückführen lässt. Die Anzahl der erfassten Personen und die besseren Erfassungsmöglichkeiten müssen hierbei ebenfalls bedacht werden [16].

Eine für das Jahr 2005 durchgeführte Studie von Baba et al. auf der Insel Hokkaido zeigte, verglichen mit den Daten von Wakai et al., eine 3fach erhöhte Inzidenzrate mit 0,94 pro 100 000 Personen pro Jahr und eine Prävalenz von 10,5 pro 100 000 Personen pro Jahr [19].

Bei Untersuchungen aus den USA (Washington und Kalifornien) von Uchino et al. im Jahr 2005 zeigte sich eine signifikant geringere Inzidenzrate von 0,084 pro 100 000 Personen pro Jahr auf Grund der ethnischen Abstammung. Die Inzidenzrate unter Amerikanern asiatischer Abstammung zeigte jedoch vergleichbare Ergebnisse zu den Untersuchungen von Wakai et al. in Japan mit 0,28 pro 100 000 Personen pro Jahr [20].

Zusammenfassend scheint eine Festlegung auf spezifische Inzidenzraten für MMD bezogen auf verschiedene ethnische Gruppen momentan nicht möglich

auf Grund der zu geringen Datenlage. Es scheint jedoch insgesamt eine Tendenz zur Zunahme der Inzidenz absehbar.

In der Altersverteilung von MMD zeigt sich, wie aus Abbildung 3 ersichtlich (s. u.), eine Verteilung über alle Altersstufen mit zwei Peaks, bei Kindern unter zehn Jahren als juveniler Typ und bei Erwachsenen zwischen 25-49 Jahren als adulter Typ. Die Angabe bezüglich der am häufigsten betroffenen Altersgruppe bei Erwachsenen variiert in der Literatur jedoch leicht, abhängig von der jeweiligen Studie [12, 18]. Ebenso aus Abbildung 3 ersichtlich, findet sich MMD gehäuft bei Frauen. Sie sind fast doppelt so häufig betroffen wie Männer mit einem Verhältnis von 1,8:1 [16].

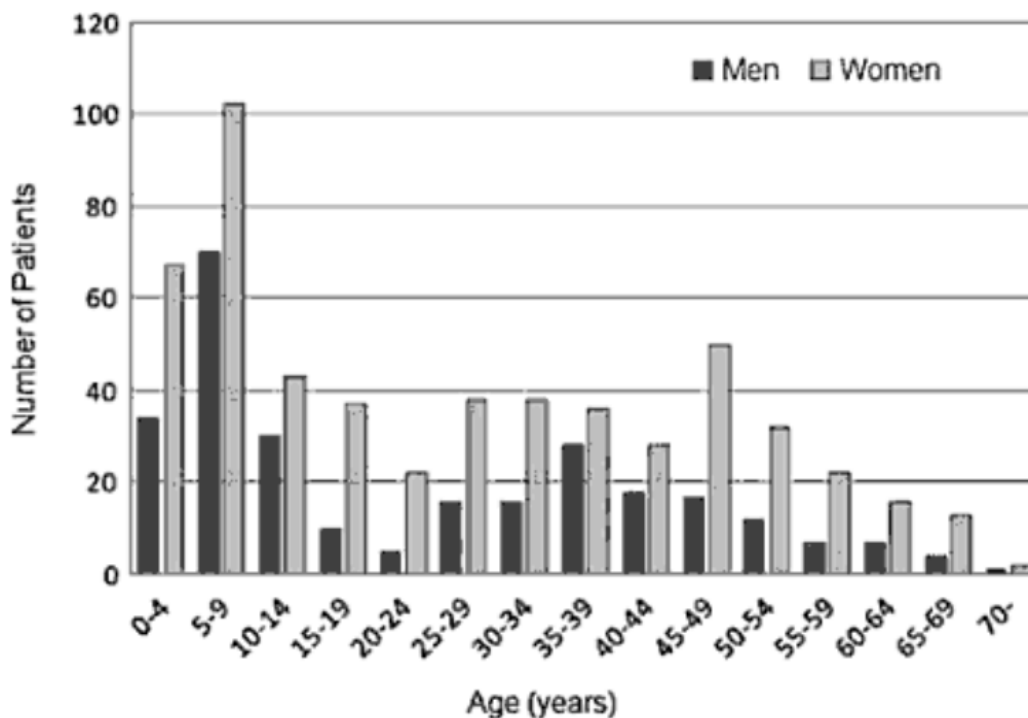


Abb. 3: Altersverteilung bei Krankheitsausbruch von MMD in Japan (2003-2007). Quelle: modifiziert nach (Oki, Hoshino et al. 2008) [21]

Bei Untersuchungen von Wakai et al. [18] waren 48% der Patienten bei Krankheitsausbruch jünger als zehn Jahre. Auch wenn bei Untersuchungen von Baba et al. [19] nur 15,1% der Patienten bei Krankheitsausbruch jünger als zehn Jahre waren, ist MMD dennoch mit einer Prävalenz von circa drei

Erkrankten pro 100 000 Kinder die häufigste pädiatrische zerebrovaskuläre Krankheit in Japan [2].

Gehäuft findet sich bei MMD eine positive Familienanamnese, wobei sich in der Literatur relative Häufigkeiten von 6 bis zu mehr als 12% finden, bezogen auf das in der jeweiligen Studie berücksichtigte Patientenkollektiv [16, 22-24]. Aus Untersuchungen von Nanba et al. und Kuroda et al. ging hervor, dass Frauen bei familiären Fällen im Vergleich zu sporadischen Fällen noch häufiger betroffen sind als Männer mit einer Rate von 5:1 und, dass das mittlere Alter bei Krankheitsausbruch um ein Vielfaches niedriger ist. V.a. Betroffene der 2. Generation wiesen ein signifikant niedrigeres Alter bei Krankheitsausbruch auf als Betroffene der 1. Generation, was den beiden oben genannten Untersuchungsgruppen zu Folge auf genetische Antizipation hindeutet [25, 26].

1.3. Ätiologie

Trotz intensiver Forschungen u.a. seit 1977 durch das o.g. "Japanese Research Committee on Spontaneous Occlusion of the Circle of Willis" ist die Ursache von MMD immer noch ungeklärt.

Die Tatsache, dass MMD bevorzugt in der asiatischen, speziell der japanischen, Bevölkerung [18, 27] und mit einer gehäuften intrafamiliären Inzidenz auftritt, legt die Vermutung nahe, dass vererbare endogene genetische Faktoren ätiologisch von Bedeutung sind. Hierfür spricht auch die gehäufte Koinzidenz von MMD mit anderen genetisch verursachten Krankheiten, wie z.B. Trisomie 21 oder Neurofibromatose Typ 1 [28-30].

Unter Annahme einer genetischen Ursache von MMD wurden bereits vielfältige genetische Studien durchgeführt, in welchen Zusammenhänge mit Loci der Chromosomen 3,6,8 und 17, sowie mit spezifischen HLA Haplotypen, nachgewiesen werden konnten [31-36].

So waren z.B. nichtparametrische Kopplungsanalysen von Ikeda et al. hinweisend auf die genetische Region 3p24.2-p26, in welcher u.a. Gene liegen, welche mit dem Marfan-Syndrom assoziiert sind [31].

Inoue et al. konnten über eine Kopplungsanalyse mit Mikrosatellitenmarkern positive Ergebnisse im Bereich der Lokalisation des HLA-Gens auf Chromosom 6 aufweisen [33] und Sakurai et al. im Bereich 8q23, welches nahe der Region von TIEG (Transforming Growth Factor Beta Inducible Early Growth Response), einem durch TGF- β induzierbarem Transkriptionsfaktor, liegt [34].

Auf Grund der gehäuften Koinzidenz von MMD und Neurofibromatose Typ 1 (NF1), untersuchten Yamauchi et al. in einer Kopplungsanalyse Chromosom 17, auf welchem sich u.a. die entsprechende Region des NF1-Gens befindet. Hierbei zeigten sich Hinweise, dass ein für MMD verantwortliches Gen in der Region 17q25 lokalisiert ist [37].

Auch bei Kang et al. fanden sich Hinweise für ein mögliches Kandidatengen für MMD auf Chromosom 17. Sie konnten durch Untersuchung mehrerer SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms, dt.: Einzelbasenmutationen) bei DNS von elf koreanischen MMD-Erkrankten einen Polymorphismus im Bereich der Promotorregion des TIMP-(Tissue Inhibitor of Metallo-Proteinase)2-Gens in der Region 17q25 nachweisen [38].

Die Wichtigkeit von TIMPs und anderen regulierenden Molekülen des Körpers, wie z.B. dem oben erwähnten TIEG bzw. dessen vorgeschaltetem Zytokin TGF- β , zeigt sich bei entsprechenden Expressionsuntersuchungen, welche gegebenenfalls eine veränderte Expression eines dieser Moleküle bei MMD-Erkrankten nachweisen können. Mit dem Wissen über die eigentliche Funktion des entsprechenden, als verändert festgestellten Moleküls lassen sich damit mögliche Hinweise auf die ebenfalls noch ungeklärte Pathogenese und damit rückwirkend Hinweise auf die Ätiologie der Krankheit ableiten.

Weitere Untersuchungen und Theorien bezüglich pathogenetisch relevant erscheinender Biomoleküle und entsprechender Expressionsuntersuchungen werden im Abschnitt A.3. (Hintergrund und Zielsetzung der Studie) genauer dargelegt.

Der von Kang et al. untersuchte Polymorphismus auf Chromosom 17 bei elf koreanischen MMD-Patienten konnte bei Untersuchungen von Mineharu et al. mit DNS von 52 MMD-Patienten japanischer Herkunft leider nicht bestätigt werden. Allerdings konnte in der Studie von Mineharu et al. mit Hilfe einer

parametrischen genomweiten Kopplungsanalyse und Einsatz von 17 zusätzlichen Mikrosatellitenmarkern die ROI (Region Of Interest) auf dem Chromosom weiter eingeschränkt werden auf den Bereich 17q25.3 [39]. Zudem weist diese Studie bei familiären Fällen auf einen autosomal-dominanten Vererbungsgang mit inkompletter Penetranz hin. Demgegenüber wird jedoch auch ein polygener Vererbungsmodus viel diskutiert [39].

In einem bis dato einzigartigen Ansatz über diverse Kopplungs- und Assoziationsstudien konnten Guo et al. die erste Genmutation bei MMD im Bereich des Chromosoms 10q23-24 lokalisieren. In diesem Bereich befindet sich das ACTA2-Gen, welches als spezifische alpha-Actin-Isoform eine Hauptkomponente des kontraktile Apparats in glatten Gefäßmuskelzellen (Engl.: vascular Smooth Muscle Cells, kurz: vSMCs) im arteriellen Gefäßsystem darstellt. Die Studien ergaben, dass heterozygote ACTA2-Mutation prädisponiert für eine Vielzahl an Gefäßkrankheiten, wie z.B. familiäre Aortenaneurysmen und -dissektionen und MMD [40, 41]. Weitere Nachweise der Mutation speziell in Zusammenhang mit MMD sind jedoch noch ausstehend.

Trotz der vielen Hinweise auf eine genetische Ursache von MMD, scheinen auch exogene Faktoren bei der Genese von MMD mitbeteiligt zu sein. So ergaben z.B. Untersuchungen von Tanghetti et. al. nur einen Betroffenen bei eineiigen Zwillingen, was für eine multifaktorielle Genese mit genetischer Prädisposition und auslösenden exogenen Faktoren spricht [42].

Bezüglich dieser auslösenden exogenen Faktoren gibt es diverse Untersuchungen, die u.a. auf die mögliche Beteiligung von Infektionen hinweisen, wie z.B. eine Infektion durch das Epstein-Barr-Virus oder auch *Propionibacterium acnes* [43, 44].

Ein weiterer ätiologisch zu berücksichtigender Faktor ist eine stattgehabte Bestrahlung im Kopf-/Hals-Bereich, wie Ullrich et. al. zeigen konnten. Von 345 Patienten mit Zustand nach Bestrahlung im Kopfbereich konnte bei zwölf Patienten MMD als neu aufgetreten nachgewiesen werden, was einer Prävalenz von 3,5% entspricht. Es besteht somit nach Ullrich et al. ein erhöhtes Risiko für MMD durch Bestrahlung im Kopf-/Hals-Bereich gegenüber der Allgemeinbevölkerung, was sich jedoch auf Grund der unklaren Datenlage

bezüglich der Prävalenz von Moyamoya in der Allgemeinbevölkerung nur schwer prozentual spezifizieren lässt. Zudem konnten Ullrich et al. eine positive Korrelation zwischen Energiedosis bei der Bestrahlung und Prävalenz von MMD nachweisen, was ebenfalls auf ein höheres Risiko für die Entwicklung von MMD durch Bestrahlung hinweist [45].

Zusammenfassend bleibt zu vermerken, dass der genetische Ansatz zur Klärung der Ätiologie von MMD zwar viel versprechend erscheint, aber wegweisende Ergebnisse noch ausstehen. Es bedarf damit weiterer Studien, um zukünftig durch ein besseres Ursachenverständnis eine optimierte Behandlung und vielleicht sogar eine Heilung zu ermöglichen und somit die Prognose der Erkrankung zu verbessern.

1.4. Pathogenese und Histologie

Hinweisend auf die Erkrankung MMD sind Stenosen bzw. Okklusionen v.a. im distalen Bereich der großen inneren Halsschlagadern, Aa. carotides internae, und der nachfolgenden Gefäße an der Basis des Gehirns, Circulus Willisii und v.a. Aa. cerebri anteriores und mediae (s. Abb. 4). Zudem sind multiple Gefäß-kollateralen bevorzugt an der Basis des Gehirns ein typisches Merkmal von MMD.

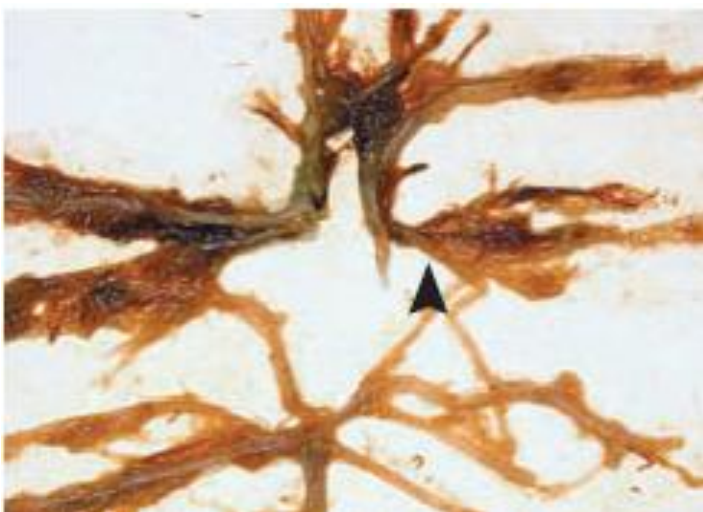


Abb. 4: Autopsie-Präparat des Circulus Willisii von einem Patienten mit MMD. Dargestellt ist die Stenosierung beider Aa. cerebri mediae mit stärkerer Ausprägung auf der rechten Seite (Pfeil). Quelle: (Scott and Smith 2009) [2]

Die Stenosen werden histopathologisch durch eine langsame, stetige Verdickung der Tunica intima (kurz: Intima) verursacht, welcher wiederum eine Vielzahl mikroskopisch und immunhistochemisch nachweisbarer Prozesse zu Grunde liegt.

Hierzu gehören eine exzentrische fibrozelluläre Hyperplasie der Intima mit proliferierenden glatten Muskelzellen (Engl.: Smooth Muscle Cells, kurz: SMCs), eine unregelmäßig gewundene und teilweise duplizierte oder auch unterbrochene Lamina elastica interna sowie eine Ausdünnung der Tunica media (kurz: Media) (s. Abb. 5) [46-48].



Abb. 5: Schnittpräparat der ACI rechts eines 14-jährigen Mädchens mit MMD (Elastica-van-Gieson-Färbung). Durch die exzentrische Verdickung der Intima ist das Lumen des Gefäßes stark eingeengt. Die verdickte Intima besteht aus 2 Schichten mit einer neu gebildeten, übermäßig gewundenen Lamina elastica interna dazwischen. Aufgelagert auf die verdickte Intima findet sich zusätzlich ein frischer Fibrinthrombus. Quelle: (Ikezaki 2001) [49]

Die Herkunft der intimalen SMCs ist noch nicht vollständig geklärt. Sowohl eine Migration von medialen SMCs in die Intima als auch ein „Homing“ zirkulierender Stammzellen aus dem Knochenmark im Bereich der betroffenen Gefäße mit nachfolgender Differenzierung wird diskutiert [48, 50].

Weitere wichtige Merkmale bei den oben beschriebenen Veränderungen der verschiedenen Gefäßwandschichten scheinen Mechanismen wie Apoptose und Inflammation zu sein. Als Hinweis für Apoptose findet sich eine erhöhte Expression von Caspase-3-Spaltstücken [51] und als Hinweis auf eine inflammatorische Komponente und Endothelaktivierung finden sich lumennah in der pathologisch veränderten Intima Makrophagen und T-Zellen (s. Abb. 6) [52], sowie eine erhöhte Interleukin-1 β - und Prostaglandin E₂-Produktion [53, 54].

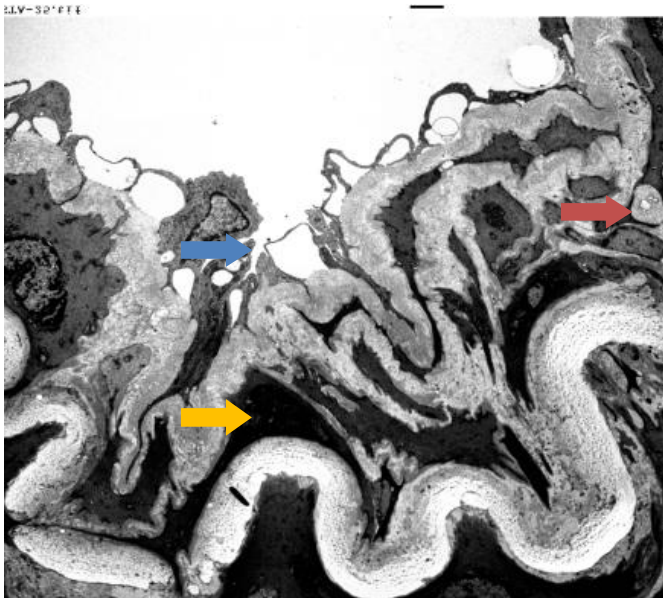


Abb. 6: Elektronenmikroskopische Darstellung eines im Rahmen einer Bypass-Operation gewonnenen Exzidats der MCA einer 22-jährigen Frau mit MMD. Dargestellt ist die typische Intimahyperplasie mit SMCs (roter Pfeil) und einer dicken, wellenförmigen Lamina elastica interna (gelber Pfeil). Zudem finden sich lumennah vereinzelt Entzündungszellen (blauer Pfeil).

Quelle: Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Akio Koizumi M.D., Ph.D., Department of Health and Environmental Sciences, Kyoto University Graduate School of Medicine, Japan.

Als pathologische Nebenbefunde von MMD finden sich gehäuft Mikroaneurysmen, welche als mögliche Blutungsquelle angesehen werden, und intraluminale

Thromben sowie gelegentliche Lipiddeposits, welche vermutlich mitbeteiligt sind am vaskulären Stenosierungsprozess bei MMD [48, 50, 55].

Die multiplen Kollateralen bei MMD scheinen sekundär zu entstehen durch die verminderte Blutversorgung des Gehirns [50, 52, 56]. Diese Kollateralversorgung bildet sich sowohl durch Dilatation aus bereits bestehenden peripheren und basalen Hirnarterien als auch durch vollständige Neubildung von Gefäßen [57, 58]. Es finden sich z.B. transdurale, extrakraniell-intrakraniell und leptomeningeale Anastomosen sowie retikuläre Konglomerate kleiner Gefäße in der Pia mater und an der Basis des Gehirns zur Unterstützung eines kollateralen Blutflusses aus der anderen Hemisphäre und über die extrakranielle Blutversorgung [46, 59]. Histopathologisch finden sich bei diesen Kollateralgefäßen entweder eine fragmentierte Lamina elastica interna, eine ausgedünnte Media, vereinzelte Lipiddeposits und Mikroaneurysmen, prädisponierend für Hämorrhagie, oder verdickte Wände mit kollabierten und thrombotisch verschlossenen Lumina, prädisponierend für Ischämie [48, 60, 61].

In der Vergangenheit konnten einige Studien veränderte Expressionen diverser Zytokine und Wachstumsfaktoren bei MMD nachweisen, wie z.B. von VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), bFGF und TGF- β 1, welche in die angiogene Signalkaskade involviert sind. Viele dieser verändert exprimierten Faktoren sind u.a. in Umbauprozesse der Gefäßwand involviert, was nahelegt, dass die oben beschriebenen histopathologischen Veränderungen durch diese Faktoren beeinflusst, koordiniert oder vielleicht sogar verursacht werden könnten [1, 56, 62-69].

1.5. Symptome

Häufige allgemeine Symptome bei MMD sind chronische Kopfschmerzen, starke Müdigkeit und seltener auch Schwindel. Als Ursache der Kopfschmerzen wird spekuliert, dass die Dilatation meningealer Kollateralgefäße möglicherweise durale Nozizeptoren stimuliert und hierdurch zu dem in der Regel medikamentenresistenten Kopfschmerz führt [70]. Da sich diese Symptome jedoch

auch bei einer Vielzahl anderer, teilweise nicht neurologischer Erkrankungen finden und damit sehr unspezifisch sind, führen sie bei Auftreten bei MMD-Patienten selten bereits zur Diagnosestellung.

Wie aus Untersuchungen von Handa et al. hervorgeht (s. Tab. 1), präsentieren Kinder als klar erfassbare Symptomatik bei MMD am häufigsten Paresen und Plegien sowie Krämpfe in Form von epileptischen Anfällen, welche sich auf transiente ischämische Attacken (TIA) oder auch länger anhaltende Ischämien zurückführen lassen. Ebenfalls durch Ischämie induziert werden können aber auch Symptome wie Aphasie, Sensibilitätsstörungen sowie Dystonien und andere Formen von unwillkürlichen Bewegungsstörungen.

Ursächlich ist für die Ischämien v.a. die zunehmende Stenosierung der Gefäße mit nachfolgender Mangelversorgung des Gehirns [46, 70]. Durch körperliche Anstrengung, Schreien oder Hyperventilation können diese Symptome häufig zusätzlich verstärkt oder auch induziert werden, da es bei diesen Manövern durch einen erniedrigten Kohlenstoffdioxidanteil im Blut zu einer zusätzlichen Vasokonstriktion der Hirngefäße kommt [70].

Anhaltende Ischämie und wiederholte epileptische Anfälle können zusätzlich zu bleibenden neurologischen Schäden und zu Einschränkungen im Bereich kognitiver und affektiver Fähigkeiten führen [46].

Die häufigsten Symptome bei Erwachsenen sind nach Handa et al. (s. Tab. 1) Bewusstseinsstörungen, Kopfschmerzen und Paresen.

Diese veränderte Hauptsymptomatik abhängig von der Altersklasse lässt sich u.a. darauf zurückführen, dass bei Erwachsenen Hirnblutungen häufig für die Symptomatik bei klinischer Erstmanifestation von MMD ursächlich sind im Gegensatz zu den bei Kindern beschriebenen Ischämien.

Die Ursache der Blutungen ist bislang ungeklärt. Diskutiert werden einerseits die Ruptur fragiler Kollateralgefäße, andererseits die Ruptur von Aneurysmen, welche häufig intrazerebral vorzufinden sind, vermutlich durch Veränderungen der Blutzirkulation und damit verbundener erhöhter Belastung einzelner Gefäßbereiche [2, 46].

Die Blutungen finden sich intrazerebral, intraventrikulär und/oder subarachnoidal und führen abhängig von Lokalisation und Blutungsausmaß zu

entsprechenden Symptomen, wie z.B. Kopfschmerzen oder auch motorischen Ausfällen. Die häufigsten Lokalisationen sind im Bereich der Basalganglien, des Ventrikelsystems, des medialen Temporallappens und des Thalamus [70]. In den meisten Fällen solch einer Hämorrhagie mit oder ohne neurologischen Begleitsymptomen folgt eine Rekonvaleszenz. Ausnahme bilden hier jedoch besonders schwere Fälle von Blutung bzw. Rezidive, welche auch zum Tod führen können [12].

Es ergibt sich somit bedingt durch Ischämie und Blutung eine Vielzahl verschiedener Symptome bei Kindern und Erwachsenen mit MMD, welche schwerwiegende Beeinträchtigungen sowohl physischer als auch psychischer Funktionen verursachen können und damit starke Einschränkungen im täglichen Leben bis hin zum Tod zur Folge haben können.

In der folgenden Tabelle 1 werden die häufigsten Symptome bei MMD nochmals tabellarisch aufgeführt.

Tab. 1: Relative Häufigkeit und (in Klammern) absolute Häufigkeit verschiedener Symptome bei Kindern (0-9 Jahre) und Erwachsenen (30-39 Jahre) mit MMD. Quelle: (Handa, Yonekawa et al. 1985) [71]

	Kinder n = 431	Erwachsene n = 235
Parese	78 % (338)	35 % (83)
Krampfanfall	26 % (113)	11 % (25)
Aphasie	19 % (83)	14 % (32)
Bewusstseinsstörung	13 % (56)	52 % (123)
Sensibilitätsstörung	10 % (44)	10 % (24)
Kopfschmerzen	8,6 % (37)	58 % (137)
Mentale Retardierung	8,4 % (38)	3,4 % (8)
Sehstörung	3,5 % (15)	4,7 % (11)
Gesichtsfeldausfälle	2,1 % (9)	5,5 % (13)
Unwillkürliche Bewegung	1,6 % (7)	0,4 % (1)

Psychoorganisches Syndrom	1,6 % (7)	7,2 % (17)
--------------------------------------	-----------	------------

1.6. Diagnostik

Eine Vielzahl neurologischer Pathologien kann bei Kindern und Erwachsenen zu ischämischen oder hämorrhagischen Schlaganfällen mit entsprechender Symptomatik führen. V.a. bei Kindern sollte bei Hinweisen auf zerebrale Ischämie oder unklarer neurologischer Symptomatik MMD als Differentialdiagnose in Betracht gezogen werden. Auf Grund aus der Ätiologie resultierender unterschiedlicher Therapiemodalitäten und Prognosen sollte eine schnellstmögliche und gleichzeitig präzise Diagnostik angestrebt werden, welche jedoch nur mit Hilfe radiologischer Untersuchungen eindeutig möglich ist.

Abhängig von der bildgebenden Methode können bei MMD direkte Hinweise, wie die charakteristische Stenosierung der zerebralen Gefäße und die „zigarettenrauchartigen“ Kollateralen, oder indirekte Hinweise, wie der Nachweis von zerebraler Minderperfusion oder multiplen Infarkten, nachgewiesen werden [70]. In der häufig bei Notfällen primär für die Darstellung des Kopfes angewandten Computertomographie lassen sich allenfalls indirekte Hinweise auf MMD nachweisen, wie z.B. hyper- oder hypodense Areale als Zeichen für eine Blutung oder einen Schlaganfall. Diese liegen bevorzugt in kortikalen Grenzzonegebieten, den Basalganglien, der weißen Hirnsubstanz oder periventrikulären Arealen. Allerdings kann die CT-Untersuchung auch vollkommen blande sein, speziell bei Patienten, welche bis zum Zeitpunkt der Untersuchung einzig TIAs als Symptomatik aufwiesen [72].

Nach Fukui et al. ist für die Diagnose von MMD eine konventionelle Angiographie unerlässlich [12]. Nach Bacigaluppi et al. ist sie der Goldstandard für die Diagnose von MMD [7]. Mit Hilfe der Angiographie lässt sich eine hervorragende und detaillierte Darstellung der anatomischen Gefäßbegebenheiten erreichen, sowohl bezogen auf Stenosen und Okklusionen der Gefäße

als auch in Bezug auf die Darstellung der „MMD-Kollateralen“ [70]. Ebenso lassen sich auch arteriovenöse Malformationen und Aneurysmen gut nachweisen, welche in einigen Fällen mit MMD assoziiert nachgewiesen wurden [70, 73-75].

Der Nachweis von Stenosen und Okklusionen im distalen Bereich der ACI und im vorderen Bereich des Circulus Willisii mit entsprechenden Gefäßabgängen und die Darstellung von abnormen Gefäßnetzwerken nahe dieser Stenosen und Okklusionen sind nach dem „Research Committee on the Spontaneous Occlusion of the Circle of Willis (MMD Disease)“ als Kriterien für die angiographische Diagnosestellung der Krankheit nötig. Als weiteres Kriterium für einen definitiven MMD-Fall müssen die Veränderungen, wie aus dem unten dargestellten Algorithmus für die Diagnosestellung von Moyamoya hervorgeht (s. Abb. 7), bilateral vorliegen. Bei Unilateralität ist ein MMD-Fall wahrscheinlich, jedoch nicht definitiv nachgewiesen. Ausnahme hierbei sind Kinder, bei welchen auch bei Unilateralität der MMD-Kollateralen ein definitiver Fall nachgewiesen werden kann. Weiterhin müssen für die Diagnosestellung andere Krankheiten ausgeschlossen sein, welche zu ähnlichen Gefäßveränderungen wie bei MMD führen können, wie z.B. Arteriosklerose, Hirnneoplasien, Neurofibromatose u.v.a.m. . Bei Nachweis einer solchen Krankheit spricht man von Quasi-MMD oder MMD-Syndrom [12, 76].

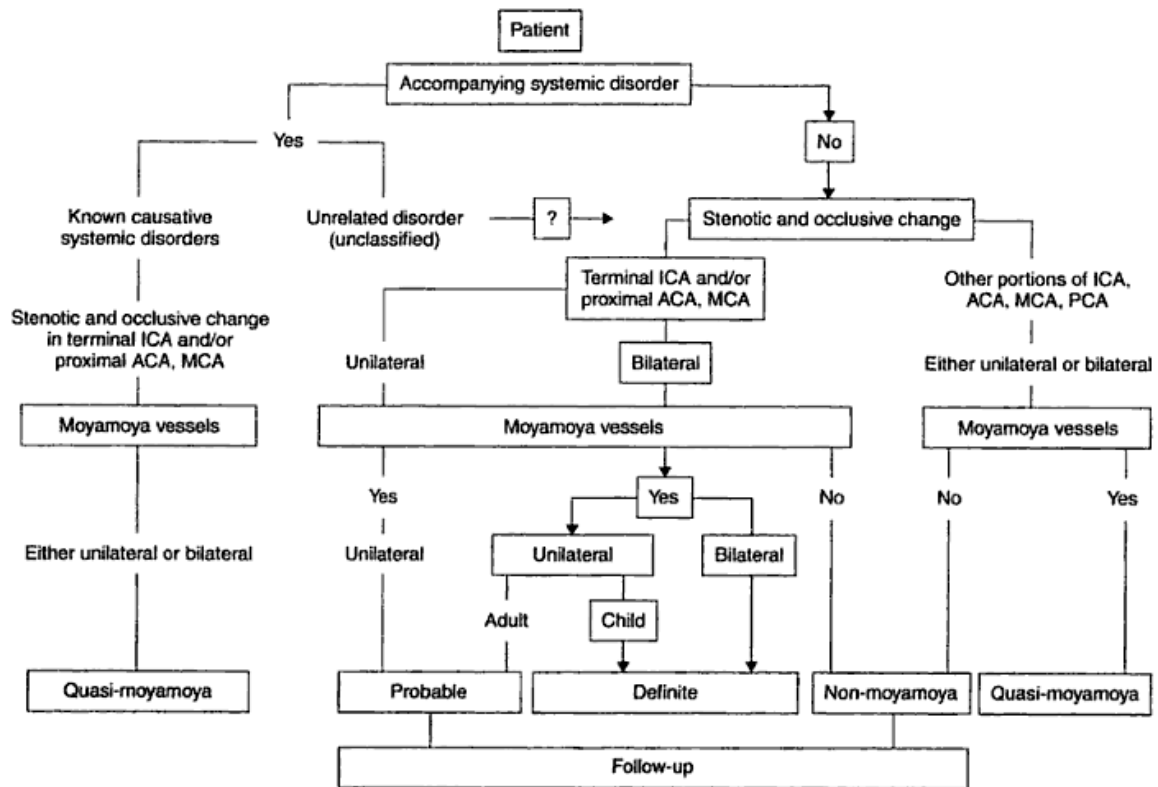


Abb. 7: Algorithmus für die Diagnosestellung von MMD. ICA = Internal Carotid Artery, ACA = Anterior Cerebral Artery, MCA = Middle Cerebral Artery, PCA = Posterior Cerebral Artery. Quelle: (Ikezaki 2001) [77]

Ebenfalls basierend auf angiographischen Erkenntnissen, definierten Suzuki und Takaku folgende sechs Stadien unter Berücksichtigung des Stadiums der Verengung der Arterien und der Ausbildung von Kollateralen (s. Abb. 8 und Tab. 2).

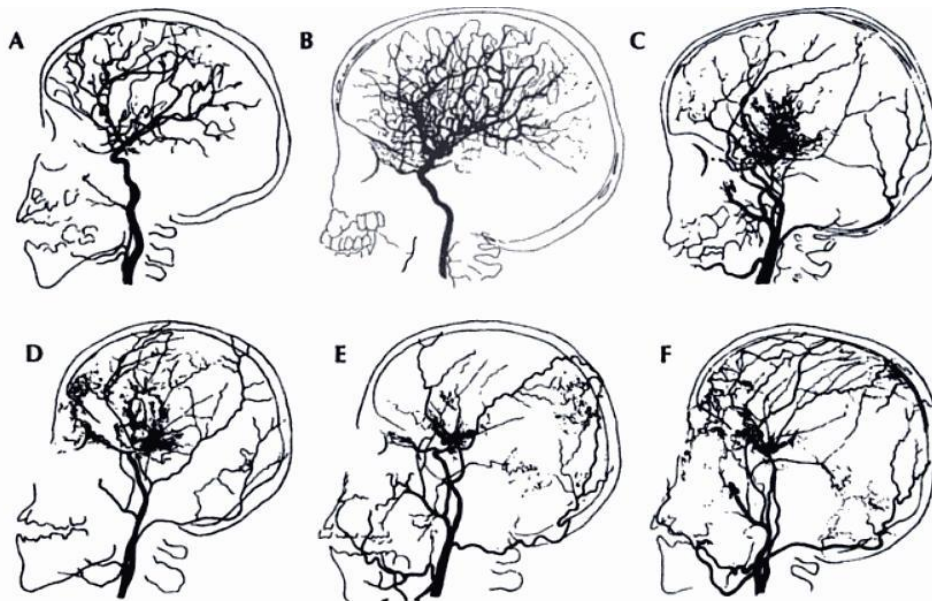


Abb. 8 und Tab. 2: MMD-Stadien nach Suzuki und Takaku.

Quelle: (Suzuki and Kodoma 1983) [6]

Bild	Stadium	Beschreibung
A	I	Verengung der Karotisaufzweigung. Nur die Aufzweigung der Karotis ist verengt.
B	II	Initiation von MMD. Es zeigen sich nur die Stenosierung der Karotisaufzweigung und ein geringgradig ausgeprägtes basales MMD. Zudem kann eine Dilatation aller zerebrovaskulären Hauptstämme beobachtet werden.
C	III	Intensifikation von MMD. An der Basis des Gehirns finden sich erhebliche, teilweise stark ausgeprägte MMD-Gefäße. Weiterhin kann das beginnende Verschwinden der MCAs und ACAs bemerkt werden.
D	IV	Minimierung von MMD. Die MMD-Gefäße werden eng und bilden ein schwaches Netzwerk an der Basis des Gehirns. Weder die MCAs noch die ACAs sind sichtbar. Im Gegensatz dazu nehmen die MMD-Gefäße im Bereich des ethmoidalen Sinus ("ethmoidales MMD") zu.
E	V	Reduktion von MMD. MMD-Gefäße an der Basis des Gehirns verengen sich weiter und finden sich in der Nähe des Karotissiphons. Weiterhin findet sich eine Zunahme von Kollateralen aus dem Bereich des Versorgungsgebietes der Arteria carotis externa (ECA).

F	VI	Verschwinden von MMD. Angiographisch sind sowohl die Hauptarterien des Versorgungsgebietes der ACI als auch die MMD-Gefäße nicht mehr darstellbar. Das Zerebrum wird nur noch durch Kollateralen aus dem Stromgebiet der ECA oder dem vertebrealen Stromgebiet versorgt.
---	----	---

Als Alternative für die Diagnose der konventionellen Angiographie benennen Fukui et al. Magnetresonanztomographie (MRI) und Magnetresonanzangiographie (MRA) mit denselben Nachweiskriterien wie bei der Angiographie. Allerdings empfehlen die Autoren diese Art der Diagnosestellung nur bei Kindern und mit einem System mit mindestens 1,0 Tesla [12]. Systeme mit einem stärkeren Magnetfeld, wie z.B. 3 Tesla, ermöglichen jedoch eine höhere Auflösung und die Detektion sehr kleiner pathologischer Gefäße bei MMD [78]. Für die MRA sind verschiedene Techniken verfügbar, wie z.B. 3D time-of-flight MRA und phase-contrast MRA. Diese Techniken konnten im Vergleich mit der konventionellen Angiographie, u.a. bezogen auf die Detektion von Stenosen, eine Sensitivität von 98%, eine Spezifität von 100% und eine Accuracy von 98% erreichen [79]. Sie sind daher vergleichbar gut wie die konventionelle Angiographie. Auf Grund der zusätzlichen Vorteile der Nichtinvasivität und der fehlenden Strahlenbelastung werden daher von einigen Autoren die magnetresonanzangiographischen Techniken als Goldstandard für die Diagnose von MMD angesehen [80-87]. Der einzige Nachteil der MRA liegt in einer geringfügigen Unterlegenheit in der räumlichen Auflösung v.a. kleiner Gefäße zur intraarteriellen DS-Angiographie [88-90].

Sollten eine MRA oder eine herkömmliche Angiographie nicht durchführbar sein, dient nach Murai et al. als Alternative die computertomographische Angiographie (CTA) um die intrakraniellen Stenosen direkt nachzuweisen [91]. Da dieser Methode jedoch starke Grenzen gesetzt sind in der Darstellung kleinerer Gefäße, sollten oben genannte Methoden bevorzugt werden [70].

Für die Planung des weiteren Prozederes, wie z.B. einer Operation, werden oftmals weitere Informationen benötigt, z.B. durch funktionelle und metabolische Studien. Hierfür werden u.a. Elektroenzephalographie, transkranieller Dopplerultraschall für zerebrale Flussstudien, Xenon-verstärkte Computertomographie,

Positronen-Emissionstomographie oder auch Einzelphotonen-Emissions-Tomografie (Englisch: Single Photon Emission Computed Tomography, kurz: SPECT) mit Azetazolamidtest eingesetzt. Allerdings lässt sich mit Hilfe dieser Techniken in der Regel keine diagnostische Verbesserung erreichen [70, 92-99].

1.7. Therapie

Bislang gibt es für MMD keine kurative Therapie, sondern nur symptomatische Behandlungsmodalitäten. Diese beinhalten einerseits die symptomatische Therapie in der Akutphase mit Verbesserung der zerebrovaskulären Funktion mit, abhängig von der Akutsituation, Reduktion des intrakraniellen Drucks, Kontrolle von epileptischen Anfällen, Stabilisierung der kardiopulmonalen Situation, Vermeidung von Hypotension etc. Andererseits wird ein längerfristiger Schutz gegen ischämische oder hämorrhagische Rezidive sowie andere Folgeerkrankungen angestrebt.

Durch Verbesserung der Durchblutungssituation der betroffenen Hemisphäre(n) erhofft man sich eine niedrigere Rate an erneuten Ischämien sowie eine Reduktion der MMD-Kollateralen mit Symptomverringering.

An Behandlungsmodalitäten stehen zur Verfügung:

1. „Watch and Wait“
2. Medikamentöse Therapie und
3. Operative Therapie [12].

Die erste Therapiemodalität mit einer abwartenden Beobachtung kann nur in Einzelfällen bei nicht bis geringfügig ausgeprägter Symptomatik in Erwägung gezogen werden.

Für die **medikamentöse Therapie** werden u.a. Thrombozytenaggregationshemmer, wie z.B. Aspirin®, angewandt. Hierdurch sollen Embolien von Mikrothromben vermieden werden, welche an arteriellen Stenosen gebildet werden und eine mögliche Ursache der ischämischen Symptomatik darstellen [72, 100-102]. Um eine bestmögliche perioperative antithrombotische Abdeckung zu

gewährleisten scheinen niedermolekulare Heparine eine gute Alternative zu sein [101, 103].

Antikoagulanzen, wie z.B. Marcumar®, werden nur selten angewandt auf Grund der schweren Steuerbarkeit v.a. bei Kindern [101, 103].

Eine weitere medikamentöse Modalität sind Kalziumkanalblocker, welche bei persistierenden Kopfschmerzen oder Migräne unter Umständen Linderung verschaffen können. Außerdem scheinen Kalziumkanalblocker eine Reduktion der Anzahl und Stärke von rezidivierenden TIAs zu bewirken. Auf Grund der möglichen blutdrucksenkenden Wirkung sollte diese Medikamentengruppe jedoch mit Vorsicht angewandt werden [70, 101].

Bei Patienten mit wiederholten klinischen Symptomen auf Grund zerebraler Ischämie, verminderter regionaler Durchblutung und/oder reduzierter Perforationsreserve ist eine **operative Vorgehensweise** indiziert [12]. Problematisch ist hierbei ein erhöhtes perioperatives Risiko für Schlaganfälle, Infektionen und Blutung, welches jedoch bereits nach einem Monat postoperativ beträchtlich sinkt. Zudem konnte bereits mehrfach in Studien ein insgesamt gutes Sicherheitsprofil bei der operativen Therapie und ein signifikantes Benefit in Bezug auf die klinischen Symptome nachgewiesen werden [72, 104, 105].

Es gibt eine Vielzahl von operativen Verfahren für die Therapie von MMD, wobei man grundsätzlich zwischen direkten und indirekten Verfahren unterscheidet. Der zu Grunde liegende Mechanismus ist bei beiden operativen Herangehensweisen derselbe, indem versucht wird die verminderte Durchblutung in einem bestimmten Hirnareal durch Blutkreisläufe des Einflussgebietes der ECA zu verbessern [72, 100].

Bei der direkten Revaskularisation wird ein Bypass zwischen einem Ast der ECA, in der Regel die A. temporalis superficialis (STA), und einer kortikalen Arterie, in der Regel einem Ast der MCA, angelegt [2]. Über diese direkte Anastomose soll somit eine retro- und anterograde Durchblutung des hypoperfundierten Areals gewährleistet werden (s. Abb. 9).

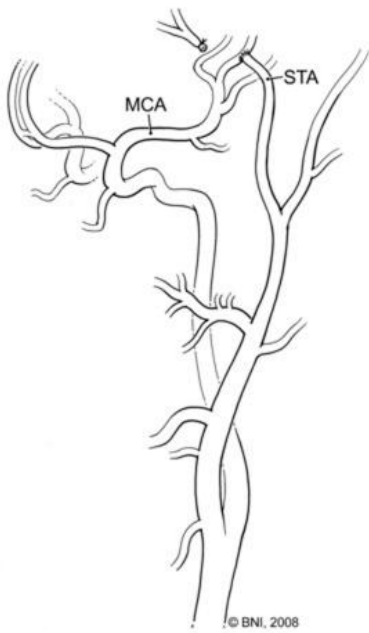


Abb. 9: Darstellung einer STA-MCA-Anastomose.

Quelle: (Baaj, Agazzi et al. 2009) [5]

Vorteil dieser Methode ist, dass eine unmittelbare Verbesserung der Durchblutung erreicht werden kann. Allerdings ergeben sich bei Kindern teilweise unüberwindbare technische Schwierigkeiten auf Grund der Filigranität der Gefäße.

In diesem Fall bieten sich indirekte Verfahren an, bei welchen gut durchblutetes Gewebe in direkten Kontakt mit dem Gehirn gebracht wird. Hierdurch soll ein Einwachsen neuer Blutgefäße in den hypoperfundierten Anteil des Cortex ermöglicht werden und somit die Durchblutung gewährleistet werden.

Als gut durchblutete Gewebe bieten sich z.B. der Musculus temporalis, die STA oder auch Dura an [2]. Einzeln oder kombiniert angewandt werden die Verfahren dementsprechend z.B. als Enzephalomyosynangiose (EMS) (s. Abb. 10), Enzephaloduroarteriosynangiose (EDAS) oder auch als Enzephaloduroarteriomyosynangiose (EDAMS) bezeichnet [106-108].

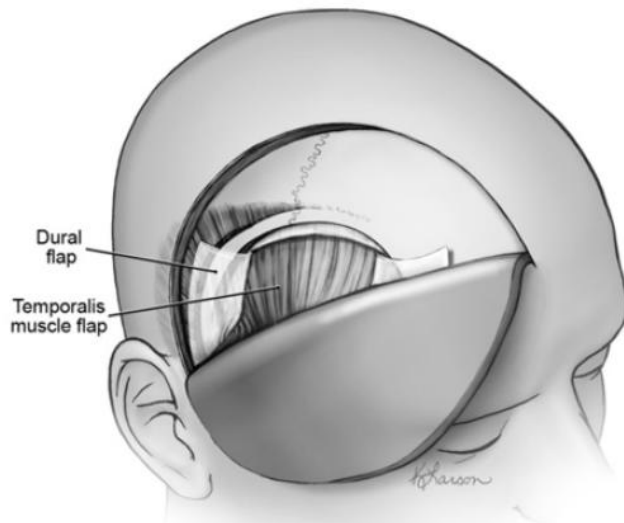


Abb. 10: Operationsmethode Encephalomyosynangioplastie (EMS). Der Temporallappen wird auf die Oberfläche des zerebralen Kortex gelegt. Anschließend wird die Dura mater wieder über dem Muskellappen geschlossen. Quelle: (Baaj, Agazzi et al. 2009) [5]

Zudem gibt es multiple Variationen dieser Verfahren, wie z.B. die Applikation von Bohrlöchern in die Schädelkalotte, wodurch das Einwachsen externer Gefäße erleichtert werden soll [109, 110].

Nicht mehr bzw. nur noch selten angewandt werden die zervikale Symphektomie und die Transposition von Bauchfell, da keines dieser Verfahren einen überzeugenden Erfolg zeigen konnte [111-121].

Um eine Entscheidung bezüglich der bestmöglichen Therapiemodalität treffen zu können, wurden bereits zahlreiche vergleichende Studien durchgeführt. Hierbei zeigte sich u.a., dass eine konservative Therapie den Krankheitsverlauf nicht aufhalten kann [10, 122-124] und dass Patienten ohne operative Behandlung ein schlechteres funktionelles und auch, speziell bei Kindern, intellektuelles Outcome aufweisen als Patienten mit operativer Behandlung [104].

Dem entgegengesetzt zeigten sich bei Vergleich von medikamentöser und operativer Behandlung nach Scott et al. in einer großen Umfrage in Japan keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf das Outcome. Einem neueren Review zu Folge müssen allerdings viele initial medikamentös behandelte Patienten noch nachträglich operiert werden wegen Beschwerdepogredienz [2].

Nach operativer Therapie kam es vor allem bei Kindern zu einer signifikanten Reduktion von TIAs und auch Schlaganfällen. Bei Erwachsenen deuten einige Untersuchungen darauf hin, dass die operative Therapie ebenfalls einen positiven Einfluss auf das Gesamtoutcome ausüben könnte [25].

Im Vergleich der direkten und indirekten Operationsverfahren bei Kindern zeigten sich das direkte Verfahren und kombinierte Eingriffe in Bezug auf Revaskularisation überlegen, jedoch nicht in Bezug auf die Symptomatik [125]. Auf Grund der starken Hinweise auf eine Überlegenheit der operativen Therapie gegenüber einer konservativen Therapie und des geringen o.g. Vorteils der besseren Revaskularisation wird daher, sofern möglich, von vielen Zentren eine kombinierte Methode aus direkter und indirekter Operationstechnik angewandt. Oft wird die operative Behandlung zusätzlich noch mit einer medikamentösen Behandlung gekoppelt [113, 126, 127].

1.8. Prognose

Der natürliche Verlauf von MMD ist sehr variabel, weswegen es nicht möglich ist, eine allgemeingültige Prognose zu stellen. So zeigen sich sowohl sehr langsame Krankheitsprogressionen mit seltenen, intermittierenden Ereignissen, aber auch fulminante Verläufe mit einer rapiden neurologischen Verschlechterung [72, 100].

Allgemein steht jedoch fest, dass MMD in Bezug auf Arteriopathie und klinische Symptomatik bei der Mehrzahl der Patienten, asymptotische Patienten inbegriffen, unweigerlich fortschreitet [10, 123, 128]. Wie bereits beschrieben, scheint ein Verlangsamen oder sogar Aufhalten des Krankheitsverlaufs sowie ein besseres Outcome bislang am besten mit einer operativen Therapie erreichbar zu sein.

Um letztendlich jedoch eine Gesamtprognose der Erkrankung im Einzelnen stellen zu können, müssen eine Vielzahl von Prädiktoren berücksichtigt werden, wie z.B. Ausmaß und zeitliches Fortschreiten der vaskulären Okklusionen, Ausmaß der ischämischen Läsionen in der Bildgebung, Fähigkeit des Patienten zur Ausbildung von Kollateralen u.v.a.m. [129]. Als Prädiktoren für das langfristige Outcome der Erkrankung zeigte sich vor allem der neurologische Status zum Zeitpunkt des Behandlungsbeginns von Bedeutung, in einem geringeren Maß hingegen das Alter der Patienten [72].

Resümierend lässt sich nun für die Erkrankung MMD feststellen:

- MMD ist eine progrediente Gefäßerkrankung des Gehirns.
- Die am häufigsten betroffene Altersgruppe sind Kinder.
- Durch eine frühestmögliche Diagnosestellung und umgehenden Beginn einer geeigneten Behandlung lässt sich entscheidend die Prognose der Krankheit beeinflussen
- Eine Heilung der Krankheit lässt sich nur durch eine kurative Therapie ermöglichen. Hierfür müssen jedoch zunächst noch viele Unklarheiten, v.a. im Bereich Ätiopathogenese, geklärt werden.

Es sollte daher ein besonderes Anliegen sein, durch weitergehende Forschungen die vollständige Aufklärung der Krankheit zu ermöglichen und somit einerseits durch frühzeitige Screeningmöglichkeiten die Prognose der Krankheit zu verbessern und andererseits durch kurative Behandlungsmöglichkeiten eine Verbesserung des weiteren Lebens der Patienten zu ermöglichen.

2. Zytokine

Zytokine sind körpereigene Glykoproteine, welche von vielen Körperzellen produziert werden und an ihren Zielorten verschiedenartige Funktionen ausüben können. Der Begriff Zytokin leitet sich aus dem Griechischen (griech.: kytos = Zelle, kinein = bewegen) ab und bedeutet so viel wie "sich zwischen den Zellen bewegend". Dementsprechend fungieren Zytokine als Mediatoren zwischen verschiedenen Zellen u.a. im Bereich der Ontogenese, der Apoptose, der Immunabwehr und der Entzündung.

In den letzten Jahren ist eine Vielzahl unterschiedlichster Zytokine identifiziert worden, wodurch die Gesamtzahl der Zytokine und ihrer Funktionen mittlerweile recht unüberschaubar geworden ist.

Es existiert jedoch eine begrenzte Anzahl von Zytokin- und Rezeptorklassen, die sich einige charakteristische Signaltransduktionsmöglichkeiten zu Nutze machen. Hierdurch ist eine grobe Einteilung der Zytokine nach Struktur oder auch Funktion möglich. Da jedoch die meisten Zytokine pleiotrop und redundant sind, d.h. ein Zytokin übt vielseitige Wirkungen aus und dieselbe Funktion wird durch verschiedene Zytokine ausgeführt, variieren auch diese Einteilungen bei verschiedenen Autoren.

Nach Freisetzung wirken Zytokine autokrin (auf die produzierende Zelle), juxtakrin (auf Nachbarzellen) und/oder parakrin (in der nahen Umgebung). Selten können Zytokine auch hormonähnlich endokrin wirken. Die Wirkung wird über entsprechende Rezeptoren und nachgeschaltete intrazelluläre Signalkaskaden vermittelt. Für ein effizientes Signal reichen bereits sehr geringe Konzentrationen der Zytokine aus. Zudem besitzen Zytokine eine sehr kurze Halbwertszeit, wodurch die entsprechende Funktion sehr präzise reguliert werden kann. Die Regulierung des Signals wird noch beeinflusst durch die Aktivierung mehrerer verschiedener Zytokine gleichzeitig oder kurz nacheinander, welche dann wiederum synergistisch oder auch antagonistisch wirken können [130-132].

Im Folgenden werden bestimmte Zytokine, welche im Rahmen unserer Studie relevant sind, genauer erläutert, wobei PDGF und TGF- β ausführlicher

dargestellt werden auf Grund positiver Untersuchungsergebnisse in unserer Studie.

2.1. bFGF (basic Fibroblast Growth Factor)

bFGF wurde ursprünglich durch dessen Funktion, das Wachstum von speziellen Zellen aus Hirnextrakten zu stimulieren, entdeckt [133, 134].

Das menschliche Genom enthält eine Kopie des bFGF-Gens auf Chromosom 4 [135]. Das Primärtranskript von menschlichem bFGF-Protein besteht aus 155 Aminosäuren und hat in der Regel eine relative Molekülmasse von 18 kDa, wobei auch größere Formen existieren [136].

bFGF besitzt keine Signalsequenz und wird daher auch nicht über das endoplasmatische Retikulum (ER) und den Golgi-Apparat sezerniert. Dennoch ist bFGF auf der Zelloberfläche und in der Extrazellulärmatrix (EZM) nachweisbar. Ein möglicher Releasemechanismus könnte z.B. die Beschädigung bFGF-enhaltender Zellen sein oder über einen speziellen ER-Golgi-unabhängigen Exozytosemechanismus erfolgen [137].

Strukturell ist hervorzuheben, dass bFGF vier Cysteinaminosäuren enthält, wovon zwei hochkonserviert und vermutlich für die komplexe Tertiärstruktur (s. Abb. 11) (mit)verantwortlich sind [138].

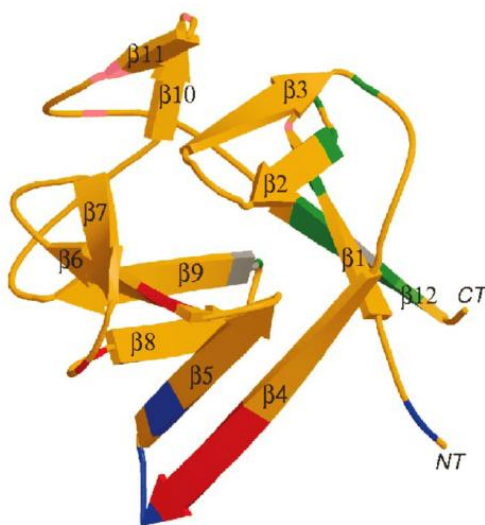


Abb. 11: Dreidimensionale Struktur von bFGF. Die Sekundärstruktur enthält 12 β -Faltblatt-Elemente (β 1-12). Die grün, blau und rot dargestellten Bereiche werden für die Bindung mit dem bFGF-Rezeptor benötigt. Quelle: (Ornitz and Itoh 2001) [4]

bFGF wird von diversen Gewebe- bzw. Zellarten synthetisiert, wie z.B.

- Fibroblasten [139],
- Endothelzellen [139-141],
- Pigmentzellen der Retina[142],
- Gliazellen [143],
- Zellen der Niere [144] oder auch
- Tumorzellen [139, 145, 146].

Allerdings weisen einige Immunlokalisationsstudien eine eingeschränktere Verteilung des bFGF-Antigens in vivo nach [147-149], weswegen der Nachweis von bFGF in manchen Kulturzellen ein Artefakt sein könnte.

Ebenso wie bFGF wurde dessen zugehöriger Tyrosin-Kinase-Rezeptor auf verschiedenen kultivierten Zellen identifiziert [150-152]. Allerdings scheint dieser Rezeptor auch durch bFGF-ähnliche Faktoren, wie z.B. aFGF (Acidic Fibroblast Growth Factor), aktiviert zu werden und umgekehrt scheint bFGF auch andere Rezeptore mit einer niedrigeren Affinität binden und diese aktivieren zu können [150, 153]. bFGF wirkt über diese Rezeptoren sowohl autokrin als auch parakrin [143, 154].

Die Funktion von bFGF ist vielfältig. In Studien wurde nachgewiesen, dass bFGF eine Proliferation von SMCs [155-157], Fibroblasten [155] und Endothelzellen [155, 156, 158] bewirkt. Zudem kann bFGF eine Intima-hyperplasie [155] über Apoptoseinhibition von SMCs in der Intima [159] und über autokrine Stimulation [154] verursachen, womit eine Neointimabildung und damit verbundene Stenosierung der Gefäße entstehen kann [160-164]. Über seinen Einfluss auf spezifische Zellarten wirkt bFGF direkt angiogen und sowohl Apoptose induzierend als auch tumorigen[158, 165-167].

Außerdem kann bFGF die Expression anderer Zytokine beeinflussen, wie z.B. von TGF- β 1 [166], wodurch bFGF indirekt eine Vielzahl weiterer Signalwege und Mechanismen beeinflussen kann.

2.2. CRABP-I (Cellular Retinoic Acid Binding Protein I)

CRABP-I ist ein intrazelluläres Protein, welches hoch konserviert bei allen Vertebraten vorkommt. Es ist aus 36 Aminosäuren aufgebaut und besitzt eine relative Molekülmasse von 16 kDa. Das zugehörige Gen liegt beim Menschen auf dem q-Arm des Chromosom 15 [168].

Exprimiert wird CRABP-I in zahlreichen Geweben, wo es als intrazelluläres Bindungsprotein von Retinsäure, dem aktiven Metaboliten von Vitamin A, fungiert [169, 170].

Vitamin A bzw. dessen Derivate sind pleiotrope Moleküle mit wichtigen Funktionen im Bereich Embryogenese, Hämatopoese, Immunsystem, Tumorgenese, Infektion u.v.a.m. [171]. Unter anderem wirken sie durch kritische Regulation von Wachstum und Differenzierung von z.B. Epithelzellen oder auch vSMCs [172]. Bei vSMCs hemmen sie die Wachstumsfaktor stimulierte Proliferation und damit die Neointimabildung vermutlich über eine Modulation der Expression von entsprechenden Wachstumsfaktoren, wie z.B. bFGF, TGF- β 1 und PDGF (Platelet Derived Growth Factor) [172-180].

Vieles weist darauf hin, dass CRABP-I die intrazelluläre Gleichgewichtskonzentration von Retinoiden über eine Hochregulierung von metabolisierenden Enzymen und einer damit verbundenen erhöhten Degradationsrate von Retinsäure moduliert [170, 179, 181]. Unter dieser Voraussetzung könnten alle durch Vitamin A bzw. dessen Derivate verursachten Funktionen indirekt durch CRABP-I beeinflusst und verändert werden (s. Abb. 12).

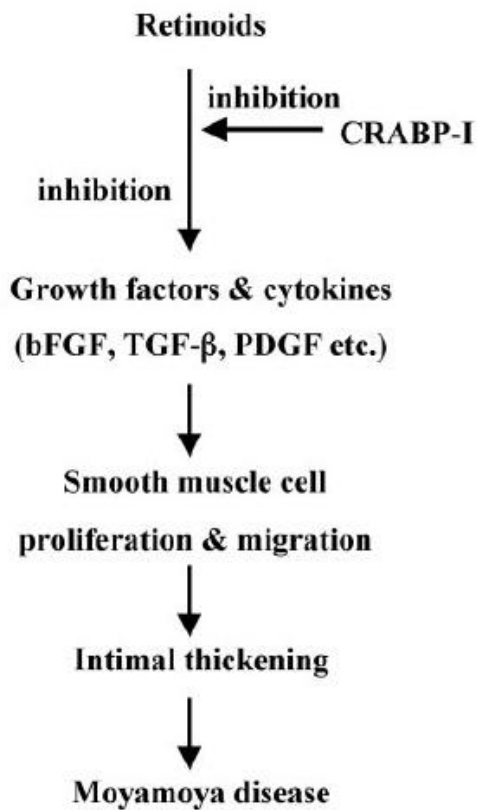


Abb. 12: Möglicher Wirkmechanismus von CRABP-I und dessen Verknüpfung zu MMD. Retinoide, wie z.B. Retinsäure vermindern die durch Wachstumsfaktoren stimulierte Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen. Hierdurch verhindern Retinoide eine Intimahyperplasie, welche kennzeichnend ist für MMD. Durch die Negativregulation der Retinoide durch CRABP-I wird dieser Mechanismus gestört. Quelle: (Kim, Yoo et al. 2003) [1]

Vor diesem Hintergrund konnten z.B. Boylan et al. [179] zeigen, dass bei Überexpression von CRABP-I eine höhere Konzentration von RA benötigt wird um die Differenzierung von SMCs zu initiieren.

Es bleibt anzumerken, dass die genaue Funktion von CRABP-I noch nicht vollständig geklärt ist, weswegen eine Diskussion bezüglich einer Involvierung von CRABP-I bei der Genese von MMD bislang nur eingeschränkt möglich ist.

2.3. PDGF (Platelet Derived Growth Factor)

2.3.a. Isoformen

PDGF wurde 1974 erstmalig in Affenblutserum entdeckt [182] und in den späten siebziger Jahren aus Thrombozyten isoliert [183].

Es ist ein kationisches, aus zwei Polypeptidketten bestehendes Homo- oder Heterodimer, von welchem bis heute fünf verschiedene Isoformen bekannt sind: PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC und PDGF-DD [184-190].

Die jeweiligen Polypeptidketten sind über intermolekulare Disulfidbrücken verbunden, wobei auch bei Mutation und damit verbundener Inaktivierung dieser Disulfidbrücken noch eine agonistische Wirkung an PDGF-Rezeptoren festgestellt werden konnte. Dies wird auf die Bildung nonkovalenter intermolekularer Bindungen und den Erhalt der dreidimensionalen Struktur der jeweiligen Untereinheit durch intramolekulare Disulfidbrücken zurück geführt [191-193].

Die auf den Chromosomen 7 und 22 gelegenen Peptidketten PDGF-A und PDGF-B weisen in ihrer Aminosäuresequenz eine 60%ige Homologie zueinander auf. Zudem findet sich eine Ähnlichkeit der Primär- und damit auch Sekundär- und Tertiärstruktur zu VEGF und der Tertiärstruktur zu weiteren Wachstumsfaktoren, wie z.B. TGF- β .

Die erst später entdeckten und bislang weniger untersuchten Polypeptidketten C und D befinden sich auf den Chromosomen 4 und 11 und haben im Gegensatz zu ihren Vorgängern eine zusätzliche N-terminale CUB-Domäne, die vor Interaktion mit den entsprechenden PDGF-Rezeptoren extrazellulär proteolytisch abgespaltet werden muss [194, 195].

PDGF wird in vielen verschiedenen Zellarten synthetisiert und exprimiert (s. Tab. 3).

Tab. 3: Synthese- und Expressionsorte der verschiedenen PDGF-Ketten. Quelle: s. Tabelle

	PDGF-A	PDGF-B	PDGF-C	PDGF-D
Blut- & Gefäßsystem	- Endothelzellen [196, 197] - SMCs [197-199] - Makrophagen [200] - Thrombozyten/ Megakaryozyten [201]	- Endothelzellen [196, 197] - SMCs [197-199] - Makrophagen [200] - Thrombozyten/ Megakaryozyten [197, 201]	- SMCs [202] - Thrombozyten [203] - Endothelzellen [204] - Makrophagen [205]	- Adventitia [206] - Endothelzellen [206] - SMCs [207]
ZNS & PNS	- Astrozyten [208], - Schwannzellen [209], - Neurone [210]	- Astrozyten [208], - Schwannzellen [209] - Neurone [211]	- ZNS [212]	- ZNS [212]
Weitere Organe	- Lunge: Epithelzellen [197] - Niere: Mesangiumzellen [197] - Uterus: Endometrium, Zytotrophoblast [197, 213] - Ovar: Oozyte [214] - Testis: Leydigzellen [215] - Retina: Pigmentepithelzellen [216]	- Niere: Mesangiumzellen [197] - Uterus: Endometrium, Zytotrophoblast [197, 213] - Testis: Leydigzellen [215] - Retina: Pigmentepithelzellen [216]	- Lunge: Epithelzellen, Mesenchymzellen, SMCs, Bronchien [212] - Retina: Pigmentepithelzellen [217]	- Retina: Pigmentepithelzellen [217]
Sonstige	- Fibroblasten [197, 218] - Keratinozyten [219]	- Fibroblasten [197, 218] - Keratinozyten [219]		

Von den meisten Zellen werden sowohl die A- als auch die B-Kette gebildet, wobei die Induktion der Synthese der beiden Ketten sowohl transkriptionell als auch posttranskriptionell unabhängig voneinander reguliert wird [220].

Als die Syntheserate positiv beeinflussende Faktoren konnten u.a. verschiedene Wachstumsfaktoren, eine niedrige Sauerstoffspannung oder auch Thrombin nachgewiesen werden [221-223].

Die zur Verfügung stehende Menge an PDGF hängt jedoch nicht nur von der Syntheserate ab, sondern wird auch durch lösliche und extrazelluläre Matrix-Komponenten beeinflusst, welche in der Lage sind mit PDGF zu interagieren und dieses zu binden [224-228].

2.3.b Rezeptoren

Die Wirkung von PDGF wird über die strukturell verwandten α - und β -Rezeptoren vermittelt. Die Gene der Rezeptoren befinden sich auf den Chromosomen 4 und 5 [229, 230]. Nach Transkription, Translation und proteolytischer Spaltung entstehen die funktionsfähigen Endformen der Rezeptoren mit einer Größe von ca. 170 und 180 kDa.

Sie bestehen extrazellulär aus fünf Immunglobulin-ähnlichen Domänen und intrazellulär aus einer Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität [230-232].

Die klassischen Zielzellen für PDGF, glatte Muskelzellen und Fibroblasten, exprimieren sowohl α - als auch, in der Regel in einer größeren Anzahl, β -Rezeptoren. Einige andere Zellen exprimieren nur eine Art von Rezeptor, wie z.B. Thrombozyten nur α -Rezeptoren [233] und kapilläre Endothelzellen der Maus nur β -Rezeptoren [234]. Die nachfolgende Tabelle 4 gibt einen Überblick über Zellen, welche PDGF-Rezeptoren exprimieren und damit responsibel sind für PDGF (s. Tab. 4).

Tab. 4: Zelluläre Expression von PDGF-Rezeptoren. Quelle: s. Tabelle

	α -Rezeptor	β -Rezeptor
Blut- & Gefäßsystem	<ul style="list-style-type: none"> - SMCs [197, 235] - Thrombozyten/Megakaryozyten [233, 236] 	<ul style="list-style-type: none"> - SMCs [197, 235] - Megakaryozyten [236] - Makrophagen [237-239] - Endothelzellen [234, 240] - Perizyten [241, 242] - T-Zellen [243, 244] - Myeloische hämatopoetische Stammzellen [243, 244]
ZNS & PNS	<ul style="list-style-type: none"> - Schwannzellen [209, 245, 246] - Neurone [247, 248] - Astrozyten [249] 	<ul style="list-style-type: none"> - Schwannzellen [209, 245, 246] - Neurone [247, 248]
Weitere Organe	<ul style="list-style-type: none"> - Niere: Mesangiumzellen [250] - Leber: Sinusendothelzellen [251] - Testis: Leydigzellen [215] - Auge: Retinapigmentepithelzellen [252] 	<ul style="list-style-type: none"> - Niere: Mesangiumzellen [250] - Leber: Ito-Zellen [251, 253] - Testis: Leydigzellen [215] - Auge: Retinapigmentepithelzellen [252]
Sonstige	<ul style="list-style-type: none"> - Fibroblasten [197, 235] 	<ul style="list-style-type: none"> - Fibroblasten [197, 235] - Myoblasten [254]

Die Expression von PDGF-Rezeptoren wird durch verschiedene Faktoren zusätzlich beeinflusst. Sie ist damit nicht immer konstant auf jeder Zelle. So kann z.B. durch Entzündung die in vivo nur sehr geringe Menge an β -Rezeptoren auf Bindegewebszellen stark erhöht werden [255].

2.3.c. Signalwege

Bei Interaktion zwischen PDGF und Rezeptor bindet PDGF, bedingt durch seine dimere Form, jeweils zwei Rezeptoren gleichzeitig [256-258].

Es existiert eine Selektivität zwischen den Rezeptoren und PDGF-Untereinheiten, d.h. bestimmte PDGF-Isoformen können nur an bestimmte Rezeptoren

binden. Der α -Rezeptor bindet die A-, B- und C-Kette mit hoher Affinität, der β -Rezeptor hingegen nur die B- und D-Kette. Hieraus ergibt sich das in Abbildung 13 dargestellte Interaktionsmuster zwischen den jeweiligen PDGF-Isoformen mit den Rezeptoren [185-187, 259-262].

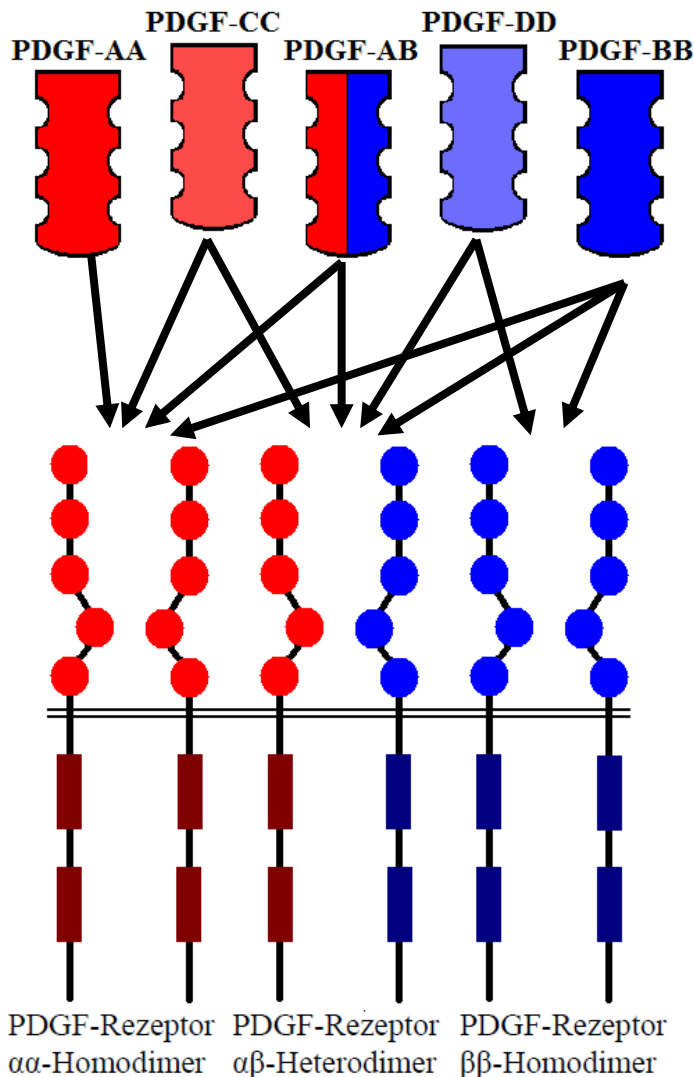


Abb. 13: Rezeptorspezifische Bindungsfähigkeit der fünf PDGF-Isoformen an die homo- bzw. heterodimeren PDGF- α - oder PDGF- β -Rezeptoren.

Pfeile bedeuten die Fähigkeit zur Bindung und Aktivierung des entsprechenden Rezeptors.

Quelle: modifiziert nach (Heldin and Westermark 1999) [3]

Nach Bindung von PDGF wird der Rezeptor-Ligand-Komplex internalisiert und ein Endosom gebildet [263]. Über Autophosphorylierung und Aktivierung einer intrazellulären Kinasedomäne [264, 265] werden innerhalb kürzester Zeit eine Vielzahl von intrazellulären Signalkaskaden aktiviert, die z.B. die Transkription verschiedener Gene beeinflussen. Involviert sind hierbei u.a. die Phosphatidyl-

inositol 3-Kinase (PI 3-Kinase), Phospholipase C (PLC)- γ und das GTPase aktivierende Protein (GAP) für Ras und Mitglieder der Stat-Familie [266].

Durch die gleichzeitige Aktivierung von stimulierenden und inhibierenden Signalen ergibt sich eine exakte Modulation der Stärke des entstehenden Signals.

Die Beendigung des Signals erfolgt durch Dissoziation des Liganden vom Rezeptor im Endosom. Nachfolgend wird der Rezeptor entweder recycelt und zurücktransportiert an die Zellmembran oder das Endosom verschmilzt mit einem Lysosom, wodurch der gesamte Rezeptor-Ligand-Komplex degradiert wird. Zweitgenannter Mechanismus wird häufiger beobachtet. Eine weitere Möglichkeit der Degradierung des Rezeptors besteht durch Abbau in Proteasomen nach Ubiquitinierung [267, 268].

2.3.d. Physiologische Funktionen von PDGF

PDGF ist ein Zytokin mit verschiedenen Funktionen. Auf zellulärer Ebene beeinflusst PDGF als potentes Mitogen

- das Zellwachstum [197, 235],
- Chemotaxis [269-275],
- interzelluläre Kommunikation über GAP junctions [276] und
- Zellüberleben über Inhibition von Apoptose [277].

Diese Funktionen werden vorwiegend auf autokrinem und parakrinem Weg vermittelt [278].

Über Inaktivierung von PDGF-A [279] und PDGF-B [280] und der α - [281] und β -Rezeptoren [282] in Mäusen konnte die Funktion von PDGF in vivo genauer untersucht und spezifiziert werden.

In vivo beeinflusst PDGF u.a. die embryologische Entwicklung, das ZNS, das vaskuläre System, die Gewebshomöostase und die physiologische Wundheilung.

Embryologische Entwicklung:

Jede Maus, welche eine Mutation im Bereich von PDGF bzw. dessen Rezeptoren besaß, starb in Untersuchungen während der Embryogenese oder

perinatal, was die Unentbehrlichkeit von PDGF während der Embryogenese belegt.

Bei Inaktivierung von PDGF-B kommt es u.a. zu Fehlbildungen an Gefäßen mit charakteristischen Blutungen sowie an Niere, Herz und Lunge, bei Inaktivierung des β -Rezeptors zu Fehlbildungen an Gefäßen, Niere und mesenchymalen Geweben [241, 280, 282].

ZNS und PNS:

Im Nervensystem konnte PDGF und dessen Rezeptoren in vitro und in vivo in verschiedenen Zellen nachgewiesen werden, wie z.B. in verschiedenen Neuronen und Oligodendrozyten [208-212, 245-249].

Sowohl während der Embryogenese [210, 247, 283, 284] als auch bei adulten Zellen [210, 281, 283] scheint PDGF ein wichtiger Faktor zu sein.

Auch wenn noch viele Fragen ungeklärt sind, so scheint doch einiges darauf hinzudeuten, dass PDGF involviert ist in Myelinisierungsprozesse sowohl im ZNS als auch im PNS [285] und dass PDGF v.a. im Gehirn einen neuroprotektiven und neurotrophen Effekt hat. Es ist damit von großer Bedeutung für Reparatur- und Regenerationsprozesse im Gehirn. Dies schlossen u.a. auch Hermanson et al., welche eine erhöhte Expression von PDGF und dessen Rezeptoren in Infarktgewebe in menschlichem Hirngewebe nachweisen konnten [286-288].

Vaskuläres System

Einige Zellen des Blut- und Gefäßsystems exprimieren PDGF bzw. dessen Rezeptoren (s. o.), da PDGF auch im Gefäßsystem wichtige Aufgaben erfüllt. So enthalten z.B. Thrombozyten in ihren α -Granula neben anderen Faktoren PDGF, welches bei Aggregation freigesetzt wird. Über die ebenfalls auf Thrombozyten exprimierten α -Rezeptoren können nun die freigesetzten PDGF-Dimere im Sinne eines negativen Feedbackmechanismus die Aggregation herunter regulieren [233, 289].

Weiterhin besitzt PDGF angiogene Eigenschaften. Diese sind jedoch weniger stark ausgeprägt als z.B. bei VEGF und FGF. Da entsprechende Knockout-

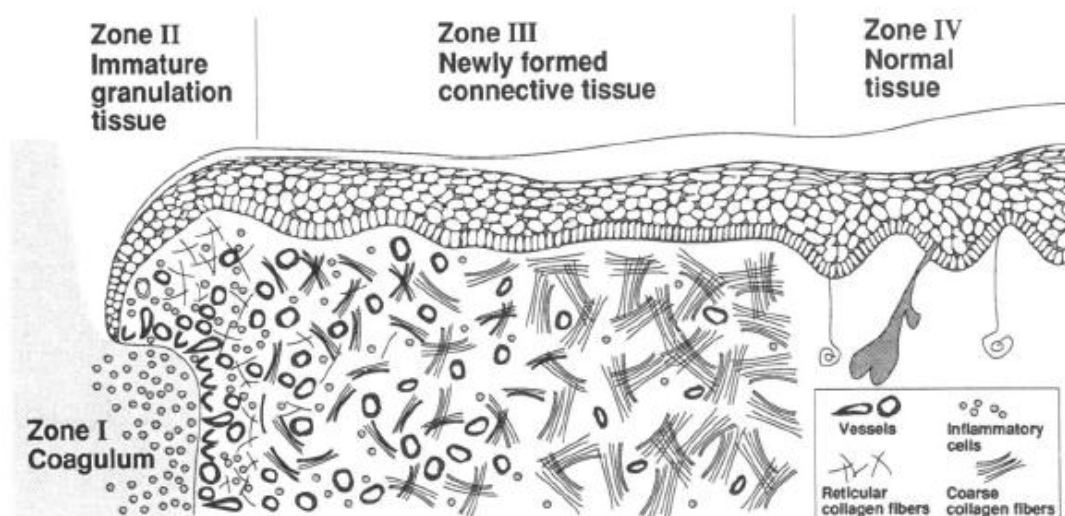
Mäuse in der frühen Embryogenese keine allgemeine Störung der Gefäßbildung aufwiesen, scheint PDGF keine tragende Rolle bei der Initiierung der Gefäßbildung zu spielen. Allerdings wurden Gefäßanomalitäten in einzelnen Organen festgestellt, welche auf eine organspezifische Mitbeteiligung von PDGF an der Gefäßbildung schließen lässt.

Weiterhin kann PDGF-BB die Bildung funktioneller Anastomosen in vivo induzieren [290, 291].

In Kapillaren produzierte PDGF-B-Ketten scheinen darüber hinaus noch eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der strukturellen Integrität von Blutgefäßen zu spielen. PDGF-B-Ketten haben vermutlich die Fähigkeit Perizyten zu rekrutieren, welche für die Stabilität von Gefäßen und für Neoangiogenese wichtig sind [241, 242].

Wundheilung

Die Wundheilung von Weichteilgewebe ist ein physiologischer Prozess, der den körpereigenen Verschluss einer Wunde durch weitestgehende Wiederherstellung des beschädigten Körpergewebes bezeichnet. Der Prozess läuft nach einem festen Schema in vier Phasen ab (s. Abb. 14 und Tab. 5).



**Abb. 14 und Tab. 5: Die vier Wundheilungsphasen (in „Zonen“ unterteilt).
Quelle: (Reuter Dahl, Sundberg et al. 1993) [292]**

Zone	Tag	Phase	Beschreibung
I	0-1	Latenzphase	Blutgerinnung und Vasokonstriktion von verletzten Gefäßen zum Stopp der akuten Blutung
II	1-3	Exsudationsphase	Austritt von entzündungszell- und mediatorreichem Wundsekret
III	4-12	Proliferationsphase	Proliferation von neuem Bindegewebe und Neovaskularisation zur Bildung von Granulationsgewebe
IV	> 13	Regenerationsphase und Maturation	Reepithalisierung und Reifung des darunterliegenden Gewebes

In allen o.g. Stadien sind verschiedene Wachstumsfaktoren zur Regulation notwendig [293, 294]. Einer davon ist PDGF, welcher mit seinen Rezeptoren in Wunden in vivo nachgewiesen werden konnte. PDGF wird synthetisiert und in die Wundflüssigkeit [295, 296] sezerniert von

- Thrombozyten und aktivierten Makrophagen [200, 292],
- Thrombin-stimulierten Endothelzellen [222],
- glatten Muskelzellen von beschädigten Arterien [297],
- aktivierten Fibroblasten [218] und
- epidermalen Keratinozyten [219].

Bei gesunder Haut und nichtheilenden Hautulzera ist PDGF dagegen nicht nachweisbar [298].

Auch die PDGF-Rezeptoren sind in Fibroblasten und glatten Muskelzellen in ruhendem Gewebe nur gering exprimiert. Während einer Entzündung, in menschlichen Zahnfleischwunden und in chronischen Hautwunden wurde hingegen eine erhöhte Expression des β -Rezeptors gefunden [255, 292, 299-301]. Außerdem wurde sowohl der β -Rezeptor als auch der α -Rezeptor bei gestörter Wundheilung bei diabetischen Mäusen als vermindert nachgewiesen [302].

Weitere Hinweise für die Beteiligung von PDGF an der Wundheilung sind Studien, welche belegen, dass PDGF viele in die physiologische Wundheilung involvierte Zellarten beeinflusst.

Es stimuliert

- Mitogenität und Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen [235].
- Makrophagen zur Bildung und Sekretion von für die Wundheilung benötigter Wachstumsfaktoren und Matrixmoleküle, wie z.B. Fibronectin [303], Proteoglykane [304] und Hyaluronsäure [305].
- Fibroblasten zur Bildung und Sekretion von Kollagen, welches speziell in den Phasen der Proliferation und Regeneration von großer Bedeutung ist [306] u.v.a.m. .

Schließlich konnte auch noch nachgewiesen werden, dass direkte Applikation von PDGF in vivo einen positiven Effekt auf die Wundheilung ausübt. Hierbei beeinflusst PDGF die Intensität und Geschwindigkeit, nicht jedoch die normale Abfolge der Wundheilungsphasen.

Durch PDGF wird eine verstärkte Bildung von Granulationsgewebe [307, 308], u.a. durch Induktion von Fibroblastenproliferation und –differenzierung [309], eine schnellere Epithelialisierung und eine schnellere Neovaskularisation ermöglicht [310-312].

2.3.e. Rolle von PDGF bei pathologischen Prozessen

Tumor

Sowohl bei in vitro als auch bei in vivo Untersuchungen konnte ein tumorigener Effekt von PDGF nachgewiesen werden.

Beim Menschen wurde ein Zusammenhang zu Tumoren festgestellt wie z.B. zu Hirntumoren [313, 314], Weichteiltumoren [315], oder auch hämatopoetischen Tumoren [316, 317].

Arteriosklerose

Arteriosklerose ist nach Ross et al. eine fibroproliferative Krankheit mit entzündlicher Komponente [318]. Mehrere Untersuchungen konnten eine verstärkte Expression von PDGF und dessen Rezeptoren bei natürlich aufgetretener Arteriosklerose [255, 319-321] nachweisen. Zudem konnte aber auch bei experimentell induzierter Arteriosklerose [322, 323], nach Gefäßwandschäden durch Ballonkatheter verursachte [324-326], und bei Koronararterien nach perkutaner transluminaler Koronarangioplastie [327] eine erhöhte PDGF-Expression nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass PDGF eine tragende Rolle spielt bei der Pathogenese der Arteriosklerose bzw. anderen Erkrankungen, die mit Gefäßwandschäden und nachfolgender fibroproliferativer, entzündlicher Reaktion assoziiert sind.

Bislang ist die genaue Ursache für die erhöhte Expression von PDGF und dessen Rezeptoren bei Arteriosklerose nicht bekannt. Möglich wäre eine Induktion der Expression durch externe Stimuli, aber auch z.B. durch rheologische Veränderungen: niedrige Blutflüsse führen nach Untersuchungen von Kraiss et al. und Mondy et al. zu einer erhöhten Produktion von PDGF durch Endothelzellen [328, 329].

Untersuchungen mit Hilfe von experimenteller Ballonkatheterisierung an Rattenarterien legen nahe, dass PDGF eine wichtige Rolle spielt bei Intimahyperplasie, wobei vor allem PDGF-BB und der PDGF- β -Rezeptor diesbezüglich von Relevanz zu sein scheinen [330-332].

Nach Pompili et al. könnte eine mögliche Funktion von PDGF die Stimulation einer SMC-Migration von der Media in die Intima, der Stimulation dortiger Proliferation und der Induktion der Bildung von Matrixmolekülen sein [332, 333]. Einige Arbeitsgruppen vertreten jedoch auch die Meinung, dass PDGF wichtig ist für die Migration, nicht jedoch für die Replikation von arteriellen SMC bei der Neointimabildung [334].

Fibrose

Die bereits erwähnte Induktion der Bildung von Matrixmolekülen durch PDGF spielt auch bei fibrotischen Erkrankungen eine wichtige Rolle. So konnte eine Überaktivität von PDGF u.a. bei verschiedenen fibrosierenden Lungenerkrankungen gezeigt werden, wie z.B. bei idiopathischer Lungenfibrose [335], und mit Fibrose assoziierte hypoxische pulmonale Hypertension [336]. Außerdem zeigten sich experimentell bei intratrachealer Applikation von PDGF-BB eine vermehrte Kollagendeposition [337] und eine Inhibition von Lungenfibrose durch PDGF-Antikörper im Mausmodell [338].

Auch bei fibrotischen Erkrankungen anderer Organe, wie z.B. der Niere, [339], und der Leber [253, 340, 341], scheint PDGF eine wichtige Rolle zu spielen.

2.4. TGF- β (Transforming Growth Factor Beta)

2.4.a. TGF- β Superfamilie

Erstentdeckung

Die TGF- β Superfamilie besteht aus vielen verschiedenen Zytokinen, welche auf Grund ihrer Sequenzhomologien in vier große Subgruppen aufgeteilt werden: die TGF- β Familie, die GDNF (Glial Cell Line Derived Neurotrophic Factor) Familie, Aktivine und die DVR (Decapentaplegic and Vegetal-1-Related group) Familie. Zudem werden einige entfernter verwandte Moleküle zur TGF- β -Superfamilie gezählt, wie z.B. das Anti-Müller-Hormon (AMH) (s. Abb. 15). Insgesamt umfasst die TGF- β Superfamilie über 50 verschiedene, evolutionär hoch konservierte Proteine, die eine wichtige Rolle in der Regulation von Zellwachstum und -differenzierung spielen und essentielle Funktionen in der Embryogenese übernehmen [342].

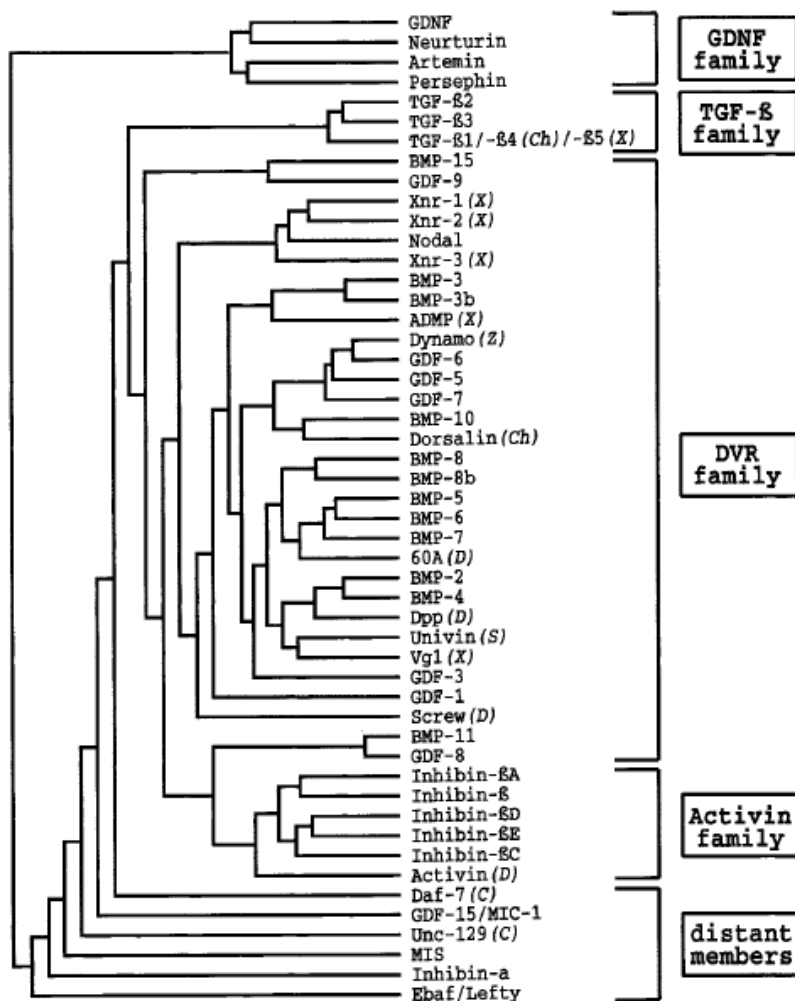


Abb. 15: Dendrographische Darstellung der Verwandtschaften verschiedener Mitglieder der TGF- β -Superfamilie untereinander. Quelle: (Bottner, Kriegelstein et al. 2000) [343]

Bereits 1981 wurde die erste Isoform dieser Gruppe entdeckt, heute unter dem Namen TGF- β 1 bekannt. Roberts et al. und Moses et al. entdeckten die Fähigkeit von TGF- β 1, Wachstum und Transformation verschiedener Zelllinien unter bestimmten kulturellen Bedingungen zu induzieren, woraus der heutige Name abgeleitet wurde [344, 345].

2.4.b. TGF- β Familie

Isoformen

Die TGF- β Familie umfasst eine sehr einheitliche Gruppe aus dimeren Proteinen, von denen bis heute fünf verschiedene TGF- β Isoformen isoliert wurden, TGF- β 1, 2, 3, 4 und 5. Im Menschen existieren jedoch nur TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3 [346-351]. Diese befinden sich auf Chromosom 19 (TGF- β 1), Chromosom 1 (TGF- β 2) und Chromosom 14 (TGF- β 3) und ihre Sequenzen sind bis zu 80% homolog zueinander [352].

Auch wenn sich die Isoformen in ihren biochemischen Eigenschaften sehr ähnlich sind, unterscheiden sie sich stark in Bezug auf Lokalisation, Funktion und Bedeutung. Abhängig von der vorliegenden Isoform, Zielzelle und vorhandenen anderen Zytokinen [131] beeinflussen die Isoformen von TGF- β eine Vielzahl von Zell- und Gewebefunktionen, wie z.B.

- Zellproliferation und –differenzierung [353, 354],
- Embryogenese [355, 356],
- Bildung von EZM [357],
- Angiogenese [358],
- Chemotaxis [359],
- Wundheilung [356, 360, 361],
- Hämatopoese [362] und Immunfunktionen [363-365].

Auch im ZNS ist TGF- β involviert u.a. für Reparaturmechanismen [366, 367] und die Regulierung des Überlebens von Neuronen [368].

Die Gewebe- bzw. Zellarten, die von TGF- β beeinflusst werden, umfassen

- das Mesenchym (Fibroblasten),
- die Muskeln (Skelett-, Herz- und glatte Muskelzellen),
- Knochen (Osteoblasten),
- das hämatopoetische (Knochenmarkszellen),
- das hämatologische und das Immun-System (Thrombozyten, B-, T-Zellen, Monozyten/Makrophagen) sowie
- Endothel und Epithel (Endothelzellen, Hepatozyten, Keratinozyten)

(Review: [369]).

Grundstruktur & Signalwege

Die drei menschlichen TGF- β -Isoformen werden alle nach dem gleichen Prinzip als Prä-Pro-Proteine synthetisiert und exozytiert, d.h. sie bestehen aus dem eigentlichen Protein mit einer relativen Molekülmasse von 12,5 kDa, einer Prodomäne und einem aminoterminalen hydrophoben Signalpeptid. Wie in Abbildung 16 (s.u.) dargestellt, werden aus je zwei TGF- β -Proteinen mit anhängender Prodomäne Homodimere gebildet, „kleine latente Komplexe“ (Engl.: Small Latent Complex, kurz: SLC) genannt. Die Dimerisation wird hauptsächlich durch hydrophobe Wechselwirkungen ermöglicht. Zusätzlich wird sie durch Bildung einer Disulfidbrücke über einen von insgesamt sieben, pro Kette vorhandenen, Cysteinresten stabilisiert. Die anderen sechs Cysteinreste bilden einen sogenannten Cystein-knoten über intramolekulare Disulfidbrücken, welcher zur Sekundär- und Tertiärstruktur der TGF- β Untereinheiten beiträgt [370-373]. Jeder SLC kann mit einem latenten TGF- β bindenden Protein (Engl.: Latent TGF- β Binding Protein, kurz: LTBP) einen sogenannten „großen latenten Komplex“ (Engl.: Large Latent Complex, kurz: LLC) bilden, welcher nach Sekretion an die EZM gebunden wird. Die Aktivierung von TGF- β erfolgt entweder über Freisetzung von TGF- β aus den matrixgebundenen LLC über Proteasen oder schneller über Exozytose von SLC und proteolytischer Abspaltung der anhängenden Prodomänen [374-379].

In vitro können diese Mechanismen z.B. durch pH-Wert, Temperatur, verschiedene Glycosidasen und die Protease Plasmin beeinflusst bzw. induziert werden [380-383].

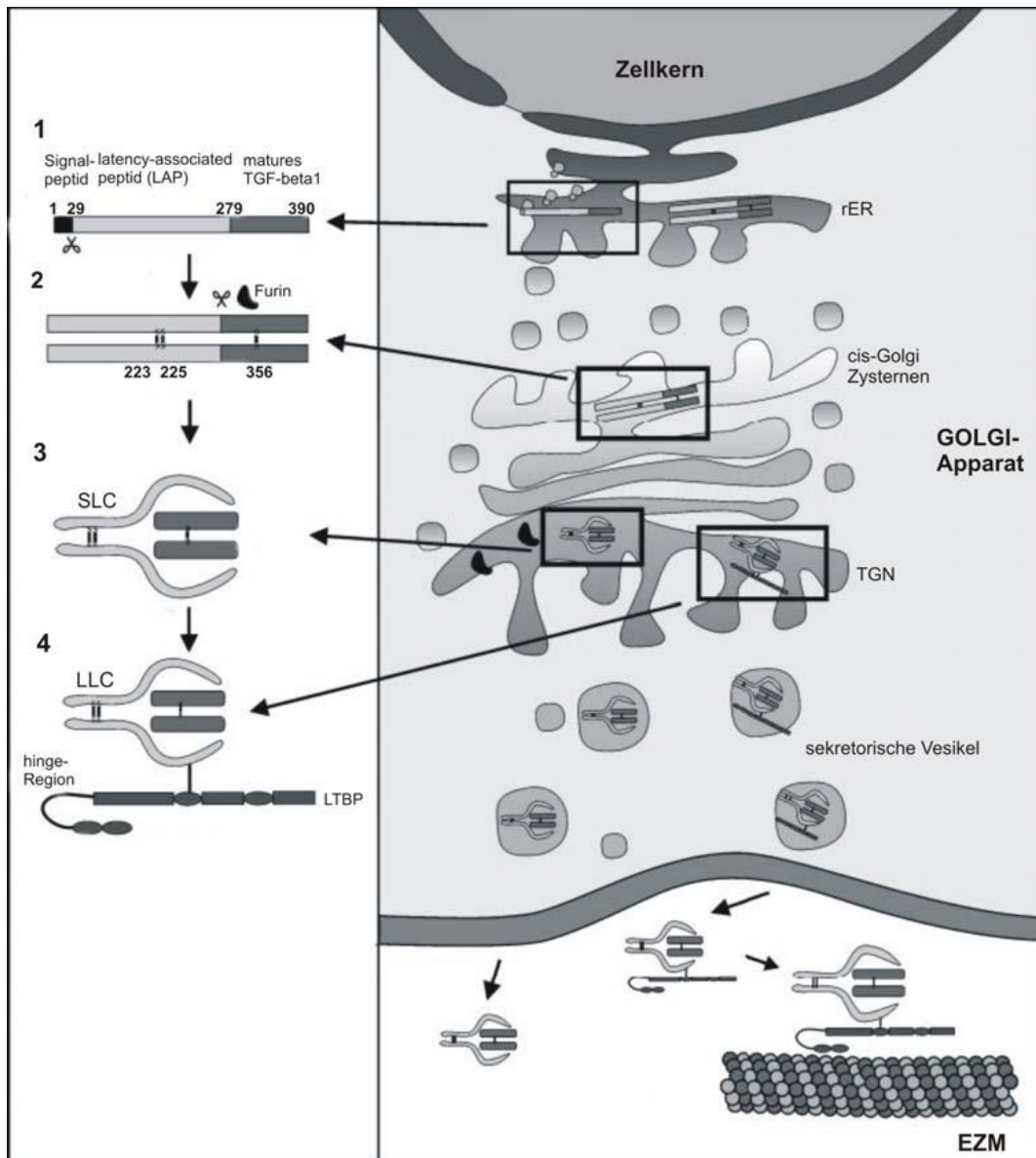


Abb. 16: TGF-β1 Synthese und Sekretion.

1: Das Signalpeptid veranlasst die Synthese des Prä-Pro-Proteins am rauhen endoplasmatischen Retikulum (ER). Während der Translokation ins Lumen erfolgt die Abspaltung der hydrophoben Signalsequenz.

2: Das Vorläuferprotein dimerisiert unter Ausbildung von Disulfidbrücken und wird zu den cis-Golgi Zysten transportiert.

3: Post-translationell katalysiert die Proteinkonvertase Furin im Golgi-Apparat die Endoproteolyse des dimeren Pro-Proteins. LAP und TGF-β1 bleiben nicht kovalent verbunden und bilden den SLC.

4: Der SLC kann über eine Disulfidbrücke mit einem singulären LTBP verknüpft werden. Der Komplex wird als LLC bezeichnet. Über das Bindungsprotein LTBP kann der LLC kovalent mit der EZM verbunden werden. Quelle: (Janssens, ten Dijke et al. 2005) [384]

2.4.c. Rezeptoren

Die Wirkung der menschlichen TGF- β Isoformen 1,2 und 3 werden durch den TGF- β Rezeptor Typ I (TbR-I; 53 kDa), Typ II (TbR-II; 70–100 kDa), und Typ III (TbR-III; 200–400 kDa) vermittelt [342].

Für die Signaltransduktion sind TbR-I und –II verantwortlich, wohingegen TbR-III, bestehend aus Betaglycan und Endoglin, nur eine modulierende Wirkung für den Zugang der Liganden zu den Rezeptoren hat [385, 386].

TbR-I und II sind sogenannte Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren, d.h. ihre Wirkung wird intrazellulär durch eine Serin/Threonin-Aktivität vermittelt. Zusätzlich bestehen diese Rezeptoren aus einer kurzen extrazellulären Liganden-bindenden Region und einem einzelnen α -helikalen Transmembransegment [387].

Trotz des prinzipiell gleichen Aufbaus der TbR-I und –II, müssen für die Signaltransduktion beide Rezeptorformen vorhanden sein und miteinander agieren. Da jeder TbR-II nur eine Bindungsstelle für eine Kette der dimeren TGF- β Isoformen besitzt, tetramersieren die als Isohomodimere vorliegenden TbR-II und –I [388, 389]. Nach korrekter Interaktion kommt es zu intrazellulärer Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten. Hierdurch werden wiederum intrazellulär vielfältige Wirkungen induziert über diverse nachgeschaltete Signalkaskaden u.a. mittels sogenannter Smad (Small Mothers Against Decapentaplegic)-Proteine und die MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) [390-394].

2.4.d. TGF- β 1

TGF- β 1 stellt die meist vorhandene und am besten charakterisierte Form der TGF- β - Superfamilie dar. Die evolutionär stark konservierte Form ist sowohl in

Säugetieren als auch in Invertebraten nachweisbar. Hauptquelle für TGF- β 1 sind v.a. Thrombozyten und Knochengewebe [347, 395].

TGF- β 1 hat 3 Hauptwirkungsbereiche:

1. Die zelluläre Ebene: Regulation von Zellproliferation, -differenzierung, -apoptose, -migration
2. Die extrazelluläre Ebene: Produktion von EZM
3. Die immunologische Ebene: Immun- und Entzündungsreaktionen

Hierdurch werden vielfältige sowohl physiologische als auch pathologische Prozesse des Körpers beeinflusst (s. Abb. 17).

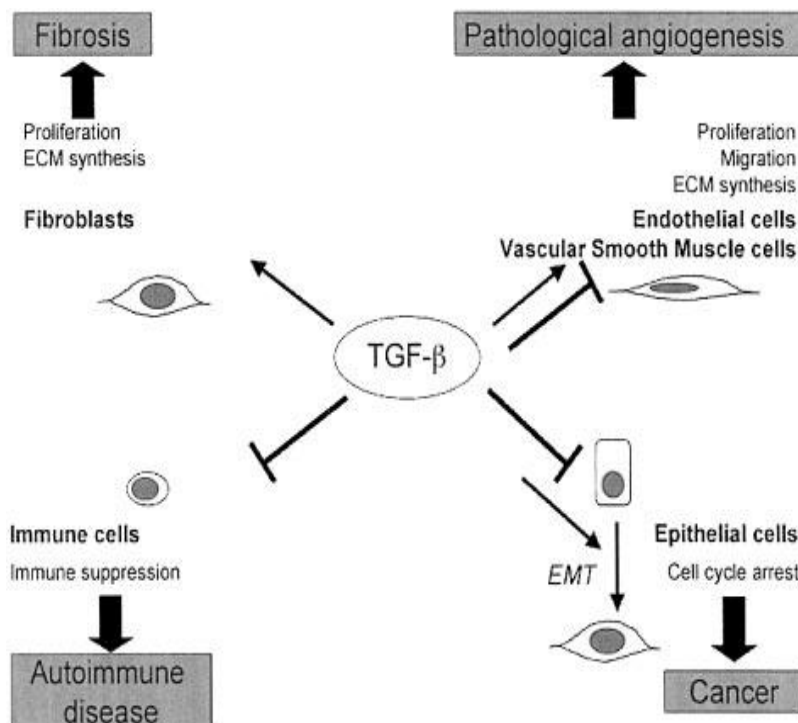


Abb. 17: Diverse durch TGF- β 1 beeinflusste pathologische Prozesse: Fibrose, Gefäßkrankheiten, Autoimmunkrankheiten, Krebs.

Quelle: (Bertolino, Deckers et al. 2005) [396]

Embryonalentwicklung

Bereits 1987 konnten Kimelman et al. nachweisen, dass exogen zugeführte TGF- β Proteine von Säugetieren die Bildung von Mesoderm in Xenopus-Gewebe induzieren können [397]. In den nachfolgenden Jahren wurden die

spezifischen Expressionsmuster der drei menschlichen TGF- β Isoformen mit verschiedenen Methoden in Mausembryogewebe untersucht. Entsprechend dem Expressionsmuster im Mausmodell konnte TGF- β 1 schließlich auch in menschlichen Embryos in verschiedenen Geweben verstärkt exprimiert nachgewiesen werden, v.a. in hämatopoetischen und mesenchymalen Geweben vieler innerer Organe und in endothelialen und osteogenen Geweben [398].

Hinweise für die Relevanz von TGF- β 1 während der Embryogenese finden sich u.a. bei Kallapur et al. . In ihren Untersuchungen führte Knockout von TGF- β 1 bei ca. 50% von TGF- β 1 homozygoten Mutanten und bei ca. 25% von TGF- β 1 heterozygoten Mutanten zum Tod während der Embryogenese [399].

Untersuchungen von Shull et al. und Kulkarni et al. ergaben, dass TGF- β 1 defiziente Mäuse in der 3. bis 5. Woche post partum an multiplen Organentzündungen und Autoimmunprozessen versterben [400, 401].

Gehirn

Während TGF- β 1 in gesunder Gehirnsubstanz und Liquor (Engl.: Cerebrospinal Fluid, kurz: CSF) nicht bzw. nur in geringem Maße nachweisbar ist, findet sich bei einigen pathologischen Veränderungen und Schädigungen des Gehirns eine erhöhte Expression [402]. Hauptexpressionsort von TGF- β 1 sind vor allem die Meningen und der Plexus choroideus, dem Produktionsort von Liquor [403-405].

Sowohl in Zellkulturen als auch in in vivo Modellen konnten vielfältige Funktionen der drei menschlichen TGF- β Isoformen im Gehirn nachgewiesen werden, wie z.B. die Beeinflussung von Proliferation, Funktion und Überleben von Neuronen sowie Gliazellen [406]. TGF- β 1 fungiert hierbei als neuroprotektiver Faktor, u.a. durch eine Steigerung der BCL-2 Produktion, wodurch Neurone vor oxidativem Stress geschützt werden können [407, 408].

Spezifische Krankheitsbilder mit veränderter TGF- β 1 Expression sind z.B. neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Multiple Sklerose und Morbus Parkinson, Gehirntumoren und Läsionen durch Trauma oder Ischämie [367, 402, 406, 409, 410].

Als gemeinsame Ursache lässt sich hierfür eventuell die nach beinahe allen pathologischen Hirnbeeinträchtigungen vorhandene, neurogliale Aktivierung anführen. Diese konnte in Korrelation mit einer erhöhten Expression von TGF- β 1 nachgewiesen werden und spielt eine wichtige Rolle für die Reparatur der geschädigten Hirnstrukturen [411]. Durch erhöhte TGF- β 1 Werte im Hirnwasser können wiederum die Fibrogenese, die Narbenbildung, eine leptomeningeale Zellproliferation und andere gewebliche Umbauprozesse gefördert werden. Dies kann durch Störungen an den Sekretions-, Abfluss- und Resorptionsstellen des Liquors die Entwicklung von Liquorzirkulationsstörungen und einem chronischen HZ begünstigen [412-414].

Nach ischämischem Infarkt konnte TGF- β 1 v.a. im Bereich der Penumbra nachgewiesen werden, nicht aber im Infarktgewebe. Dies ist nach Krupinski et al. vermutlich darauf zurückzuführen, dass durch Hypoxie induzierter Stress neuronaler und astroglialer Zellen die Wachstumsfaktorexpression erhöht. Bei zu starker Schädigung durch Hypoxie ist jedoch die zelluläre Antwort nur noch vermindert oder gar nicht mehr möglich [410]. Außerdem ist eine erhöhte Neoangiogenese im Bereich der Penumbra nachweisbar [415, 416], welche vermutlich auch durch Wachstumsfaktoren, wie z.B. TGF- β 1, induziert wird [417]. Quelle für TGF- β 1 könnten nach Lindholm et al. z.B. Monozyten/Makrophagen sein, welche chemotaktisch angelockt durch eine Schädigung der Blut-Hirnschranke das geschädigte Gewebe infiltrieren können [418].

Immunsystem

TGF- β 1 wird nicht nur von immunkompetenten Zellen, wie z.B. Monozyten/Makrophagen und Lymphozyten produziert [418, 419], sondern beeinflusst diese auch in ihrer Funktion auf parakrinem und autokrinem Weg. So kann TGF- β 1 z.B. die Immunglobulinproduktion von Lymphozyten beeinflussen [420] oder auch Makrophagen aktivieren und deaktivieren [363, 364]. Die Vielfältigkeit und Bedeutung von TGF- β 1 zeigt sich bei Mäusen mit homozygoten Null-Mutationen für das TGF- β 1 Gen, welche zwar ohne sichtbare morphologische Auffälligkeiten geboren werden, aber in den ersten Lebenswochen an massiven Immunzellinfiltrationen in verschiedenen Organen versterben [400,

401]. Dies zeigt, dass TGF- β 1 wichtige immunsuppressive Funktionen ausübt. Auch bei einigen immunsuppressiv wirkenden Krankheiten, wie z.B. verschiedenen Krebsarten, chronisch degenerativen Krankheiten und AIDS deuten die erhöhten TGF- β 1 Level auf eine Mitbeteiligung an der Pathogenese hin [421].

Vaskuläres System

Eine Reihe von Studien konnte in den vergangenen Jahren eine zentrale Rolle des TGF- β 1 für sowohl die Vaskulogenese (d.h. die Bildung eines primitiven Gefäßsystems aus endothelialen Vorgängerzellen) als auch die Angiogenese (d.h. die Ausweitung und der Umbau in ein komplexes Gefäßsystem) nachweisen. Der Funktionsverlust verschiedener Komponenten des TGF- β 1 Signalweges führt hierbei zu einer abnormalen Differenzierung und Reifung des primitiven Gefäßsystems, was zu einer erhöhten Fragilität mit verminderter Integrität der Gefäßwand führt. Abhängig von der betroffenen Komponente des Signalweges wird bereits die Vaskulogenese oder erst zu einem späteren Zeitpunkt die Angiogenese beeinflusst [422].

In vitro Studien ergaben, dass TGF- β 1 die für die Angiogenese wichtige Proliferation und Migration der Endothelzellen sowie die Ablagerung von EZM sowohl induzieren als auch inhibieren kann, abhängig von der Konzentration von TGF- β 1, der Herkunft der Endothelzellen und den Konditionen des Kulturmediums [423].

Zu der direkt angiogenen Funktion agiert TGF- β 1 auch indirekt angiogen durch seine chemotaktischen Eigenschaften auf verschiedene Zellen, welche wiederum proangiogene Zytokine freisetzen können [424].

Die angiogenetische Funktion von TGF- β 1 ist sowohl bei der embryonalen Entwicklung des Gefäßsystems, als auch im adulten Leben von zentraler Bedeutung, bei physiologischen Funktionen, wie z.B. der Wundheilung, und auch bei pathologischen Situationen, wie z.B. Ischämie, Entzündung oder auch bei Tumorwachstum [396].

Tumor

In Bezug auf Tumore kann TGF- β 1 sowohl antiproliferativ und damit antitumorigen wirken als auch proliferativ und damit tumorigen. Es konnten Korrelationen mit einer Reihe von verschiedenen Tumoren nachgewiesen werden, wie z.B. Kolonkarzinom, Magen-Karzinom und hepatozelluläres Karzinom [425-429], wobei oftmals die tumorigene Eigenschaft von TGF- β 1 eng mit der angiogenen Eigenschaft, als Grundvoraussetzung für das Wachstum der Tumoren, korreliert.

Wundheilung

Bei der Wundheilung konnte die genaue Funktion von TGF- β 1 trotz zahlreicher Studien bisher nicht vollständig geklärt werden. Fest steht, dass TGF- β 1 direkt nach Verletzung von Thrombozyten freigesetzt wird [347] und durch seine chemotaktischen Eigenschaften neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Fibroblasten anlockt. Diese wiederum induzieren durch positive Rückkopplung die Synthese von sowohl aktivem TGF- β 1 (Halbwertszeit 2–3 min) als auch der latenten Form (Halbwertszeit 100 min) in vielen verschiedenen Zellen. Durch proteolytisch aktive Enzyme ist damit eine ununterbrochene Bereitstellung von TGF- β 1 während des Heilungsprozesses gewährleistet [430].

Es beeinflusst die Reepithelialisierung sowie die Bildung von Granulationsgewebe und Narbengewebe durch Stimulation von Fibroblastenproliferation, Myofibroblastendifferenzierung, Ablagerung von Matrixgewebe und Angiogenese [358, 430, 431].

Arteriosklerose

Durch die großen Einflussmöglichkeiten auf Gefäßsystem und Bindegewebe spielt TGF- β 1 auch bei der Entstehung der Arteriosklerose eine wichtige Rolle.

Nach Grainger et al. hat TGF- β 1 unter normalen Bedingungen einen antiarteriosklerotischen Effekt und erhält die normale Architektur der Gefäßwand, sofern die in vitro nachgewiesenen Funktionen auch auf Bedingungen in vivo übertragbar sind [432, 433]. TGF- β ist in der gesunden Gefäßwand stark exprimiert und inhibiert in vitro in der Regel die Proliferation und Migration

glatter Muskelzellen [434-437]. Es übt weiterhin ein sehr starkes antiinflammatorisches Signal aus durch Suppression proinflammatorischer Adhäsionsmoleküle in der Gefäßwand [438] und verringert eine Schaumzellbildung von kultivierten Makrophagen [439].

Wird die Funktion von TGF- β 1 gehemmt, so kann dies zu einer verstärkten proinflammatorischen Reaktion mit Leukozytenakkumulation sowie einer erhöhten Proliferation, Migration und Entdifferenzierung von vSMCs in der Gefäßwand führen, was eine wichtige Rolle bei der Genese der Arteriosklerose spielt [433]. Eine weitere wichtige Funktion von TGF- β 1 im Zusammenhang mit Arteriosklerose ist die Induktion der Bildung von EZM. Hierdurch kann bei bereits entstandener arteriosklerotischer Läsion die Stabilität der Plaques erhöht werden und damit die Gefahr einer Embolie durch instabile Plaques verringert werden [440-442].

TGF- β 1 hat damit einerseits die Funktion, die normale Struktur und Funktion der Gefäßwand zu erhalten und andererseits bei schon bestehender arteriosklerotischer Läsion die Stabilität der Plaques zu gewährleisten [432].

3. Hintergrund & Zielsetzung der Studie

Die Idee für das grundsätzliche Design unserer Studie entstand durch ausgedehnte Literaturrecherchen bezüglich bisheriger Erkenntnisse über MMD, mit Schwerpunkt auf histopathologischen und genetischen Untersuchungen.

Wie bereits in Abschnitt A.1.3. (Ätiologie) beschrieben, scheinen vererbte endogene genetische Faktoren ätiologisch von Bedeutung zu sein.

Weiterhin postulieren einige Studien für die in Abschnitt A.1.4. (Pathogenese und Histologie) beschriebenen histopathologischen Veränderungen der Gefäße bei MMD verschiedene Zytokine als (mit)verantwortlich [56, 65, 68].

Diese Annahme resultiert einerseits aus zahlreichen Studien, welche belegen, dass einige Zytokine bei Mechanismen involviert sind, welche auch bei MMD pathogenetisch von Relevanz sind, wie z.B. die Proliferation von glatten Muskelzellen. Andererseits konnten diverse Zytokine im Vergleich mit nicht an MMD erkrankten Kontrollpersonen z.B. im Liquor, Serum oder auch kultivierten glatten Muskelzellen aus Gefäßwänden als verändert exprimiert nachgewiesen werden. Ob die veränderte Expression der Faktoren jedoch als Folge oder als Ursache von MMD angesehen werden kann, ist bislang ungeklärt.

In unserer Studie untersuchten wir spezifische DNS-Abschnitte in oder vor den kodierenden Genbereichen für bFGF, CRABP-I, PDGFR und TGF- β 1 bei einer an MMD-erkrankten Fallgruppe im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe. Die Auswahl der Zytokine bFGF, CRABP-I, PDGFR und TGF- β 1 für unsere Studie basiert u.a. auf Untersuchungen, welche in den folgenden Abschnitten (s. Abschnitt 3.1. bFGF bei MMD bis 3.4. TGF- β 1 bei MMD) ausführlicher dargestellt werden und über den Nachweis einer veränderten Expression dieser Zytokine einen möglichen Zusammenhang mit der Pathogenese von MMD begründen.

Die untersuchten spezifischen DNS-Abschnitte in oder vor den kodierenden Genbereichen o.g. Zytokine sind sogenannte „Single Nucleotid Polymorphisms“ (SNPs, dt.: Einzelbasenmutationen), welche eine spezielle Unterform von genetischen Polymorphismen darstellen.

Genetische Polymorphismen sind DNS-Variationen, welche für die unterschiedliche Ausprägung von bestimmten (phänotypischen) Merkmalen bei den jeweiligen Individuen verantwortlich sind. Als Kriterium für die Bezeichnung Polymorphismus muss das seltenere Allel mit einer Frequenz von $>1\%$ in einer Bevölkerungsgruppe vorhanden sein.

SNPs beschreiben den Unterschied zwischen zwei Individuen nur bezogen auf einzelne Nukleotide (Basenaustausch) und sind für ca. 80%-90% aller bekannten Polymorphismen verantwortlich. Bei Vergleich aller Genome weltweit finden sich schätzungsweise 9-12 Mio. SNPs (also 1/300 Bp), bezogen auf das menschliche Genom beträgt ihre geschätzte Häufigkeit mindestens 1 pro 1000 Basenpaare.

Da sie sehr häufig auftreten, eine hohe interindividuelle Variabilität bei hoher evolutionärer Stabilität aufweisen und sehr schnell und einfach zu bestimmen sind, wie z.B. mit einem einfachen plus/minus Assay, haben SNPs eine große wissenschaftliche Bedeutung,

Obwohl die meisten SNPs nur einen geringen oder keinen Effekt auf die Genregulation und Proteinaktivität haben, verbleiben dennoch eine Vielzahl an Möglichkeiten für eine schädliche Wirkung durch Austausch einzelner Basen. Man geht davon aus, dass SNPs eher nicht die Krankheiten an sich verursachen, sondern beeinflussen, wie ein Individuum auf bestimmte Umweltbedingungen reagiert, und somit das Risiko für bestimmte Krankheiten modifizieren können.

Auch wenn somit in der Regel noch weiterführende Untersuchungen für eine spezifische Aussage über das Krankheitsrisiko bzw. den Einfluss eines SNPs auf eine Krankheit nötig sind, lässt sich dennoch durch die Untersuchung von SNPs eine allgemeine Aussage formulieren bezüglich einer möglichen Korrelation zwischen SNP und Krankheit bzw. eines erhöhten Risikos für eine Krankheit.

Das Vorgehen für die exakte SNP-Auswahl für diese Studie wird im Abschnitt B.2.5. (SNP-Auswahl) beschrieben.

3.1. bFGF bei MMD

bFGF ist bei MMD-Erkrankten immunhistopathologisch verstärkt nachweisbar in der Dura mater [67], in Zellen der STA, wie z.B. SMCs und Endothelzellen [67], und in Zellen von Arterien des Circulus Willisii [66], wohingegen Kontrollen höchstens eine sehr leichte Immunoreaktivität aufweisen [161, 164].

Ebenso ist der bFGF-Rezeptor in einigen Zellarten signifikant erhöht, wie z.B. in SMCs aus der STA von MMD-Patienten [443]. Weiterhin findet sich bFGF signifikant erhöht im CSF [163, 444]. Im Blutserum hingegen findet sich keine signifikante Erhöhung von bFGF, wie eine aktuelle Studie von Kang et al. ergab [445].

Wie bereits im Abschnitt A.2.1. (bFGF) beschrieben, wirkt bFGF direkt angiogen, was die Entstehung der Neovaskularisation bei MMD ermöglichen könnte [161-164, 446]. Gleichzeitig kann bFGF auch eine Intimahyperplasie mit nachfolgender Stenosierung verursachen [154, 155, 159].

Eine weitere wichtige Funktion von bFGF ist die Induktion der Expression von TGF- β 1 [166], womit alle durch TGF- β 1 verursachten Mechanismen auch indirekt durch bFGF verursacht werden können.

Durch Involvierung von bFGF in all diese bei MMD pathogenetisch relevanten Mechanismen, wäre ein ätiologischer Zusammenhang zwischen einer genetisch bedingten veränderten Expression von bFGF und der Pathogenese von MMD durchaus denkbar.

3.2. CRABP-I bei MMD

Bei an MMD-Erkrankten ist CRABP-I im CSF erhöht im Vergleich zu MMD-negativen Kontrollen [1]. Damit wäre, basierend auf den oben erwähnten Untersuchungen von Boylan et al. (s. Abschnitt A.2.2. (CRABP-I)), für die physiologische Wirkung von Retinsäure (atRA) eine entsprechend höhere Menge Retinsäure nötig, was bislang nicht in Zellen von MMD-Patienten untersucht wurde. Retinsäure kann, wie bereits dargestellt, eine Vielzahl anderer Zytokine beeinflussen und auch selbst über komplexe Signalwege eine

Vielzahl von Mechanismen beeinflussen, welche für die normale Struktur und Funktion der Gefäßwand wichtig sind. Kommt es daher zu einer Störung in diesem System, könnte es entsprechend zu pathologischen Gefäßwandveränderungen wie bei MMD kommen. Nach Kim et al. könnte atRA daher auch einen möglichen therapeutischen Nutzen bei MMD oder anderen hyperproliferativen Krankheiten haben [1].

Bei einem Kontrollpatienten mit arteriovenöser Malformation konnten Kim et al. ebenfalls eine erhöhte Expression von CRABP-I nachweisen. Die Erhöhung von CRABP-I könnte daher auch allgemein mit zerebrovaskulären Krankheiten korreliert sein [1].

Zusammenfassend scheint also nach dem aktuellen Wissensstand eine Beteiligung von CRABP-I an der Genese von MMD durchaus denkbar. Allerdings ist momentan noch schwer diskutierbar inwiefern CRABP-I ursächlich bei MMD beteiligt sein könnte.

3.3. PDGF bei MMD

Nach Aoyagi et al. findet sich auf kultivierten glatten Muskelzellen aus der STA von MMD-Patienten (HMSMC) eine signifikant geringere Anzahl an PDGF-Rezeptoren [447].

Hierauf basierend lassen sich nach Aoyagi et al. auch die signifikant längeren Verdopplungszeiten von HMSMC und ein vermindertes Ansprechen dieser HMSMC auf exogen zugeführtes PDGF in Bezug auf DNS-Synthese und Proliferation erklären [448].

Weiterhin lässt sich nach Aoyagi et al. bei HMSMC durch Applikation von PDGF-BB eine höhere mitogene Reaktion induzieren als durch Applikation von PDGF-AA, was auf eine erhöhte Expression des β -Rezeptors im Vergleich zum α -Rezeptor auf HMSMC schließen lässt [447].

Yamamoto et al. konnten eine signifikante Erhöhung der DNS-Synthese in Kontrollzellen durch Applikation von sowohl PDGF-AA als auch -BB nachweisen, welche sich jedoch nicht in HMSMC zeigte. Außerdem zeigte sich eine

erhöhte Stimulation der Migration von HMSMC durch PDGF-AA im Gegensatz zu Kontroll-SMC [334].

Kang et al. wiesen in einer aktuellen Studie 18fach erhöhte Plasmalevel von PDGF-BB bei MMD-Patienten im Vergleich mit gesunden Kontrollen nach [445], im CSF hingegen findet sich nach Yoshimoto et al. keine PDGF-Erhöhung [65]. Wie bereits dargestellt im Abschnitt A.2.3. (PDGF), besitzt PDGF vielfältige Funktionen bei der Zellfunktion und damit verbundenen Stoffwechselfvorgängen. PDGF hat angiogene Eigenschaften und scheint eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der strukturellen Integrität von Blutgefäßen zu spielen.

Weiterhin hat PDGF wichtige Funktionen in Bezug auf die Wundheilung, u.a. durch chemotaktische Effekte auf verschiedene Entzündungszellen, und ist bei Intimahyperplasie bzw. Neointimabildung involviert durch die Eigenschaft von PDGF Fibroblasten zur verstärkten Kollagenbildung und –sekretion anzuregen sowie SMC-Migration und Proliferation zu beeinflussen.

Durch die Beteiligung an diesen vielfältigen bei MMD relevanten Prozessen scheint ein Zusammenhang von PDGF mit der Ätiopathogenese durchaus denkbar.

Es bleibt jedoch zu diskutieren, inwiefern die veränderte Expression der PDGF-Rezeptoren eine Folge anderer beeinflussender Faktoren ist oder durch einen Defekt im Bereich der Rezeptorgene selbst induziert sein könnte.

3.4. TGF- β 1 bei MMD

Hojo et al. wiesen TGF- β 1 bei MMD-Erkrankten im Serum als signifikant erhöht nach im Vergleich zu normalen gesunden Patienten. Es fand sich hierbei kein Unterschied in verschiedenen Altersgruppen. Weiterhin konnten Hojo et al. eine signifikant erhöhte Expression von TGF- β 1 mRNA in kultivierten glatten Muskelzellen nachweisen, welche aus der STA von MMD-Erkrankten gewonnen worden waren, im Vergleich zu kultivierten Muskelzellen von arteriosklerotisch veränderten Gefäßen. Auch hier konnte keine Altersabhängigkeit nachgewiesen werden [56]. Nach Nikol et al. fanden sich in Voruntersuchungen bei Vergleich

von arteriosklerotischen zu nicht-arteriosklerotischen Gefäßen in vivo keine signifikant erhöhten TGF- β 1 mRNA Werte, woraus Hojo et al. schlossen, dass die erhöhte TGF- β 1 Expression im Zusammenhang mit der Pathogenese von MMD, nicht jedoch von Arteriosklerose, gesehen werden kann [56, 449].

Im CSF fand sich nach Yoshimoto et al. keine signifikant erhöhte Expression von TGF- β 1 bei Patienten [65].

Wie bereits im Abschnitt A.2.4.d (TGF- β 1) beschrieben, kommt TGF- β 1 u.a. eine wichtige Rolle im Bereich Proliferation und Migration von SMCs, Produktion von extrazellulärer Matrix, Neointimabildung, Angiogenese und Erhaltung der Homöostase der Gefäßwand zu. Zudem kann TGF- β 1 andere Zytokine beeinflussen, welche an diesen Prozessen beteiligt sind, wie z.B. die Induktion der Expression von bFGF-Rezeptor 1 und 2 [450].

Es ist damit maßgeblich an Prozessen beteiligt, welche auch bei der Genese von MMD von Relevanz sind.

Ob nun TGF- β 1 eine ursächliche Rolle bei der Genese von MMD zugeschrieben werden kann, ist bislang unklar.

Zusammenfassen lässt sich für unsere Studie nun festhalten, dass nach dem aktuellen Wissensstand

1. eine genetische Ursache von MMD wahrscheinlich scheint und
2. eine veränderte Zytokinexpression pathogenetisch im Mittelpunkt zu stehen scheint.

Um Hinweise auf die Ätiopathogenese von MMD durch eine mögliche Korrelation zwischen diversen Genveränderungen und verändert exprimierten Zytokinen bei MMD aufzudecken, wählten wir dreizehn SNPs, die im kodierenden Bereich (nicht-synonyme SNPs) oder in vorgeschalteten regulatorischen Regionen (regulatorische SNPs) der Gene von bFGF, CRABP-I, des PDGFRB und TGF- β 1 liegen, und untersuchten diese bezüglich einer Assoziation mit MMD.

Letztendlich dient diese Studie damit dazu, genetische Abberationen als Ursache für MMD aufzudecken um somit, einerseits durch frühzeitige Screeningmöglichkeiten und andererseits durch die Festlegung kurativer Behandlungsmöglichkeiten, die Prognose der Krankheit zu verbessern.

B Patienten, Material und Methoden

Die durchgeführte Studie ist anerkannt von der Ethik-Kommission der medizinischen Fakultät und des Universitätsklinikums Tübingen (siehe Nummer 273/2009BO1). Vor Teilnahme an dieser Studie gaben alle Studienteilnehmer bzw. deren gesetzliche Vertreter ihre schriftliche Einwilligung. Diese erfolgte nach einer mündlichen und/oder schriftlichen Aufklärung über Studienaufbau und -ziele sowie über die Möglichkeit die Studie jederzeit ohne Angabe von Gründen abzubrechen. Außerdem bestand sowohl vor Beginn der Studie als auch während der gesamten Studienphase die Möglichkeit direkt persönlich, telefonisch und/oder schriftlich Fragen bezüglich der Studie zu stellen.

1. Studiendesign

Das Design der Studie entspricht einer Fall-Kontroll-Studie mit Vergleich einer Gruppe an MMD-erkrankten Personen (Fallgruppe) und einer Gruppe nicht an MMD-erkrankten Personen (Kontrollgruppe).

1.1. Fallgruppe

Die Rekrutierung der Fall-Gruppe erfolgte durch

1. Auswertung von Daten der medizinischen Datenbank des Universitätsklinikums Tübingen. Vorrangiges Auswahlkriterium war die Nennung der MMD-Erkrankung in der Diagnosenliste des/r Patienten/in.
2. Suche und Kontaktaufnahme mit Patienten vermittelt durch national und international tätige Organisationen mit entsprechenden Patientendatenbanken, wie z.B. das Kindernetzwerk e.V. (<http://www.kindernetzwerk.de>) und die Stiftung Deutsche Schlaganfallhilfe (<http://www.schlaganfallhilfe.de>).
3. Suche und Kontaktaufnahme mit Patienten über Internetforen, wie z.B. www.moyamoya.info, www.moyamoya.net und www.moyamoya.com.

4. Kontaktaufnahme mit Patienten über bereits in die Studie involvierte Patienten, welche mit bislang nicht involvierten Patienten in Kontakt standen/stehten.
5. Kontaktaufnahme von Seiten der Patienten. Durch Kontakte der Patienten untereinander erfuhren weitere Patienten von der Studie. Diese kontaktierten uns um ebenfalls an der Studie teilzunehmen.

41 Patienten gaben nach Aufklärung ihre Zustimmung zur Teilnahme an der Studie. Sofern nötig, erfolgte die Zustimmung zur Teilnahme durch den gesetzlichen Vertreter. Falls möglich, wurde jedoch auch hier zusätzlich die Zustimmung des Patienten selbst eingeholt.

Bei allen der Fallgruppe Zugeordneten liegt eine radiologisch diagnostizierte MMD-Erkrankung vor.

Für die Teilnahme an der Studie wurden die Patienten gebeten, zusätzlich zu der im Abschnitt B.2.2.1. (Blutentnahme) beschriebenen Blutprobe, einen Fragebogen auszufüllen und uns, sofern möglich, Arztbriefe über bisherige Untersuchungen und gegebenenfalls Operationen zukommen zu lassen.

Der Fragebogen enthielt Fragen bezüglich:

- Ethnische Zugehörigkeit (Herkunftsland)
- Geschlecht
- Geburtsdatum
- Symptomatik bei Erstmanifestation
- Zeitpunkt der Diagnosestellung
- Bisheriger Krankheitsverlauf
- Bisherige Behandlung
- Komplikationen bei der Behandlung
- Momentane Probleme und Medikation
- Sonstige Krankheiten
- Betroffene Verwandte

Alle Daten der Studie wurden gesammelt, ausgewertet und dargestellt mit Hilfe von Microsoft Excel und Microsoft Word.

Aus den Fragebögen und Unterlagen ließen sich folgende Eigenschaften der Gruppe ableiten:

- Alle Patienten leben im europäischen Raum mit Schwerpunkt auf Zentraleuropa.

Tab. 6: Herkunftsländer der MMD-Patienten

Herkunftsland	Anzahl
Deutschland	26
Schweiz	7
Italien	2
Niederlande	2
Schweden	1
Tschechische Republik	1
Österreich	1
China*	1

* Auf Grund der asiatischen Abstammung wurde diese Person bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

- Die Fall-Gruppe zeigte bei Studienbeginn eine Altersspanne von vier bis 66 Jahren (Durchschnitt: 25,5 Jahre).

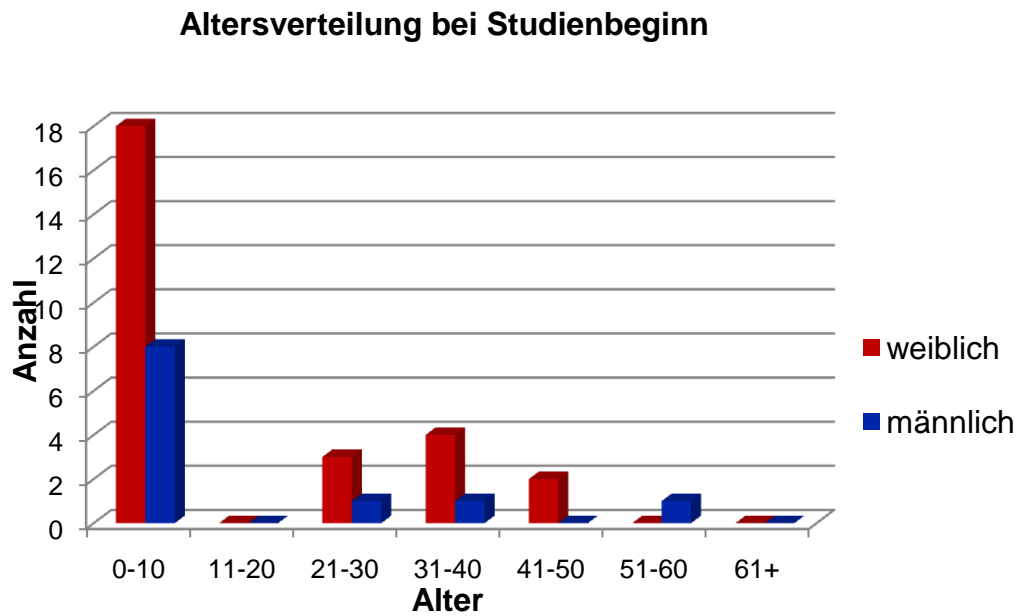


Abb. 18: Altersverteilung bei Studienbeginn in der Fallgruppe.
Gesamtzahl: 41 Patienten, Durchschnittsalter: 25,2 Jahre

- Die Altersverteilung bei klinischer Erstmanifestation weist hingegen eine Spanne von 3 Monaten bis 58 Jahren auf (Durchschnitt: 15,4 Jahre). Es findet sich eine Verteilung über alle Altersgruppen in dieser Spannweite und zwei Alterspeaks mit erhöhter Inzidenz der Erkrankung in der Altersgruppe unter 10 Jahren und zwischen 30-40 Jahren.

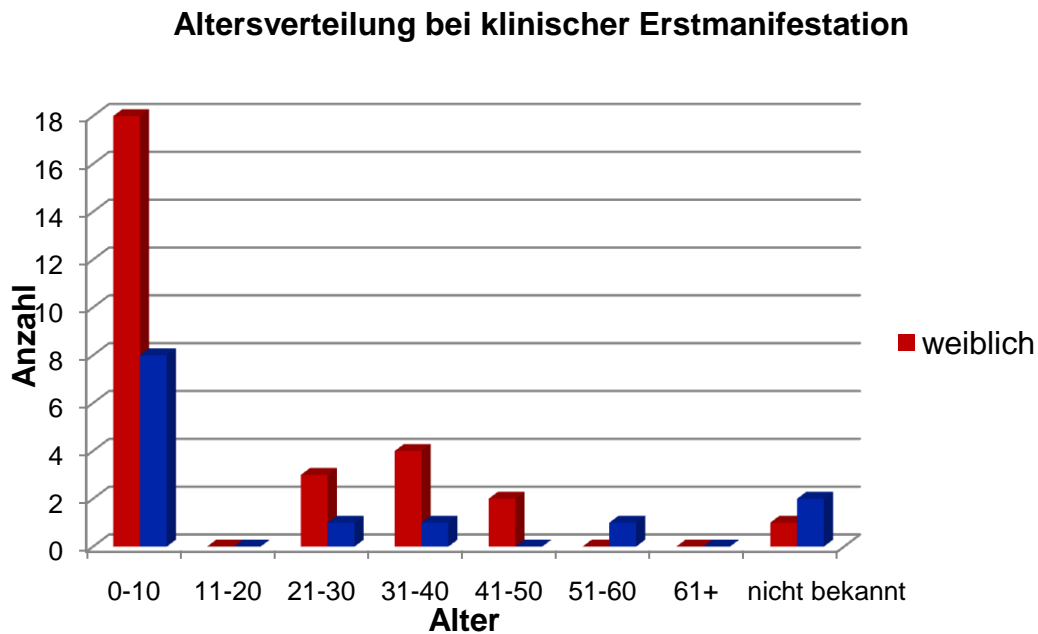


Abb. 19: Altersverteilung bei klinischer Erstmanifestation in der Fallgruppe. Gesamtzahl: 41 Patienten, Durchschnittsalter: 15,2 Jahre

- Die Gruppe besteht aus 28 (68,3 %) weiblichen und 13 (31,7 %) männlichen Teilnehmern, was einer weiblichen Prädominanz mit einer weiblich-männlich-Rate von 2,15:1 entspricht.



Abb. 20: Geschlechtsverteilung in der Fallgruppe.

Gesamtzahl: 41 Patienten, Verhältnis weiblich:männlich = 2,15:1

Diese Alters- und Geschlechtsverteilungen stimmen damit weitgehend mit Daten aus bisherigen Untersuchungen überein, welche eine ähnliche Altersverteilung mit ebenfalls einer weiblichen Prädominanz (Rate weiblich-männlich 1,8:1) vorweisen [12, 16, 18].

- Ebenfalls Ähnlichkeit zur Literatur weist die prozentuale Verteilung der jeweiligen Erstsymptomatik der Patienten auf, wie bei Vergleich von einer an 1 500 MMD-Fällen durchgeführten Studie von Handa et al. mit der unten dargestellten Verteilung der Erstsymptomatik aus dieser Studie ersichtlich wird [71]. In beiden Fällen zeigen sich Paresen, TIAs, Krampfanfällen und Kopfschmerzen als sehr häufige Symptome bei MMD, v.a. in der Altersgruppe der 0-10 Jährigen.

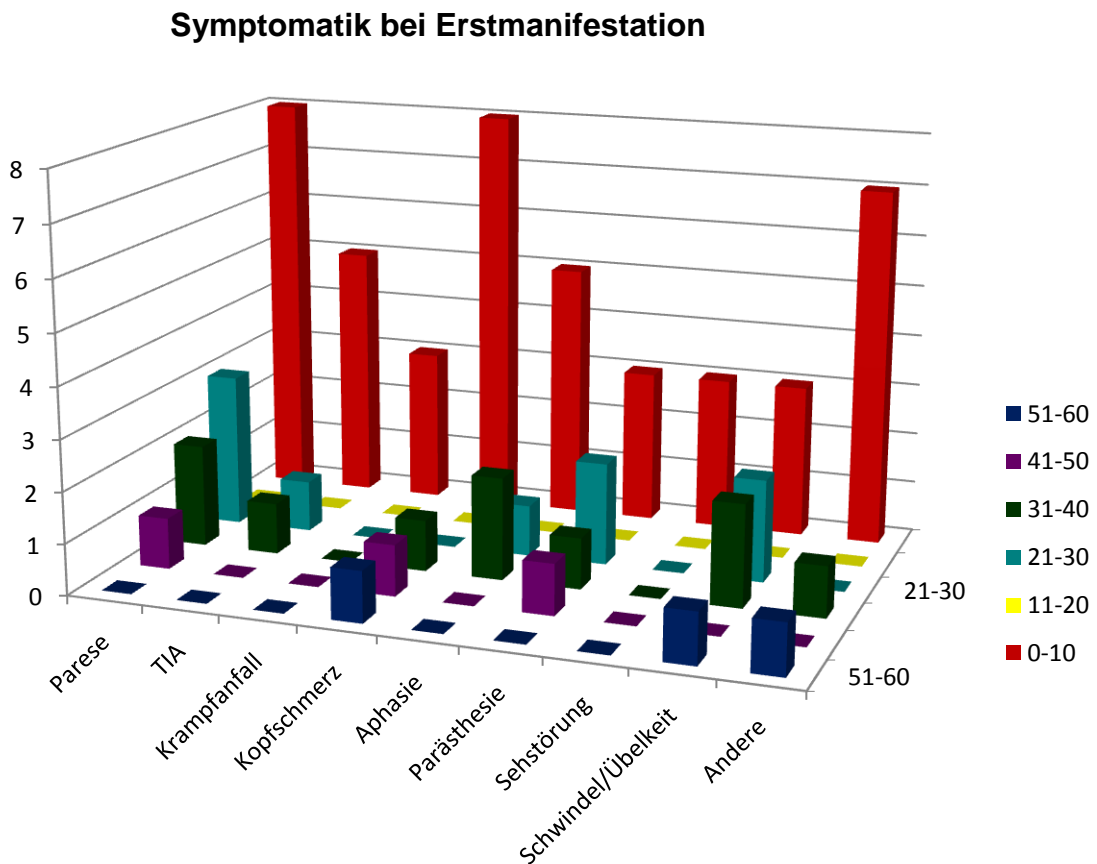


Abb. 21: Symptomatik bei Erstmanifestation in der Fallgruppe in Abhängigkeit vom Alter.

Anzahl weibliche Patienten: 27, Anzahl männliche Patienten: 11

- Der Literatur zu Folge betrifft MMD v.a. die distale ACI beidseits, sowie den vorderen Anteil des Circulus Wilisii mit den entsprechenden Gefäßabgängen. Der hintere Anteil der hirnersorgenden Gefäße ist hingegen nur selten betroffen. Entsprechende Informationen über betroffene Gefäße waren zum Zeitpunkt der Auswertung von 27 Patienten vorhanden. Eine der Literatur entsprechende Verteilung bezüglich der betroffenen Gefäße sowie eine Darstellung der Anzahl der betroffenen Gefäße ist in den folgenden zwei Diagrammen dargestellt.

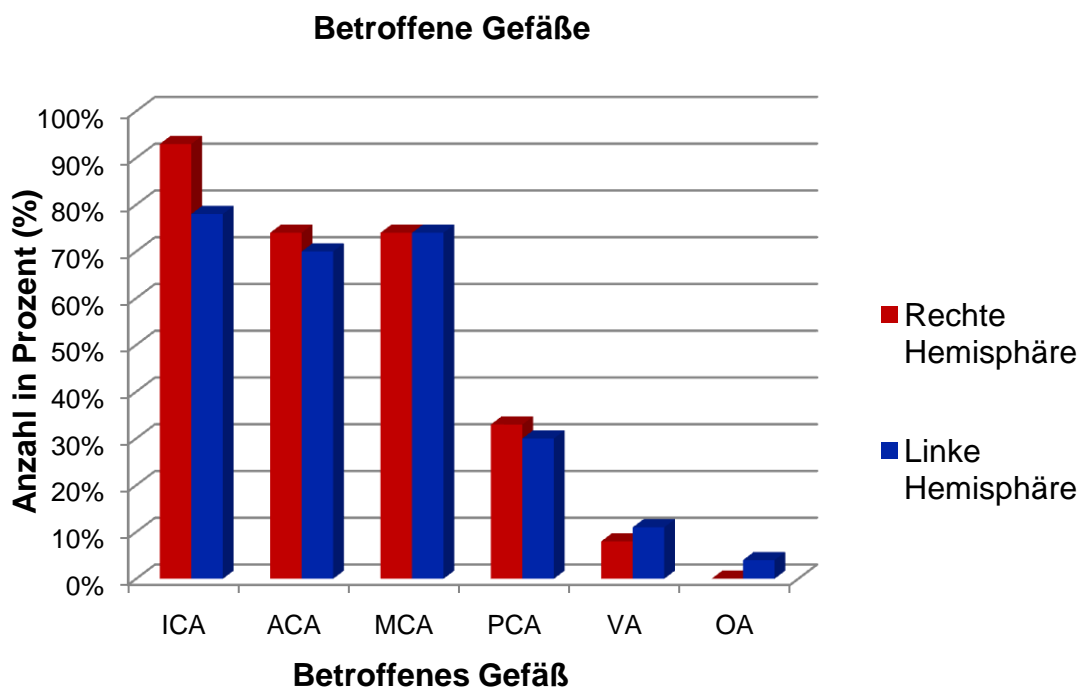


Abb. 22: Betroffene Gefäße in der Fallgruppe (n=27) in Prozent.

ICA = Internal Carotid Artery, ACA = Anterior Cerebral Artery, MCA = Middle Cerebral Artery, PCA = Posterior Cerebral Artery, VA = Vertebral Artery, OA = Ophthalmic Artery

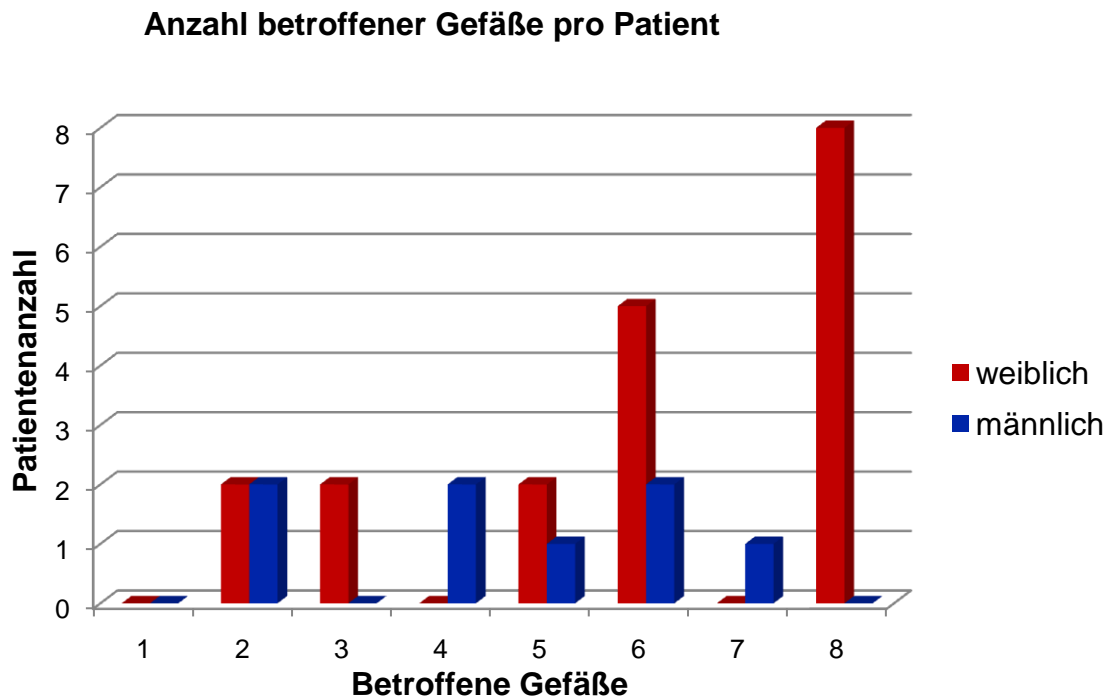


Abb. 23: Gesamtanzahl der betroffenen Gefäße pro Patient in der Fallgruppe (n=27).

- Ein Vergleich zwischen familiären und nicht familiären MMD-Fällen war in dieser Studie leider nicht möglich, da sich bei keinem der einbezogenen Patienten Hinweise auf ein familiäres Leiden, wie z.B. ein weiterer nachgewiesener Fall von MMD im Verwandtenkreis, bis zum Zeitpunkt der Auswertung zeigten.

1.2. Kontrollgruppe

Die Rekrutierung der Kontrollgruppe erfolgte im Universitätsklinikum Tübingen. Dieser Gruppe sind Personen zugeordnet, welche gesund sind in Bezug auf vaskuläre Krankheiten.

Für die Teilnahme an der Studie wurden die Kontrollpersonen, analog zur Fallgruppe, gebeten, zusätzlich zu der im Abschnitt B.2.2.1. (Blutentnahme) beschriebenen Blutprobe, einen Fragebogen auszufüllen.

Mit Hilfe des Fragebogens wurde spezifisch ausgeschlossen, dass ein bekannter Fall von MMD in der Verwandtschaft oder andere Hinweise auf ein familiäres vaskuläres Leiden vorliegen.

Der Fragebogen enthielt Fragen bezüglich:

- Alter
- Geschlecht
- Ethnische Zugehörigkeit
- Familiäre Erkrankungen
- Bisherige Erkrankungen, Operationen etc.
- Momentane gesundheitliche Probleme/Medikamente
- Rauchen

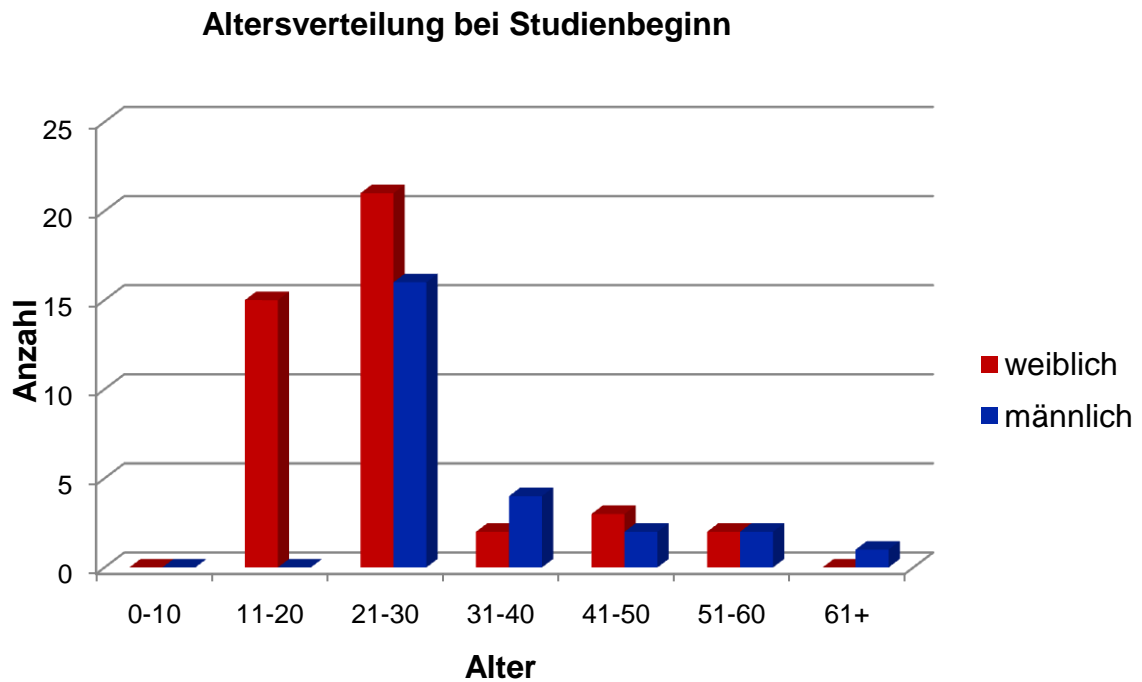
Alle Daten der Studie wurden gesammelt, ausgewertet und dargestellt mit Hilfe von Microsoft Excel und Microsoft Word.

Insgesamt beinhaltet die Kontrollgruppe 68 Personen.

Aus den Fragebögen ließen sich folgende Eigenschaften der Gruppe ableiten:

- Alle 68 Kontrollpersonen leben in Deutschland und sind deutscher Abstammung.

- Bei Studienbeginn fand sich eine Altersverteilung von 15 bis 65 Jahren (Durchschnitt: 27,6 Jahre).



**Abb. 24: Altersverteilung bei Studienbeginn in der Kontrollgruppe.
Gesamtzahl: 68 Patienten, Durchschnittsalter: 27,59 Jahre**

- Mit 43 (63,2 %) weiblichen und 25 (36,8 %) männlichen Teilnehmern, ergibt sich eine Geschlechtsrate zu Gunsten der weiblichen Teilnehmer von 1,72:1.

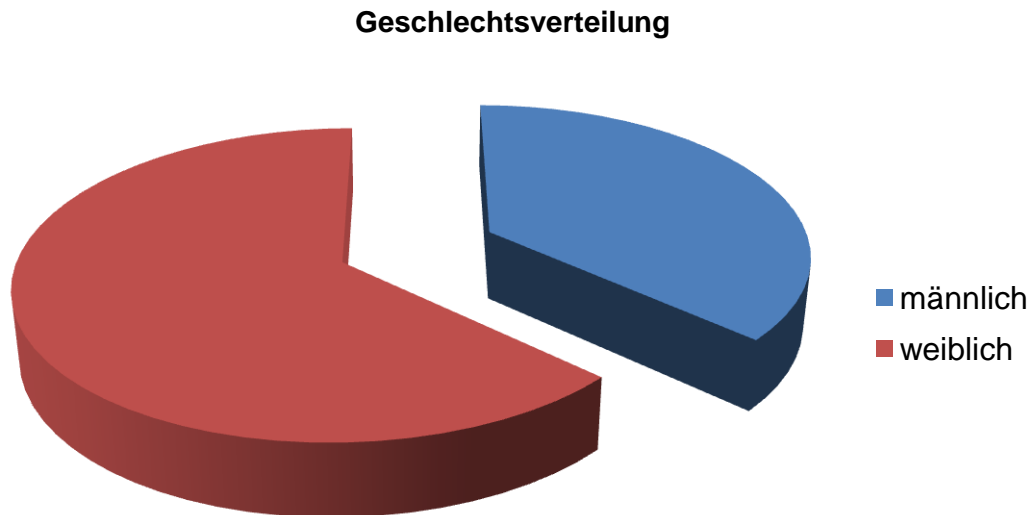


Abb. 25: Geschlechtsverteilung in der Kontrollgruppe.

Gesamtzahl: 68 Patienten, Verhältnis weiblich:männlich = 1,72:1

2. Material und Methoden

2.1. Blutentnahme

Bei allen Teilnehmern der Studie, sowohl Fall- als auch Kontrollgruppe, erfolgte eine venöse Blutentnahme mit 9ml-EDTA-Röhrchen. Insgesamt betrug die abgenommene Menge Blut pro Person 18-27 ml. Jede Probe wurde anschließend aus Datenschutzgründen mit einem unikalen Code aus Buchstaben und Zahlen verschlüsselt und bei -80°C tiefgefroren. Eine Zuordnung der einzelnen Proben ist nur noch ausgewählten Personen mit Hilfe des entsprechenden, sicher verwahrten Schlüssels möglich.

2.2. DNS-Extraktion und Präparation

Die Extraktion der DNS aus den entnommenen Blutproben erfolgte mit Hilfe des Flexigene DNS Kit (Quiagen, Hilden; Deutschland).

Zunächst mussten 7ml des entnommenen Blutes mit 17,5ml FG1-Puffer in 50ml Falcon-Röhrchen vermischt werden um die roten Blutkörperchen (Erythrozyten) zu lysieren. Nach fünfmaliger Invertierung, erfolgte eine Zentrifugierung über sechs Minuten bei 3000xG. Der nun entstandene Überstand wurde verworfen und die Röhrchen auf einem sauberen saugfähigen Papier für zwei Minuten umgedreht stehen gelassen. Hierbei mussten die Pellets gut beobachtet werden, um einen Verlust durch seitliches Abrutschen der Pellets zu verhindern.

Durch anschließendes Zufügen von 3,5ml zuvor hergestelltes Gemisches aus 35µl Protease und 3,5ml FG2-Puffer, erfolgte die Denaturierung strukturerhaltender Proteine der weißen Blutkörperchen (Leukozyten). Nach Vortexen bis zur Homogenisierung des Pellets und Inkubation in einem 65°C Wasserbad für zehn Minuten, war durch die erfolgreiche Verdauung der Zellen ein Farbumschlag der Lösung nach olivgrün beobachtbar. Anschließend wurden 3,5ml Isopropanol (100%) zugefügt und die Röhrchen mehrfach invertiert bis die präzipitierte DNS sichtbar wurde. Um eine größtmögliche Menge DNS zu erhalten, erfolgte eine Zentrifugation über vier Minuten bei 3000xG. Der nach Zentrifugation sichtbare Überstand wurde verworfen und die Röhrchen erneut umgekehrt auf saugfähiges Papier gestellt um die Pellets zu trocknen. Um die Pellets nun wieder zu lösen und zu waschen wurden 3,5ml Ethanol (70%) zugegeben und die Röhrchen gevortext. Nach anschließender Zentrifugation (sechs Minuten, 3000xG) und Verwerfen des Überstands konnte nun das zurückgebliebene Pellet mit einer Pipettenspitze aus dem Falcon-Röhrchen vorsichtig in ein 1,5ml Eppendorfcup überführt werden. Nach kurzem Trocknen wurden anschließend 700µl FG3-Puffer zugefügt, erneut gevortext und das Gemisch in dem Eppendorfcup für eine Stunde im 65°C warmen Wasserbad inkubiert.

Die exakte Messung der DNS-Konzentration in den einzelnen Eppendorfcups

erfolgte anschließend mit Hilfe des Nanodrop ND-1000 Photometers (Peqlab, Erlangen; Deutschland).

Zuletzt wurde die DNS bei -20 °C aufbewahrt bis die für die weiteren Analysen benötigten DNS-Mengen auf 96-well-Platten pipettiert wurden.

2.3. DNS-Analyse

Die DNS-Analyse erfolgte in dreizehn verschiedenen Bereichen der DNS. In jedem dieser analysierten Bereiche befindet sich ein SNP, welcher sich wiederum in oder nahe bei (z.b. in der Promotorregion) einem der in der Einleitung beschriebenen vier Zytokine befindet. Die Analyse fand in enger Zusammenarbeit mit dem „International Research and Educational Institute for Integrated Medical Sciences, Tokyo Women’s Medical University“ statt, welches unterstützt wird vom „Program for Promoting the Establishment of Strategic Research Centers, Special Coordination Funds for Promoting Science and Technology, Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (Japan)“.

Um während des im Rahmen der Zusammenarbeit benötigten Versands der DNS-Proben nach Japan eine durchgehende Kühlung zu gewährleisten, wurden diese eingebettet in Trockeneis in einer isolierenden Styroporbox versandt.

2.3.a. DNS-Amplifizierung mit Hilfe von PCR

Um die DNS-Proben mit Hilfe der später beschriebenen angewandten Sequenzierungsmethode auf die dreizehn festgelegten SNPs untersuchen zu können, wurde zunächst eine vielfach höhere Anzahl an Kopien der entsprechenden DNS-Regionen benötigt. Die Herstellung dieser, einen Bereich von 200-500 Basenpaaren umfassenden, Kopien erfolgte mittels PCR (Polymerase Chain Reaction, dt.: Polymerasekettenreaktion).

Die PCR bietet eine schnelle und gleichzeitig sensitive und spezifische Möglichkeit zur Vervielfältigung einer spezifischen DNS-Sequenz.

Das Grundprinzip der PCR beinhaltet dabei folgende drei Schritte:

1. Denaturierung der meist als Doppelstrang vorliegenden Ziel-DNS in zwei Einzelstränge: Dieser Vorgang wird durch Erhitzen der Reaktionslösung auf 94 °C ausgeführt.
2. Hybridisierung der Primer an die entsprechenden Stellen der Einzelstränge: Für diesen Schritt spielen die Zusammensetzung der Reaktionslösung, die Regulierung der Temperatur sowie das Design der Primer eine wichtige Rolle. Die ideale Hybridisierungs- bzw. Annealingtemperatur (T_m) liegt bei ca. 60°C und wird für die jeweiligen Primer üblicherweise automatisch berechnet von speziellen Softwareprogrammen. Hierbei werden z.B. die Konzentrationen verschiedener gelöster Ionen, die Primerlänge und das Verhältnis von Pyrimidinbasen zu Purinbasen berücksichtigt.
3. Unidirektionale DNS-Elongation mittels einer thermostabilen DNS-abhängigen DNS-Polymerase:

Die Polymerase setzt an dem kurzen, durch Primer und Ziel-DNS gebildeten Doppelstrang an und ermöglicht so die Synthese eines neuen DNS-Stranges, komplementär zu dem bereits vorhandenen. Die Temperatur bei diesem Reaktionsschritt liegt, abhängig vom Arbeitsoptimum der verwendeten Polymerase, bei ca. 68-72°C.

Bei jeder Wiederholung dieses Reaktionszyklus verdoppelt sich, unter Voraussetzung maximaler Effektivität, die Menge der Amplifikationsfragmente, woraus sich mathematisch beschrieben ein exponentielles Wachstum ergibt.

Nach ca. 30-50 Zyklen lässt sich mit dieser Methode eine suffiziente Menge an DNS für die weiteren Analysen gewinnen.

Im Anschluss an die Anwendung der eben beschriebenen PCR-Methode in vielfachen Zyklen erfolgte bei unseren Untersuchungen noch der Nachweis für eine erfolgreiche Replikation und die Bestätigung der korrekten Länge des Amplifikats des erhaltenen PCR-Produkts durch Elektrophorese auf zweiprozentigem Agarosegel.

2.3.a.a. PCR-Protokoll

Verwendete Reagenzien:

- 10xAccuPrime PCR buffer II #* 5,0 µl
- Sense/forward Primer (10µM) 0,5 µl
- Antisense/reverse Primer (10µM) 0,5 µl
- AccuPrime Taq High Fidelity Polymerase # 0,1 µl (0,5 Unit)
- Template DNS (10ng/µl) 1,0 µl
- Ultra Pure Water 12,9 µl

Invitrogen Cooperation, USA

* Inhaltsstoffe: 600 mM Tris-SO₄ (pH 8.9), 180 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄, 2 mM dGTP, 2 mM dATP, 2 mM dTTP, 2 mM dCTP, thermostabiles AccuPrime™ Protein, 10%iges Glycerol.

Die nachfolgende Tabelle dient als Überblick über die verwendeten Primersequenzen und Hybridisierungstemperaturen. Nähere Informationen zu den einzelnen SNPs finden sich im Abschnitt B.2.2.5. (SNP-Auswahl).

Tab. 7: Verwendete Primersequenzen & Hybridisierungstemperaturen (T_m)

Zytokin	SNP*	Primersequenz (5'→3')	T _m
bFGF	rs308395	GCAACTCCTTCTAGAAGCTTCCC	59,8
		TTAATGTCTTAACTCGGACCTGGC	59,5
	rs308447	CGTTTTAACTGGGCCCATCTGAG	60,6
		TGTGGAAAGCAAGTCCTCACCA	61,2
	rs10004506	AGTCATCACCCTCCCTAATCTCAAG	60,9
		GCACGTAATCTCAGCTACATGGG	60,0
	rs13434728	TACACAGTGTCTTTGACATCAAAGC	58,8
		ATAGAGTTATATCTGGCAATGATAGGC	57,6
CRABP-I	rs2280367	CGCGCCTTGAGTCACTAGGAG	61,5
		GTTTCAGAATAGGATCCCGGACTGG	61,7
	rs3813573	CCCTTCCTAAGGCTTAGCCAGG	61,3

		CAAAAAGTATTCTGACGTTCAAGCTGG	60,2
PDGFRB	rs3756312	GCAACTGAATTCAGAGGGTGAAG	60,8
		GGGCACAAGAAATCCCTGTGC	61,0
	rs3828610	CAGATGGGGAAACTGAGGCAC	59,9
		GCTCCAAGTTGCTCACAGAGC	60,5
	rs10476930	GGCTTATGAGTCTAGACAGAAAGCC	59,8
		GTCAGGAGTTTGAGACCAGCC	59,5
TGF-β1	rs1800469	CCCTCTGGGCCAGTTTCC	61,4
		CAGATGCGCTGTGGCTTTGC	61,7
	rs1800470	TCCGCTTCACCAGCTCCATG	61,5
		CGCCCTTCTCCCTGAGGACC	63,2
	rs1800471	GTTGCGCTCTCGGCAGT	61,6
		GTTGTACAGGGCGAGCACGGC	65,1
		GCAGCTTGGACAGGATCTGG	59,6
	rs1800472	CCCCTTATCTATCCCTCTGAGAGTG	61,4
GACAGATGCTCAGCCCAAGC		61,7	

Vorgehensweise bei den PCR-Zyklen:

Tab. 8: PCR-Protokoll

	Temperatur	Zeit	Zyklus/Zyklen
Initiale Denaturierung	94 °C	30 sec.	1x
Denaturierung	94 °C	20 sec.	35x
Hybridisierung	57 °C	20 sec.	
Elongation	68 °C	30 sec.	
Finale Elongation	68 °C	6 min.	1x

Vor der nachfolgenden Sequenzierung wurden alle PCR-Produkte mit Konzentrationen unter 10 ng/µl zweifach verdünnt werden und alle Produkte mit Konzentrationen über 10 ng/µl dreifach verdünnt.

2.3.c. DNS-Sequenzierung

Um die genaue Basenabfolge eines DNS-Teilstücks zu bestimmen eignen sich verschiedene Methoden der DNS-Sequenzierung. Die in dieser Studie angewandte Methode basiert auf einer Modifikation der um 1975 von Frederick Sanger und Alan Coulson entwickelten Sequenzierungstechnik [451].

Ähnlich der PCR, besteht das Grundprinzip der angewandten Sequenzierung in der enzymatischen Elongation ausgewählter einzelsträngig vorliegender DNS-Segmente nach Applikation von Primern. Der Unterschied zur herkömmlichen PCR-Methode liegt in der Zugabe von fluoreszierenden Dideoxynukleosidtriphosphaten (ddNTPs), zusätzlich zu den bei der PCR zugegebenen Deoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs). ddNTPs fehlt im Vergleich zu dNTPs die 3'-Hydroxyl-Gruppe, welche die Elongation des komplementären DNS-Strangs ermöglicht über die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung mit dem nachfolgenden Nukleotid am 5'-Ende. Bei Fehlen dieser Gruppe kommt es demnach zur frühzeitigen Termination der Elongation. Der Einbau der ddNTPs folgt dem Zufallsprinzip, wodurch eine Vielzahl verschieden langer DNS-Stränge entsteht. Jeder dieser DNS-Stränge beginnt mit demselben Primer am 5'-Ende und endet mit einem ddNTP, welches basenspezifisch verschiedenfarbig fluoreszierend markiert ist. Nach einem Reinigungsschritt werden die verschieden langen Fragmente elektrophoretisch getrennt und mittels Laser zur Fluoreszenz angeregt. Mit einem entsprechenden Detektor können dann die spezifischen Fluorochrome identifiziert, den jeweiligen Basen zugeordnet und so die ursprüngliche Sequenz des untersuchten DNS-Abschnitts ermittelt werden.

2.3.b.a. Sequenzierungsprotokoll

Verwendete Reagenzien:

- Big Dye Terminator ver. 3.1 (Applied Biosystems, USA) 1µl
- 5x Big Dye Sequencing buffer (Applied Biosystems, USA) 1.5µl
- Diluted template DNS/PCR product (5-10ng/µl) 1µl
- Primer (1.6µM) 2µl

- Ultra pure water

4.5µl

Vorgehensweise bei der Sequenzierung:

Tab. 9: Sequenzierungsprotokoll

	Temperatur	Zeit	Zyklus/Zyklen
Initiale Denaturierung	90 °C	2 min.	1x
Denaturierung	90 °C	10 sec.	25x
Hybridisierung	57 °C	10 sec.	
Elongation	60 °C	2 min.	

2.3.e. Magnetseparation

Da nicht eingebaute Terminatoren die Fluoreszenzprofile (Elektropherogramme) aus den Sequenzierern überlagern, müssen diese vollständig aus den Sequenzieransätzen entfernt werden. Um eine höchstmögliche Qualität diesbezüglich zu gewährleisten, wurde daher als weiterer Schritt die sogenannte Magnetseparation angewandt, welche im Vergleich zu dem oben beschriebenen Reinigungsschritt bessere Reinigungsergebnisse aufweist [452].

Die Magnetseparation ist eine einfache und automatisierbare Methode. Hierbei werden die gewünschten DNS-Fragmente an speziell beschichtete magnetische Kügelchen (sog. „Beads“) gebunden, wodurch sie bei den nachfolgenden Waschschritten mit Hilfe eines magnetischen Felds von unerwünschten Partikeln in dem Gemisch, wie z.B. ungebundenen ddNTPs und Salzen, hocheffektiv separiert werden können.

Angewandt wurde das Agencourt CleanSEQ dye terminator removal kit (Beckman Coulter, USA).

2.3.c.a. Protokoll Magnetseparation

Zunächst wurden dem Sequenzierungsgemisch 2.5 µl CleanSEQ und 30 µl 85%iges Ethanol beigefügt und diese neue Zusammensetzung kräftig gemischt. Die hierbei entstandene Bindung zwischen den gewünschten DNS-Fragmenten und den zugefügten magnetischen Kügelchen war notwendig für den nachfolgenden Separationsschritt. Hierfür wurden die Proben für vier Minuten auf eine magnetische Platte („Agencourt Solid Phase Reversible Immobilization Magnetic Plate“) platziert, um die gebundene DNS an der Oberfläche des Reaktionsgefäßes zu fixieren. Nach Absaugen und Verwerfen des Überstands, folgten zwei Waschschrte mit jeweils 100µl 85%igem Ethanol und anschließendem Absaugen. Danach wurden die Proben für ca. zehn Minuten bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

Nach erfolgreicher Trocknung wurden die Proben in 40 µl „Ultra Pure“-Wasser resuspendiert und erneut bei Raumtemperatur für fünf Minuten inkubiert. Nun konnte als letzter Schritt die Entnahme von 35 µl des magnetisch gereinigten und Kügelchen-freien Überstandes auf eine neue Platte pipettiert werden für die nachfolgende genetische Analyse.

2.3.f. Genetische Analyse

Nach Zentrifugation der gereinigten Proben bei 1200rpm für fünf Minuten, erfolgte die genetische Analyse mit Hilfe des Genetic Analyzer 3130xl (Applied Biosystems, USA). Die anschließende Detektion wurde mit 3130 POP-7 Polymer auf einem 50 cm Kapillar-Array (Applied Biosystems, USA) durchgeführt. Für den Analysator wurden die Protokolle „Instrument Protocol: FastSeq-50_POP7_(15,1600)“ und „Analytical Protocol: 3130KB_POP7_v3“ verwendet.

2.3.g. Analyse-Software

Für die Analyse der Daten wurde die GENETYX-MAC ver.15.0.1 (GENETYX Corporation, Japan) Software genutzt.

2.4. Statistik

Die Genotyp- und Allelhäufigkeiten wurden für jeden SNP für alle Fälle und Kontrollen berechnet. Diese Ergebnisse wurden mit den neuesten Referenzwerten von <http://www.pubmed.gov>, <http://www.hapmap.org> und <http://www.appliedbiosystems.com> verglichen, um mögliche Irregularitäten zu erfassen. Für die Überprüfung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts (HWG) bezogen auf die Genotyp- und Allelhäufigkeiten wurde bei jedem SNP in beiden untersuchten Gruppen die χ^2 -Methode angewandt. P-Werte über 0,05 wurden hierbei als statistisch signifikant angesehen.

Zum Vergleich der Fallgruppe mit der Kontrollgruppe wurde ebenfalls der χ^2 -Test angewandt. Ausnahme hierbei waren drei SNPs (rs10004506, rs1800471, rs1800472), welche auf Grund der geringen Probenanzahl mit dem Fisher-Exakt-Test berechnet wurden.

Des Weiteren wurden die Verteilung der Genotypen und der verschiedenen Allele sowie die Verteilung der verschiedenen Allele unter Annahme einer Dominanz bestimmter Allele berechnet und verglichen. Hierbei wurden Ergebnisse mit p-Werten unter 0,05 als statistisch signifikant angesehen.

Um die Wahrscheinlichkeiten für das Vorliegen von MMD zu berechnen, wurden die Odds Ratio (OR) und das 95%-Konfidenzintervall (KI) für alle SNPs berechnet, erneut auch unter Annahme einer Dominanz bestimmter Allele. Eine OR größer als 1 weist auf ein höheres Risiko für MMD für die jeweilige Gruppe hin.

Für die Berechnung aller oben genannten Werte wurde eine vorprogrammierte Excel-Tabelle (Tim Becker, Bonn) verwendet.

2.5. SNP(Single Nucleotide Polymorphism)-Auswahl

Für unsere Studie wählten wir SNPs, welche in der unmittelbaren Gennähe, wie z.b. der Promotorregion, oder im Genbereich der Zytokine selbst liegen.

SNPs werden allgemein in vier Kategorien unterteilt. Man unterscheidet SNPs, welche innerhalb proteinkodierender Regionen, sogenannten Exons, liegen, von SNPs, die in nicht proteinkodierenden Regionen liegen. Erstere werden weiter unterteilt in nicht-synonyme und synonyme SNPs, abhängig davon, ob sie eine Veränderung der Proteinsequenz bewirken oder nicht. SNPs, welche in nicht proteinkodierenden Regionen liegen, liegen entweder in Introns, also intragenisch, in nicht kodierenden Abschnitten der DNS, oder intergenisch, wie z.B. regulatorische SNPs in vorgeschalteten regulatorischen Regionen.

Es ist allgemein anerkannt, dass nicht-synonyme SNPs zu Aminosäureaustausch und damit u.a. zu Veränderungen der Proteinaktivität, -struktur und -stabilität führen können, während regulatorische SNPs zu einer Dysregulation der Gentranskription führen können oder auch die mRNA-Stabilität modifizieren können [453-455]. Daher wählten wir für unsere Studie nicht-synonyme und mögliche regulatorische SNPs.

Bezüglich der regulatorischen SNPs ist jedoch anzumerken, dass ein Nachweis von deren Einfluss auf die letztendliche Proteinfunktion in der Regel nur schwer möglich ist, da die Beteiligung von nicht-kodierenden Gensequenzen sehr begrenzt erforscht ist und der experimentelle Nachweis der funktionellen Auswirkungen oft mit hohem Arbeits- und Zeitaufwand verbunden ist.

Um eine sinnvolle SNP-Auswahl für eine, wie von uns durchgeführte, Assoziationsstudie treffen zu können, ist es wichtig die SNPs bezüglich eines pathogenen Effekts zu beurteilen. Hierfür sollte man sich nach Kang et al. auf SNPs konzentrieren, die bereits in vorangegangenen Studien in anderen Zusammenhängen untersucht wurden oder im Bereich von biologisch definierten Kandidatengenen liegen. Weiterhin sollten die SNPs funktionale Konsequenzen haben, wie z.B. einige regulatorische oder nicht-synonyme SNPs [456].

Wie bereits beschrieben (s. Abschnitt B.3. (Hintergrund und Zielsetzung der Studie)) befinden sich alle von uns ausgewählten SNPs upstream oder im kodierenden Bereich von Genen, kodierend für Zytokine, welche im Zusammenhang mit der Pathogenese von MMD möglicherweise relevant sind. Zudem wurden einige der ausgewählten SNPs bereits in Studien im Zusammenhang

mit anderen Krankheiten beschrieben. Vor allem einige vaskuläre Krankheiten, wie z.B. Arteriosklerose, weisen histopathologisch Ähnlichkeiten zu MMD auf.

Da es bislang vor allem Untersuchungen und Korrelationen im Zusammenhang mit TGF- β 1 und diversen vaskulären Erkrankungen gibt, konnten wir speziell bei der Auswahl der SNPs im genetischen Bereich von TGF- β 1 solche Untersuchungen berücksichtigen.

Als weiteres Auswahlkriterium diente bei einigen SNPs, dass deren Allele dem „International Hapmap Project“ zu Folge mit einer Häufigkeit größer als 5% im Sinne sogenannter „Common Alleles“ in der kaukasischen Bevölkerung vorliegen.

Die weiteren, u.a. für die Analysen benötigten Informationen über die jeweiligen Genregionen bezogen wir von Datenbanken des „National Center for Biotechnology Information“ (www.ncbi.nlm.nih.gov), der „Human Organized Whole Genome Database“ (<http://www-alis.tokyo.jst.go.jp/HOWDY/>), des „Weizmann Institute of Science, Israel“ (<http://www.genecards.org/index.shtml>) und dem „International Hapmap Project“ (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Die folgende Tabelle dient als Überblick über alle untersuchten SNPs mit einigen weiterführenden Informationen.

Tab. 10: Untersuchte SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) mit Informationen bzgl. chromosomaler Lokalisation, Allelen und Literaturverweisen.

Chr.= Chromosom, bFGF = Basic Fibroblast Growth Factor, CRABP-I = Cellular Retinoid Acid-Binding Protein I, PDGFRB = Platelet Derived Growth Factor Receptor Beta, TGF- β 1 = Transforming Growth Factor Beta 1

NP	Chromosomen- position	Korre- liertes Zytokin	Bereich	Alle- le	Ur- sprungs- allel	Genotyp- & Allelhäufigkeit (Referenzpopulation)	Literatur- verweise
rs308395	Chr. 4: 4q26-q27 → 23966392	bFGF	5'- flankierend	C/G	G	CC : 0,699 C=0,827 CG : 0,257 G=0,173 GG : 0,044	[457, 458]
rs308447	Chr. 4: 4q26-q27 → 123957996	bFGF	5'- flankierend	C/T	T	CC : 0,402 C=0,625 CT : 0,446 T=0,375 TT : 0,152	[459, 460]
rs10004506	Chr. 4: 4q26-q27 → 123953950	bFGF	5'- flankierend	A/G	G	AA : 0 A=0,017 AG : 0,033 G=0,983 GG : 0,967	
rs13434728	Chr. 4: 4q26-q27 → 4123957827	bFGF	5'- flankierend	G/T	T	GG : 0,757 G=0,865 GT : 0,216 T=0,135 TT : 0,027	
rs2280367	Chr. 15: 15q24 → 76419562	CRABP-I	5'- flankierend	A/G	G	keine Referenz vorhanden	
rs3813573	Chr. 15: 15q24 → 76418414	CRABP-I	5'- flankierend	A/G	G	AA : 0 A=0,133 AG : 0,267 G=0,867 GG : 0,733	
rs3756312	Chr. 5:	PDGFRB	3'-	A/G	G	A=0,580	[461]

rs3828610	15q33.1→149517387 Chr. 5: 15q33.1→149515818	PDGFRB	flankierend 3'- flankierend	A/C	C	G=0.420 AC : 0.472 A=0.670 CC : 0.094 C=0.330 AA : 0.434	
rs10476930	Chr. 5: 15q33.1→149,519,518	PDGFRB	3'- flankierend	C/T	C	CC : 0.833 C=0.917 CT : 0.167 T=0.083 TT : 0	
rs1800469	Chr. 19: 19q13.1→46552136	TGF-β1	3'- flankierend	C/T	C	CC : 0.517 C=0.690 CT : 0.345 T=0.310 TT : 0.138	[462-470]
rs1800470 (rs1982073)	Chr. 19: 19q13.1→46550761	TGF-β1	Codon 10, Exon 1	C/T	Nicht bekannt	CC : 0.150 C=0.375 CT : 0.450 T=0.625 TT : 0.400	[462-464, 466, 469- 478]
rs1800471	Chr. 19: 19q13.1→46550716	TGF-β1	Codon 25, Exon 1	C/G	G	CC : 0 C=0.075 CG : 0.150 G=0.925 GG : 0.850	[462-464, 466, 470, 473-475, 478-480]
rs1800472	Chr. 19: 19q13.1→46539700	TGF-β1	Codon 263, Exon 5	C/T	C	CC : 0.967 C=0.983 CT : 0.033 T=0.017 TT : 0	[462-464, 466, 468, 470]

C Ergebnisse

Es wurden 68 DNS-Proben von gesunden Kontrollpersonen und 41 DNS-Proben von MMD-Fällen gesammelt und in Bezug auf dreizehn SNPs analysiert.

Die nachfolgende Auswertung erfolgte bei 68 Kontroll- und 40 Fallproben nach Ausschluss einer Fallprobe auf Grund asiatischer Abstammung der entsprechenden Person.

Folgende statistische Werte wurden für die Auswertung berechnet:

- P-Werte für alle Genotypen
- P-Werte für alle Allele
- OR mit KI für alle Allele
- P-Werte für alle Allele unter der Annahme einer Dominanz von Allel 1
- OR mit KI für alle Allele unter der Annahme einer Dominanz von Allel 1
- P-Werte für alle Allele unter der Annahme einer Dominanz von Allel 2
- OR mit KI für alle Allele unter der Annahme einer Dominanz von Allel 2
- HWG für alle Fälle und Kontrollen

Die p-Werte des HWG aller SNPs lagen über der als signifikant erachteten Grenze von 0,05 mit Ausnahme des SNP rs1800471. Bei diesem differierte der entsprechende p-Wert des HWG für die Kontrollgruppe geringfügig mit einem Wert von 0,027.

Bezogen auf die Genotypen- und Allelhäufigkeiten wurden p-Werte unter 0,05 als statistisch signifikant angesehen.

Von den dreizehn analysierten und ausgewerteten SNPs, wiesen die zwei SNPs rs3828610 und rs1800471 statistisch signifikante Unterschiede zwischen Fall- und Kontrollgruppe auf. Sie werden daher im Folgenden als positive SNPs bezeichnet.

Einige Ergebnisse sowohl dieser zwei positiven SNPs als auch der negativen werden in den nächsten Abschnitten kurz dargestellt.

Anschließend folgt noch die Darstellung aller Resultate in tabellarischer Form.

1. Positive SNPs

- rs3828610 [A/C] liegt in der Promotorregion des PDGF-Rezeptors β . In unserer Studie zeigte sich ein p-Wert von 0,0373 und eine OR von 1,81, KI 95%=1,03;3,17 für den Alleltest und damit eine signifikante Differenz zwischen der Fall- und der Kontrollgruppe. Der Genotypentest unter Annahme einer Dominanz des A-Allels erwies sich als statistisch signifikant mit einem p-Wert von 0,0185 und einer OR von 3,21, KI 95%=1,182;8,74.

Bezüglich des A-Allels waren 38,24% (26) der Kontrollen homozygot, bei den Fällen hingegen fand sich dieser Genotyp nur bei 27,50% (11). Heterozygotie wiesen 50,00% (34) der Kontrollen und 42,50% (17) der Fälle auf. Homozygot für C waren nur 11,76% (8) der Kontrollen verglichen mit 30,00% (12) der Fälle. Das A-Allel könnte demnach ein möglicher protektiver Faktor vor MMD sein.

- rs1800471 [C/G] liegt im ersten Exon des TGF- β 1-Gens. Mit einem p-Wert von 0,0345 und einer OR 7,65, KI 95%=0,97;59,95 für den Alleltest zeigte sich in unserer Studie eine statistisch signifikante Assoziation dieses Polymorphismus mit MMD. Bis auf eine Person mit dem heterozygoten Genotyp (2,50%) wiesen alle Personen der Fallgruppe den homozygoten GG-Genotyp (97,50%) auf. In unserer Kontrollgruppe fanden sich hingegen nur 85,29% (58) mit GG-Genotyp. 11,77% (8) der Kontrollpersonen waren heterozygot und 2,94% (2) wiesen den CC-Genotyp auf. Im Alleltest zeigte sich konkordant hierzu eine höhere Frequenz des C-Allels in unserer Kontrollgruppe mit 0,090 als in der Fallgruppe (C=0,012). Im Genotypentest unter Annahme einer Dominanz des C-Allels zeigte sich in unserer Studie ein statistisch signifikanter p-Wert von 0,0428 und eine OR von 6,72, KI 95%=0,827;54,66.

Das C-Allel könnte demnach protektiv wirken bei der Genese von MMD.

3. Negative SNPs

bFGF:

- rs308395 [C/G] hat einen p-Wert von 0,1874 mit einer OR von 1,64, KI 95%=0,78;3,43 für den Alleltest. Unter Annahme einer Dominanz des G-Allels, beträgt der p-Wert 0,2295 mit einer OR von 1,67, KI 95%=0,722;3,85. 73,53% (50) der Kontrollen waren homozygot für das C-Allel, wohingegen nur 62,5% (25) der Fälle diesen Genotyp aufwiesen. Keine der Kontrollen wies Homozygotie für das G-Allel auf, wohingegen 2,5% (1) der Fallgruppe einen GG-Genotyp aufwiesen und auch der heterozygote Genotyp in der Fallgruppe häufiger vertreten war mit 35,00% (14) vs. 26,47% (18) in der Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse könnten auf das G-Allel als einen möglichen Risikofaktor hinweisen trotz fehlender statistischer Signifikanz.
- rs308447 [C/T] weist für den Alleltest einen p-Wert von 0,8232 mit einer OR von 1,07, KI 95%=0,61;1,87 auf. Im Vergleich der Genotypen- und Allelhäufigkeiten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Fall- und Kontrollgruppe. In beiden Gruppen war der heterozygote Genotyp am häufigsten vertreten mit 50,00 % (34) in der Kontrollgruppe und 57,50 % (23) in der Fallgruppe. Der homozygote CC-Genotyp (Kontrollgruppe: 35,29 % (24), Fallgruppe 30,00 % (12)) lag in beiden Gruppen mehr als doppelt so häufig vor wie der homozygote TT-Genotyp (Kontrollgruppe: 14,71% (10), Fallgruppe 12,50% (5)).
- rs10004506 [A/G] hat beim Alleltest einen p-Wert von 0,7317 mit einer OR von 1,37, KI 95%=0,36;5,27. Bei Vergleich der Genotyp- und Allelhäufigkeiten finden sich annähernd gleiche Ergebnisse in beiden Gruppen. Die errechneten Werte zeigten keine statistische Signifikanz.
- rs13434728 [G/T] hat einen p-Wert von 0,7112 und eine OR von 1,16, KI 95%=0,53;2,55 für den Alleltest. Mit einer annähernd gleichen Allelverteilung (Kontrollgruppe: G=0,868, T=0,132; Fallgruppe: G=0,850, T=0,150) und Genotypenverteilung (Kontrollgruppe : GG=75,00% (51), GT=23,53% (16), TT=1,47% (1); Fallgruppe: GG=70,00% (28),

GT=30,00% (12), TT=0% (0)) weist dieser SNP keine statistisch signifikanten Unterschiede für die zwei Gruppen vor.

Damit zeigte in unserer Studie keiner der vier untersuchten SNPs (rs308395, rs308447, rs10004506, rs13434728), upstream zum bFGF-Gen gelegen, eine signifikante Assoziation mit MMD.

CRABP-I:

- rs2280367 [A/G] weist im Alleltest einen p-Wert von 0,5797 und eine OR von 1,22, KI 95%=0,60; 2,49. In der Fallgruppe ergab sich eine Allelhäufigkeit für A von 0,175 und für G von 0,825. Die Genotypenverteilung zeigte ebenfalls eine Häufung der G-gekoppelten Genotypen mit 70,00% (28) der Fälle mit GG-Genotyp, 25,00% (10) der Fälle mit AG-Genotyp und nur 5,00 % (2) der Fälle mit AA-Genotyp. In der Kontrollgruppe zeigte sich bei der Allelhäufigkeit ebenfalls eine gehäufte Anzahl an G-Allelen mit 0,794 (A=0,206), jedoch geringer ausgeprägt als in der Fallgruppe. Die Genotypenverteilung betrug 60,29% (41) für den GG-Genotyp, 38,24% (26) für den AG-Genotyp und 1,47 % (1) für den AA-Genotyp. Trotz fehlender Signifikanz könnte das G-Allel ein Risikofaktor für die Genese von MMD sein.
- rs3813573 [A/G] zeigt keine statistische Signifikanz mit einem p-Wert von 0,6910 und einer OR von 1,16, KI 95%=0,56;2,42 im Alleltest. Bei den Allelhäufigkeiten zeigte sich eine ähnliche Verteilung in beiden Gruppen mit A=0,184 und G=0,816 in der Kontrollgruppe und A=0,163 und G=0,838 in der Fallgruppe.

Damit ließ sich in unserer Studie bei keinem der zwei untersuchten SNPs (rs2280367, rs3813573), upstream zum CRABP-I-Gen gelegen, eine signifikante Assoziation mit MMD nachweisen.

PDGFRB:

- rs3756312 [A/G] hat beim Alleltest einen p-Wert von 0,1655 und eine OR von 1,49, KI 95%=0,85;2,64. Der Genotypen-Dominanztest ergab für das G-Allel einen p-Wert von 0,2336 mit einer OR von 1,64,

KI 95%=0,725;3,71. Trotz fehlender statistischer Signifikanz zeigt sich eine Tendenz zu G als Risikoallel. In der Fallgruppe war das G-Allel mit einer Frequenz von 0,425 nachweisbar bei einer Genotypenverteilung von GG=17,50% (7), AG=50,00% (20) und AA=32,50% (13). In der Kontrollgruppe hingegen war das G-Allel nur mit einer Frequenz von 0,331 nachweisbar bei einer Genotypenverteilung von GG=10,29% (7), AG=45,59% (31) und AA=44,12% (30).

- rs10476930 [C/T] weist einen p-Wert von 0,1388 mit einer OR von 1,82, KI 95%=0,82;4,04 für den Alleltest vor. Es liegt keine statistische Signifikanz vor. Allerdings findet sich in der Kontrollgruppe der CC-Genotyp mit einer Häufigkeit von 80,60% (54) (CT=17,91% (12), TT=1,49% (1)). Übereinstimmend hierzu findet sich eine vielfach höhere C-Allelfrequenz mit 0,896 vs. 0,104 für das T-Allel. In der Fallgruppe findet sich ebenfalls der CC-Genotyp am häufigsten, jedoch nur mit 67,50% (27) (CT=30,00% (12), TT=2,50% (1)). Auch hier findet sich eine entsprechende Übereinstimmung bei der Allelverteilung, wobei jedoch im Vergleich mit der Kontrollgruppe das C-Allel nur mit einer Frequenz von 0,825 nachweisbar war (T=0,175). Diese Ergebnisse könnten auf das C-Allel als protektiven Faktor hinweisen.

Damit erzielten in unserer Studie diese zwei untersuchten SNPs (rs3756312, rs10476930), upstream zum PDGF-Rezeptor- β -Gen gelegen, keine signifikanten Ergebnisse. Beide SNPs zeigten jedoch eine Tendenz zu bestimmten Risiko- bzw. protektiven Allelen.

TGF- β 1:

- rs1800469 [C/T] hat einen p-Wert von 0,8975 und eine OR von 1,04, KI 95%=0,57;1,90 im Alleltest. Mit einer annähernd gleichen Allelverteilung (Kontrollgruppe : G=0,684, T=0,316; Fallgruppe: G=0,692, T=0,308) und Genotypenverteilung (Kontrollgruppe : CC=48,53% (33), CT=39,71% (27), TT=11,76% (8), Fallgruppe: CC=46,15% (18), CT=46,15% (18), TT=7,70% (3)) weist dieser SNP keine statistisch signifikanten Unterschiede für die zwei Gruppen auf.

- rs1800470 [C/T] hat beim Alleltest einen p-Wert von 0,2444 mit einer OR von 1,41, KI 95%=0,79;2,52. Der Genotypendominanztest ergab für das T-Allel einen p-Wert von 0,1008, KI 95%=0,777;10,94. In der Fallgruppe fand sich das T-Allel mit einer Frequenz von 0,675 und das C-Allel mit einer Frequenz von 0,325. In der Kontrollgruppe hingegen fand sich das T-Allel nur mit einer Frequenz von 0,596 (C=0,404). Ähnliches spiegelt sich auch bei der Genotypenverteilung wieder mit einer höheren Frequenz der TT- (42,50% (17)) und CT- (50,00% (20)) Genotypen in der Fallgruppe vs. der TT- (38,24% (26)) und CT- (42,65% (29)) Genotypen in der Kontrollgruppe. Damit zeigt sich eine eindeutige Tendenz zum T-Allel als möglichem Risikofaktor für MMD.
- rs1800472 [C/T] weist im Alleltest einen p-Wert von 0,6893 auf, KI 95%=0,34;8,74. Im Vergleich der Genotypen- und Allelhäufigkeiten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Fall- und Kontrollgruppe. In beiden Gruppen war der CC-Genotyp am häufigsten vertreten mit 92,45% (63) in der Kontrollgruppe und 92,30% (36) in der Fallgruppe. Der heterozygote Genotyp fand sich bei der Kontrollgruppe mit 4,55% (3) und in der Fallgruppe mit 7,70% (3). Der TT-Genotyp fand sich in keiner der beiden Gruppen.

Damit zeigten in unserer Studie diese drei untersuchten SNPs (rs3756312, rs10476930, rs1800470), upstream zum bzw. im TGF- β 1-Gen gelegen, keine signifikante Assoziation mit MMD. Bei dem SNP rs1800470 zeigte sich jedoch eine eindeutige Tendenz zu T als Risikoallel.

Tab. 11: Darstellung der Untersuchungsergebnisse unserer Studie.

 = positive SNPs

KG=Kontrollgruppe, GT=Genotyp, F=Frequenz DT=Dominanztest, OR=Odds Ratio, HWG=Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, Genotyp-Frequenz: Genotyp→absolute Patientenzahl (relative Patientenzahl), k.A.=keine Angabe,

*** berechnet mit Fisher-Exakt-Test**

Zytokin	SNP	KG GT-F	KG Allel-F	Fallgruppe GT-F	Fallgruppe Allel-F	P Wert GT	P Wert Alleltest	OR Alleltest	GT-DT 1	OR GT-DT 1	GT-DT 2	OR GT-DT 2	HWG Teet
DFGF	rs303696 [C/G]	n=68 CC=50 (73,53%) CG=16 (26,47%) GG=0 (0%)	n=68 C=0,863 G=0,132	n=40 CC=25 (62,5%) CG=14 (35,00%) GG=1 (2,50%)	n=40 C=0,800 G=0,200	0,2516	0,1874	1,64 (0,78;3,43)	0,1902 (C)	k.A.	0,2296 (G)	1,67 (0,72;3,85)	>0,05
		n=68 CC=24 (35,29%) CT=34 (50,00%) TT=10 (14,71%)	n=68 C=0,603 T=0,397	n=40 CC=12 (30,00%) CT=23 (57,50%) TT=5 (12,50%)	n=40 C=0,588 T=0,412	0,7526	0,6232	1,07 (0,61;1,67)	0,7489 (C)	1,21 (0,38;3,82)	0,5730 (T)	1,27 (0,56;2,96)	>0,05
	rs10004506 [A/G]	n=66 AA=0 (0%) AG=5 (7,59%) GG=61 (92,42%)	n=66 A=0,088 G=0,962	n=39 AA=0 (0%) AG=4 (5,13%) GG=35 (94,87%)	n=39 A=0,081 G=0,949	k.A.	0,7317*	1,37 (0,36;5,27)	0,6354 (A)	1,39 (0,35;5,54)	k.A.	k.A.	>0,05
		n=68 GG=51 (75,00%) GT=16 (23,53%) TT=1 (1,47%)	n=68 G=0,863 T=0,132	n=40 GG=28 (70,00%) GT=12 (30,00%) TT=0 (0%)	n=40 G=0,850 T=0,150	0,6324	0,7112	1,16 (0,63;2,55)	0,4410 (G)	k.A.	k.A.	0,5713 (T)	1,29 (0,53;3,07)
	CRABP-I: [A/G]	n=68 AA=1 (1,47%) AG=26 (38,24%) GG=41 (60,29%)	n=68 A=0,206 G=0,794	n=40 AA=2 (5,00%) AG=10 (25,00%) GG=28 (70,00%)	n=40 A=0,175 G=0,825	0,2436	0,5797	1,22 (0,60;2,49)	0,3105 (A)	1,54 (0,66;3,53)	0,2811 (G)	3,33 (0,30;40,19)	>0,05
		n=68 AA=2 (2,94%) AG=21 (30,88%) GG=45 (66,18%)	n=68 A=0,184 G=0,816	n=40 AA=2 (5,00%) AG=9 (22,50%) GG=29 (72,50%)	n=40 A=0,163 G=0,837	0,6360	0,6910	1,16 (0,66;2,42)	0,4944 (A)	1,35 (0,57;3,17)	0,5843 (G)	1,74 (0,23;12,84)	>0,05
PDGFRB [A/G]	n=68 AA=30 (44,12%) AG=31 (45,59%) GG=7 (10,29%)	n=68 A=0,669 G=0,331	n=40 AA=13 (32,50%) AG=20 (50,00%) GG=7 (17,50%)	n=40 A=0,575 G=0,425	0,3741	0,1655	1,49 (0,65;2,64)	0,2817 (A)	1,85 (0,59;5,72)	0,233 (G)	1,64 (0,72;3,71)	>0,05	
	n=68 AA=25 (36,76%) AC=34 (50,00%) CC=8 (11,76%)	n=68 A=0,632 C=0,368	n=40 AA=11 (27,50%) AC=17 (42,50%) CC=12 (30,00%)	n=40 A=0,575 C=0,425	0,0597	0,0373	1,81 (1,03;3,17)	0,0165 (A)	3,21 (1,18;8,74)	0,2563 (C)	1,63 (0,69;3,81)	>0,05	
rs10476930 [C/T]	n=67 CC=54 (80,60%) CT=12 (17,91%) TT=1 (1,49%)	n=67 C=0,896 T=0,104	n=40 CC=27 (67,50%) CT=12 (30,00%) TT=1 (2,50%)	n=40 C=0,825 T=0,175	0,3110	0,1388	1,82 (0,82;4,04)	0,7097 (C)	1,66 (0,10;27,83)	0,1264 (T)	2,00 (0,81;6,49)	>0,05	
	n=68 CC=33 (48,53%) CT=27 (39,71%) TT=8 (11,76%)	n=68 C=0,664 T=0,316	n=39 CC=18 (46,15%) CT=18 (46,15%) TT=3 (7,70%)	n=39 C=0,662 T=0,338	0,7138	0,6975	1,04 (0,57;1,90)	0,5044 (C)	1,60 (0,39;6,42)	0,8128 (T)	1,10(0,50;2,4 2)	>0,05	
rs1800470 [C/T]	n=68 CC=13 (19,11%) CT=29 (42,65%) TT=26 (38,24%)	n=68 C=0,404 T=0,596	n=40 CC=3 (7,50%) CT=20 (50,00%) TT=17 (42,50%)	n=40 C=0,325 T=0,675	0,2580	0,2444	1,41 (0,79;2,52)	0,6620 (C)	1,19 (0,53;2,64)	0,1008 (T)	2,92 (0,77;10,94)	>0,05	
	n=68 CC=2 (2,94%) CG=8 (11,77%) GG=58 (85,29%)	n=68 C=0,0910 G=0,090	n=40 CC=0 (0%) CG=1 (2,50%) GG=39 (97,50%)	n=40 C=0,988 G=0,012	0,1232	0,0345*	7,65 (0,97;59,95)	0,0428 (C)	6,72 (0,82;54,66)	0,2736 (G)	k.A.	k.A.	0,027
rs1800472 [C/T]	n=66 CC=63 (92,45%) CT=3 (4,55%) TT=0 (0%)	n=66 C=0,980 T=0,020	n=39 CC=36 (92,30%) CT=3 (7,70%) TT=0 (0%)	n=39 C=0,961 T=0,039	k.A.	0,6893*	1,72 (0,34;8,74)	k.A.	k.A.	0,5021 (T)	1,75 (0,33;9,13)	>0,05	

D Diskussion

MMD ist eine zerebrovaskuläre Krankheit, deren Ätiologie und Pathogenese noch weitgehend ungeklärt sind. Einige Studien deuten darauf hin, dass genetische Mechanismen ätiologisch von großer Bedeutung sind und pathogenetisch diverse Zytokine eine wichtige Rolle spielen.

In zahlreichen Studien wurden bereits allgemeine pathohistologische Befunde von Gefäßen bei MMD-Erkrankten beschrieben. Hierzu gehören u.a. eine Hyperplasie der Intima mit proliferierenden SMCs, eine unregelmäßig gewundene und teilweise duplizierte oder auch unterbrochene Lamina elastica interna sowie eine Ausdünnung der Media [46-48]. Da diverse Zytokine sich im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen bei MMD-Erkrankten verändert exprimiert zeigten und sich im Rahmen anderer Untersuchungen an den oben genannten allgemeinen histopathologischen Veränderungen beteiligt zeigten, schlossen einige Autoren, dass diese Zytokine mit großer Wahrscheinlichkeit an der Pathogenese von MMD beteiligt sind.

Ziel dieser Studie war nun, Polymorphismen im genetischen Bereich einzelner verändert exprimierter Zytokine bzw. derer Rezeptoren bei MMD-Erkrankten aufzudecken und somit eine mögliche Assoziation zwischen diesen genetischen Mutationen und der Ätiopathogenese von MMD aufzudecken.

In einem 2007 erschienenen Artikel von Österreicher *et al.* über genetische Analysen im Rahmen von Lebererkrankungen wurde gefordert, dass Gene, wie sie im Rahmen unserer Studie untersucht wurden, eine biologisch plausible Rolle spielen und die Kandidatengene deshalb nach bekannter pathophysiologischer Funktion des kodierten Proteins ausgewählt werden sollten [481].

Basierend auf ausführlichen Literaturrecherchen stufen wir daher die vier Zytokine bFGF, CRABP-I, PDGF und TGF- β 1 als mögliche relevante Faktoren bei der Ätiopathogenese von MMD ein, wobei bei PDGF der Schwerpunkt auf einer veränderten Expression des β -Rezeptors liegt. Aus den genetischen Regionen dieser Zytokine wählten wir anschließend wiederum dreizehn SNPs aus und untersuchten die DNS von Patienten mit angiographisch nachgewie-

sener MMD-Erkrankung im Bereich dieser SNPs in Bezug auf Allelfrequenz und Genotypfrequenz im Vergleich mit DNS einer gesunden Kontrollgruppe.

Die Rolle bei MMD und die Ergebnisse der jeweiligen Zytokine bzw. der entsprechenden SNPs in dieser Studie werden in den folgenden Abschnitten diskutiert

1. bFGF

In unserer Studie untersuchten wir vier, upstream zum bFGF-Gen gelegene SNPs (rs308395, rs308447, rs10004506, rs13434728).

Wir wählten bFGF als mögliches relevantes Zytokin bei der Ätiopathogenese von MMD aus, da bFGF als multifunktionales Zytokin vielfältige vaskuläre Umbauprozesse und Mechanismen beeinflusst, wie z.B. Proliferation glatter Muskelzellen [156, 157], Intimahyperplasie [154, 155, 159] und Angiogenese [158, 165].

Bei MMD-Erkrankten ist bFGF immunhistopathologisch verstärkt nachweisbar in der Dura mater [67], in Zellen der STA, wie z.B. SMCs und Endothelzellen [67] und Arterien des Circulus Willisii [66], wohingegen Kontrollen höchstens eine sehr leichte Immunoreaktivität aufweisen [161, 164].

Ebenso ist der bFGF-Rezeptor in einigen Zellarten signifikant erhöht, wie z.B. in SMCs aus der STA von MMD-Patienten [443]. Weiterhin findet sich bFGF signifikant erhöht im CSF [163, 444], nicht jedoch im Blutserum, wie eine aktuelle Studie von Kang et al. ergab [445]. Als Ursache hierfür wäre denkbar, dass es sich bei den erhöhten Werten von bFGF im CSF um ein lokales Phänomen handelt und kein systemisches, durch die selbstinduzierende und damit wirkungspotenzierende Eigenschaft von bFGF und die geringe Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke für bFGF (<1%).

Ein ähnlicher Denkansatz bezüglich der selbstinduzierenden Eigenschaft und lokalen Wirkungsweise von bFGF findet sich auch in Yoshimotos „bFGF-Moyamoya Disease Theory“. Diese liefert eine mögliche Erklärung für die different lokalisierten stenotischen und neovaskularisierenden Prozesse bei

MMD. Durch einen unbekanntem Stimulus kommt es zu einer Freisetzung von bFGF in die basale Zisterne. Es folgt eine langanhaltende und hochkonzentrierte Infiltration der basalen Hirnarterien mit bFGF und Stenosierung der basalen Hirnarterien. Gleichzeitig diffundiert bFGF langsam über den gesamten Subarachnoidalraum, wodurch ein Konzentrationsabfall resultiert und die Ausbildung der Kollateralen durch die neoangiogenetische Funktion von bFGF ermöglicht wird [65].

Somit könnte bFGF eine Intimahyperplasie mit nachfolgender Stenosierung verursachen und gleichzeitig über seine direkt angiogenen Eigenschaften die Entstehung der Neovaskularisation bei MMD ermöglichen [161-164, 446].

Unter Berücksichtigung oben genannter Aspekte erscheint daher ein ätiologischer Zusammenhang zwischen einer genetisch bedingten veränderten Expression von bFGF und der Pathogenese von MMD durchaus denkbar.

Dies unterstützen auch Untersuchungen von Yoshimoto et al. [163], nach welchen wichtige bFGF-Releasemechanismen eine enge Korrelation mit ischämischen Hirnschäden aufweisen. Diese Korrelation findet sich jedoch nicht bei ischämisch-okklusiver Arteriosklerose und weiterhin sind bei MMD bestimmte Faktoren nicht erhöht, welche bei sonstigen ischämischen Hirnschädigungen erhöht sind. Yoshimoto et al. schließen hieraus, dass die oben beschriebene Korrelation spezifisch ist für MMD.

Allerdings deuten Untersuchungen von Suzui et al. an, dass eine erhöhte Expression von bFGF nicht nur auf MMD begrenzt ist, da auch bei einigen MMD-negativen Kontrollen eine entsprechend erhöhte Immunoreaktivität nachgewiesen werden konnte. Diese Feststellung würde wiederum dafür sprechen, dass noch andere Faktoren außer bFGF an der Pathogenese von MMD mitbeteiligt sein müssen [161].

Bei der Auswertung unserer Ergebnisse zeigte keiner der SNPs signifikante Unterschiede zwischen der Fall- und der Kontrollgruppe.

Mögliche Erklärungen hierfür könnten sein, dass

- die vier ausgewählten SNPs, von denen der am nächsten liegende bereits fast 1000 Basenpaare upstream des Gens liegt, zu weit entfernt

sein könnten vom relevanten Transkriptionsgebiet um einen entscheidenden Einfluss auf die Expression zu nehmen.

- die krankheitsassoziierten SNPs im Genbereich selbst liegen.
- den erhöhten bFGF-Konzentrationen entgegen unserer Basishypothese, keine genetische Ursache im Bereich des bFGF-Gens zu Grunde liegt, sondern die Erhöhung nur eine Folge im Rahmen einer Reaktionskaskade eines anders lokalisierten Gendefekts ist.

Um daher die erhöhten Konzentrationen von bFGF und damit die Rolle von bFGF bei MMD zu klären sind weitere Studien nötig, wie z.B. eine komplette Sequenzierung der näher als 1000 Basenpaare am Gen gelegenen Promotorregion und des Gens selbst.

2. CRABP-I

Wir genotypisierten im Rahmen unserer Studie zwei SNPs (rs2280367, rs3813573) in der Promotorregion von CRABP-I.

Die Auswahl von CRABP-I basierte unter anderem auf Untersuchungen von Kim et al., welche eine erhöhte Konzentration von CRABP-I im CSF von MMD-Patienten nachwiesen im Vergleich zu Kontrollpersonen [1].

CRABP-I beeinflusst, über Retinsäure vermittelt, eine Vielzahl von Mechanismen u.a. Proliferation und Migration von SMCs durch genetische Modulation anderer Zytokine [169, 170]. Bei Störungen in diesem komplexen Gleichgewicht wären daher das Entstehen pathologischer Gefäßwandveränderungen und damit eine Beteiligung an der Genese von MMD durchaus denkbar. Allerdings ist bislang unklar, inwiefern die nachgewiesene Konzentrationsveränderung spezifisch für MMD ist, da Kim et al. in ihrer Studie bei einem Kontrollpatienten mit arteriovenöser Malformation ebenfalls eine erhöhte Expression von CRABP-I nachweisen konnten. Es könnte daher allgemein eine Korrelation von zerebrovaskulären Krankheiten mit einer CRABP-I-Erhöhung bestehen [1]. In unseren Untersuchungen zeigte keiner der zwei, upstream zu CRABP-I

gelegenen SNPs signifikante Unterschiede zwischen den beiden Studien-
gruppen.

Da CRABP-I jedoch noch eine große Anzahl weiterer beschriebener Poly-
morphismen beinhaltet, besteht dennoch die Möglichkeit einer genetischen
Aberration im Bereich des CRABP-I-Gens.

Momentan ist die Frage bzgl. einer ursächlichen Beteiligung von CRABP-I an
der spezifischen Genese von MMD noch schwer diskutierbar, da die genaue
Wirkungsweise von CRABP-I und atRA im Allgemeinen, sowie das
Expressionsmuster von CRABP-I bei MMD noch nicht vollständig geklärt ist.

Dennoch erscheinen weitere Studien diesbezüglich sinnvoll, da bei Beteiligung
von CRABP-I an der Ätiopathogenese von MMD oder anderen hyperprolife-
rativen Krankheiten die Applikation von atRA einen möglichen therapeutischen
Nutzen beinhalten könnte und somit ein weiterer Schritt in Richtung kurative
Therapie darstellen könnte. [1].

3. PDGFRB

Wir untersuchten drei SNPs (rs3756312, rs3828610, rs10476930), upstream
zum PDGF-Rezeptor β gelegen.

PDGF ist ein multipotentes Zytokin mit bislang fünf bekannten Isoformen
PDGF-AA, -BB, -AB, -CC, -DD. Diese Isoformen vermitteln ihre Wirkung über
die miteinander strukturell verwandten α - und β -Rezeptoren, wobei der in
unserer Studie relevante β -Rezeptor nur die B- und D-Kette von PDGF binden
kann.

Wie bereits im Abschnitt A.3.3. (PDGF bei MMD) dargestellt, ist PDGF in
vielfältige bei MMD relevante Prozesse involviert, wie z.b.

- Wundheilung,
- Chemotaxis,
- die Erhaltung der strukturellen Integrität von Blutgefäßen,
- Angiogenese,

- Intimahyperplasie bzw. Neointimabildung über Beeinflussung von Fibroblasten zur verstärkten Kollagenbildung und –sekretion sowie
- SMC-Migration und Proliferation [241, 242, 269-275, 290, 291, 330, 331].

Bei MMD-Patienten wiesen Aoyagi et al. eine signifikant geringere Anzahl an PDGF-Rezeptoren auf kultivierten glatten Muskelzellen aus der Arteria temporalis superficialis (HMSMC) nach [447]. Als Bestätigung der bereits bekannten Eigenschaften von PDGF als potentes Mitogen mit Beeinflussung des Zellwachstums und des Zellüberlebens über Inhibition von Apoptose zeigten sich signifikant längere Verdopplungszeiten und ein vermindertes Ansprechen der HMSMC auf exogen zugeführtes PDGF in Bezug auf DNS-Synthese und Proliferation [197, 235, 277]. Es ist noch anzumerken, dass in Bezug auf Morphologie, Chromosomensatz und Behandlung der Zelllinien kein Unterschied vorhanden war, was eine veränderte Reaktion hätte rechtfertigen können [448]. Yamamoto et al. konnten in ihrer Studie ebenfalls einen Unterschied bei kultivierten Zellen von MMD-Patienten zu entsprechenden Kontrollzellen feststellen. Bei MMD-Patienten ließ sich nach Applikation von sowohl PDGF-AA als auch -BB keine signifikante Erhöhung der DNS-Synthese nachweisen, wohingegen sich bei den Kontrollen eine signifikante Erhöhung zeigte [334]. Bislang ist unklar, ob bei MMD-Patienten weniger Rezeptoren pro Zelle vorhanden sind oder weniger Zellen, welche PDGF-Rezeptoren exprimieren. Die verminderte Anzahl könnte durch insuffizientes Recycling oder einen verringerten intrazellulären Pool erklärt werden und ist mit großer Wahrscheinlichkeit nicht auf einen erhöhten Umsatz der Rezeptoren zurück zu führen [447]. Unsere Studie ergab für den in der Promotorregion des PDGF-Rezeptor β gelegenen SNP rs3828610 signifikante Unterschiede zwischen der Patienten- und der Kontrollgruppe mit einem p-Wert von 0,0373 und einer OR von 1,81, KI 95%=1,03;3,17 für den Alleltest. In der Kontrollgruppe fand sich signifikant häufiger das A-Allel mit einer Frequenz von 0,632 versus einer Frequenz von 0,488 in der Patientengruppe. Zusätzlich fand sich ein statistisch signifikanter Genotypentest unter Annahme einer Dominanz des A-Allels mit einem p-Wert von 0,0185 und einer OR von 3,21, KI95%= 1,182;8,74. Das A-Allel könnte demnach ein möglicher protektiver Faktor vor MMD sein.

Die beiden anderen untersuchten SNPs (rs3756312, rs10476930), upstream zum PDGF-Rezeptor β gelegen, wiesen keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen auf.

Es ist nun zu diskutieren, in welcher Form der o.g. positiv nachgewiesene SNP rs3828610 an der Pathogenese von MMD beteiligt sein könnte. Eine mögliche Folge dieses Polymorphismus im Bereich der Promotorregion des PDGF-Rezeptor β könnte eine verminderte Transkription bei MMD-Patienten sein, wodurch wiederum die geringere Anzahl an PDGF- β -Rezeptoren erklärt werden könnte.

Allerdings könnte die veränderte Expression der PDGF-Rezeptoren auch Folge anderer beeinflussender Faktoren oder durch einen Defekt im Bereich der Rezeptorgene selbst induziert sein.

Da nach Aoyagi et al. die Reaktionsfähigkeit von HMSMC speziell für PDGF, aber zudem auch für viele andere im Serum vorhandene Mitogene vermindert ist, könnten allgemeine Prozesse bei MMD-SMC gestört sein, welche unabhängig von einer verminderten Rezeptorzahl von PDGF zu einer veränderten Reaktion der Zellen und damit zur Entstehung von MMD führen [448].

Nach Untersuchungen von Walker et al. sind auf Zellen, welche PDGF-ähnliche Mitogene sezernieren, die PDGF-Rezeptoren kontinuierlich herunter reguliert [297]. Damit könnte auch eine gestörte Downregulation der Rezeptoren ursächlich bzw. eine Folge von erhöhter PDGF-Expression sein [447]. Solch eine erhöhte PDGF-Expression zeigte sich bei MMD-Patienten bei Untersuchungen von Kang et al. mit 18fach erhöhten Plasmaleveln von PDGF-BB im Vergleich zu gesunden Kontrollen [445]. Im Liquor fand sich jedoch keine erhöhte Konzentration von PDGF bei MMD-Patienten [65].

Auch genetische Defekte von Faktoren, welche beim intrazellulären Pooling von PDGF-Rezeptoren beteiligt sind und welches nach Aoyagi et al. gestört sein könnte, könnten zu einer entsprechend verminderten Expression von PDGF-Rezeptoren auf der Zelloberfläche führen [447].

Bowen-Pope et al. konnten zeigen, dass es keine Korrelation zwischen der PDGF-Rezeptorzahl auf Zellen und der Stärke des mitogenen Effekts durch PDGF gibt, außer die Rezeptorzahl liegt unter einem bestimmten absoluten

Minimum [482]. Es könnten demnach physiologischerweise auf den meisten Zellarten nur eine geringe Anzahl von PDGF-Rezeptoren vorhanden sein.

Dem widerspricht jedoch die Tatsache, dass Aoyagi et al. auf den Kontrollzellen eine signifikant höhere Expression von PDGF-Rezeptoren nachweisen konnte. Diese Tatsache lässt den Schluss zu, dass zumindest SMCs der Arteria temporalis superficialis, aus welcher die Proben gewonnen wurden, demnach zur Ausübung der physiologischen Funktion eine höhere Anzahl von PDGF-Rezeptoren zu besitzen scheinen [447].

Um nun die Frage einer möglichen Beteiligung von PDGF an der Ätiopathogenese weiter zu diskutieren, soll im Folgenden zunächst eine mögliche Theorie zur Pathogenese von MMD dargestellt werden und anschließend die Relevanz von PDGF diesbezüglich.

Bereits in den 70er Jahren konnte durch Studien an Rattenarterien gezeigt werden, dass bei Arterienwandverletzung, speziell der Intima, durch Ballonkatheter Gefäßreparaturmechanismen induziert werden, welche über lokale Wachstumsfaktoren mediiert werden [297, 319, 483-486]. Hierzu gehören die Proliferation und Migration von SMCs zu der verletzten Oberfläche und die Bildung einer fibrozellulären Intima [487-491]. Auch bei Arteriosklerose finden sich ähnliche histopathologische Veränderungen, wie Intimahyperplasie, Migration und Proliferation von SMCs und die Ausbildung einer entzündlichen Reaktion der Gefäßwand durch lokale Mediatoren [492]. Weiterhin steht auch bei Arteriosklerose zu Anfang eine Verletzung der Arterienwand durch mechanische Faktoren, wie z.B. hohen Blutdruck oder hohe Scherspannung [493, 494]. Als Folge dieser Verletzung werden nach der Response-to-injury-Theorie von Ross et al. die o.g. histopathologischen Veränderungen induziert [495].

Betrachtet man nun die histopathologischen Veränderungen bei MMD, so finden sich auch hier die oben beschriebenen Merkmale, wie Intimahyperplasie, die Beteiligung von SMCs und eine intramurale Entzündungsreaktion. Weiterhin gab es in vielfältigen Untersuchungen, wie bereits dargestellt, auch bei MMD klare Hinweise für eine Beteiligung von diversen Zytokinen an der Pathogenese von MMD. Ein möglicher auslösender Faktor für die Genese von MMD könnte demnach ebenfalls die Verletzung der Arterienwände in den betroffenen Gefäß-

bereichen sein, woraus die entsprechenden, scheinbar allgemein aus Gefäßwandverletzung resultierenden Wandveränderungen entstehen.

Setzt man nun voraus, dass ein genetischer Defekt im Bereich des PDGF-Rezeptorgens vorliegt, welcher die verringerte Rezeptorzahl bei MMD-SMC bedingt, so könnte folgende Überlegung hinweisend sein für die Genese von MMD: Nach Yamamoto et al. scheint PDGF bei induzierter Verletzung der Arterienwand notwendig für die normale Wundheilung in der Frühphase [334]. Die bei Aoyagi et al. gezeigte geringere proliferative Reaktion von MMD-SMCs könnte hinweisend sein für einen Defekt bei der physiologischen Wundheilung, z.B. durch ein vermindertes PDGF-Signal bei geringerer Rezeptoranzahl. Unterstützend für diese Theorie sind auch Untersuchungen von Beer et al., in welchen gezeigt werden konnte, dass der β -Rezeptor von PDGF bei gestörter Wundheilung bei diabetischen Mäusen vermindert exprimiert wird [302].

Diese Störung in der physiologischen Wundheilung könnte zu einer verzögerten Heilung des Arterienwandschadens führen [496] und damit zu einer verlängerten Exposition gegenüber Serummitogenen. Es würde damit eine langsamere, aber ungleich längere Reaktion der SMC resultieren, wodurch die bei MMD beschriebenen pathogenetischen Veränderungen erklärt werden könnten [448]. Eine Darstellung dieser im Folgenden als „MMD-Genese-Hypothese“ bezeichneten Theorie findet sich in Abbildung 26 (s.u.).

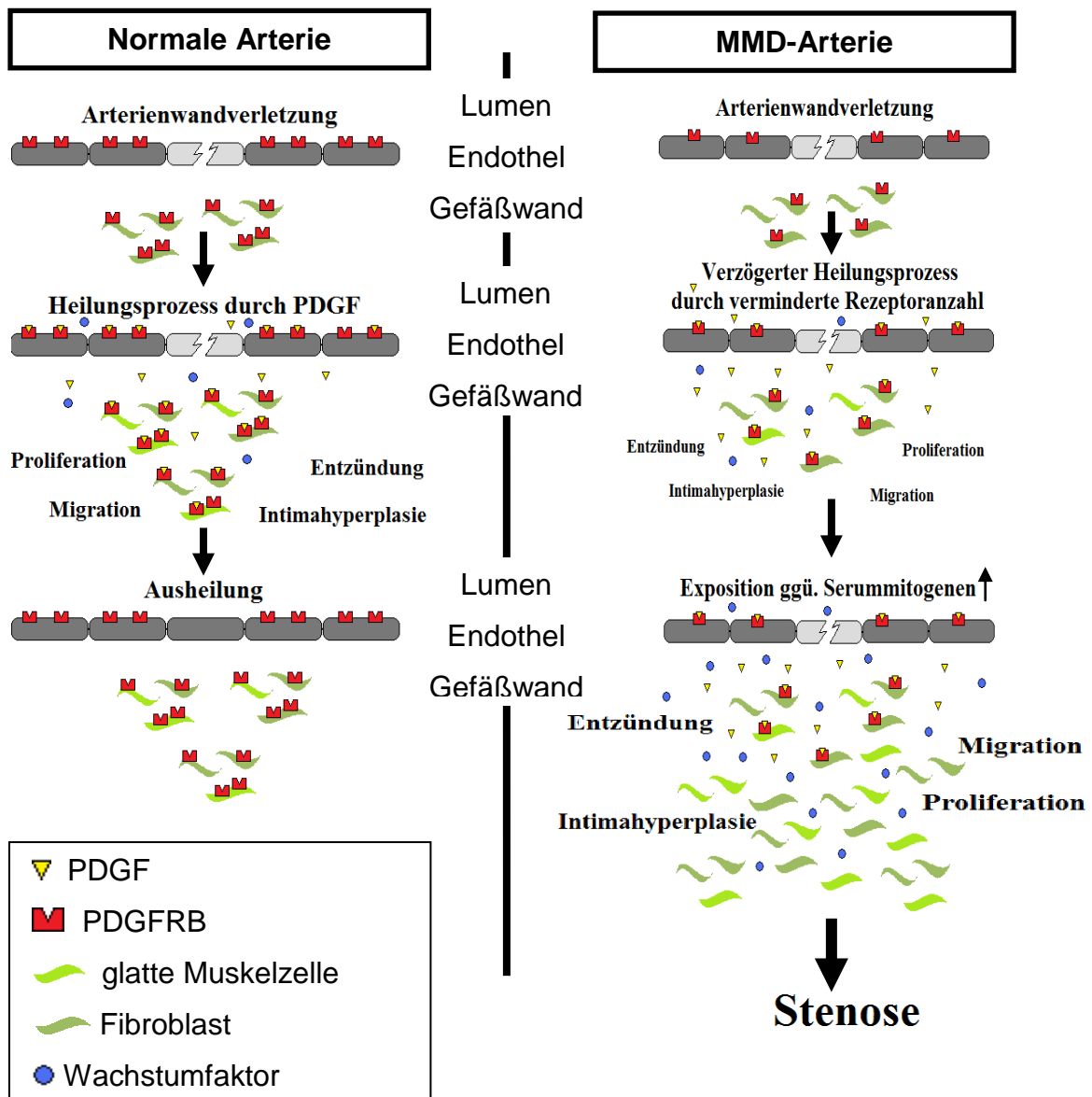


Abb. 26: MMD-Genese-Hypothese. Bei MMD-Patienten ist nach Arterienwandverletzung der physiologische Reparaturprozess gestört, was zu Stenosierung führt. Nähere Ausführungen s. Text.

Unklar ist nach dieser Theorie weiterhin die Selektivität der betroffenen Gefäße bei MMD. Diskutiert werden der hohe „shear stress“ in den basalen Hirnarterien, Apoptosemechanismen oder andere lokale Faktoren, wozu auch die verminderte PDGF-Rezeptorzahl zählen könnte.

Zur Klärung dieser Frage sowie allgemein der Beteiligung von PDGF bei der Ätiopathogenese von MMD, sollten daher weitere funktionale und genetische

Studien, bevorzugt mit Proben aus betroffenen Gefäßen und mit größeren Fallzahlen, durchgeführt werden.

4. TGF- β 1

In unserer Studie untersuchten wir vier SNPs im genetischen Bereich von TGF- β 1. Diese lagen in der Promotorregion (rs1800469), in Exon 1 (Codon 10, rs1800470 und Codon 25, rs1800471), kodierend für die Signalsequenz, welche für eine korrekte Sekretion des Proteins nötig ist, und in Exon 5 (rs1800472). Alle drei intragenisch gelegenen SNPs (rs1800470, rs1800471, rs1800472) können durch Punktmutation eine Aminosäuresubstitution verursachen.

TGF- β 1 ist involviert in vielfältige Mechanismen im Bereich Zellwachstum und -differenzierung, Angiogenese, Synthese von EZM, Erhaltung der Gefäßwand-homöostase, Neointimabildung bzw. -hyperplasie u.v.a.m. .

Bei MMD-Patienten zeigte sich eine signifikant erhöhte Konzentration von TGF- β 1 im Serum im Vergleich zu gesunden Patienten [56], wohingegen im Liquor keine signifikant erhöhte Expression von TGF- β 1 nachweisbar war [65].

In Untersuchungen von Hojo et al. fanden sich noch weitere Expressionsunterschiede in Bezug auf TGF- β 1 und MMD. Es zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression von TGF- β 1 mRNA in kultivierten glatten Muskelzellen aus der STA von MMD-Erkrankten im Vergleich zu kultivierten Muskelzellen von arteriosklerotisch veränderten Gefäßen [56]. Bei Vergleich von arteriosklerotischen zu nicht-arteriosklerotischen Gefäßen zeigten sich in vivo wiederum keine signifikanten Unterschiede der TGF- β 1 mRNA-Werte, was für einen MMD-spezifischen Effekt spricht [449].

Im Zusammenhang dieser Studien wurde bereits vielfach über mögliche pathogenetische Zusammenhänge von MMD und der veränderten Expression von TGF- β 1 diskutiert.

Nach Aoyagi et al. könnte eine veränderte Expression von TGF- β 1 verantwortlich sein für die Verdickung der Intima bei MMD [447].

Ebenso schreiben Hojo et al. TGF- β 1 eine mögliche Rolle bei der Intimahyperplasie bei MMD zu. Diese Theorie basiert u.a. auf Untersuchungen von Nabel et al., welche ergaben, dass ein direkter Transfer des TGF- β 1-Gens in normale Schweinearterien zu einer starken Produktion von EZM begleitet von Intima- und Mediahyperplasie führt [331]. Unterstützt wird diese Annahme auch durch Untersuchungen von Khan et al., welche TGF- β 1 eine entscheidende Rolle bei der Intimaverdickung nach Gefäßverletzungen zuschreiben [497].

Zudem konnten Yamamoto et al. bei MMD-Patienten eine erhöhte Elastinsekretion nach Stimulation mit TGF- β 1 nachweisen. Die Sekretion von Elastin, welches nach Karnik et al. eine zentrale Rolle bei gefäßproliferativen Krankheiten mit Neointimaformation einnimmt, konnte bereits mehrfach durch TGF- β 1 induziert nachgewiesen werden [498-502].

Majesky et al. konnten nachweisen, dass Verletzungen an Rattenarterien zu einer erhöhten Expression von TGF- β 1 während der Neointimabildung führt [500, 503]. Demnach könnte die Beteiligung von TGF- β 1 bei MMD ähnlich der von PDGF nach der oben beschriebenen MMD-Genese-Hypothese sein. Nach Intimaverletzung ist durch eine fehlgesteuerte Regulation des TGF- β 1 der physiologisch folgende Reparaturprozess der Gefäßwand gestört und es folgt eine überschießende bzw. fehlgeleitete Reaktion mit den für MMD typischen Veränderungen.

Klare Nachweise für eine ätiopathogenetische Relevanz von TGF- β 1 bei MMD sind letztendlich noch ausstehend.

In unserer Studie ergab sich für den SNP rs1800471 eine statistisch signifikante Assoziation mit MMD mit einem p-Wert von 0,0345 und einer OR 7,65, KI 95%=0,97;59,95 für den Alleltest. Die Mutation der Ursprungsbase Guanin zu Cytosin bewirkt bei diesem Polymorphismus einen Aminosäureaustausch von Arginin (CGG) zu Prolin (CCG).

Es zeigte sich eine signifikant niedrigere Frequenz des C-Allels in unserer Fallgruppe (G=0,988) verglichen mit der Kontrollgruppe (G=0,910). Weiterhin zeigte sich im Genotypentest unter Annahme einer Dominanz des C-Allels ein statistisch signifikanter p-Wert von 0,0428 und eine OR von 6,72, KI 95%=0,827;54,66.

Das C-Allel, kodierend für Prolin, könnte demnach ein protektiver Faktor bei der Genese von MMD sein bzw. umgekehrt das G-Allel, kodierend für Arginin, ein Risikofaktor.

Die anderen drei SNPs (rs1800469, rs1800470, rs1800472) im genetischen Bereich von TGF- β 1 wiesen keine statistisch signifikante Assoziation mit MMD auf. Der SNP rs1800470, bei welchem abhängig von der Mutation Leucin (CTG) oder Prolin (CCG) transkribiert wird, zeigte jedoch eine starke Tendenz für die Überrepräsentation des T-Allels in der Fallgruppe. In dieser Gruppe fand sich das T-Allel mit einer Frequenz von 0,675. In der Kontrollgruppe hingegen war das T-Allel nur mit einer Frequenz von 0,596 nachweisbar. Das T-Allel, kodierend für Leucin, könnte damit ein möglicher Risikofaktor für MMD sein.

Es stellt sich nun die Frage, welche Auswirkung diese Mutationen der SNPs rs1800471 und rs1800470 auf die Expression und Sekretion von TGF- β 1 hat und welcher Krankheitswert diesen Mutationen damit zugeschrieben werden kann.

Bereits 1998 und 2003 konnten Awad et al. und Dunning et al. nachweisen, dass ein Aminosäureaustausch durch die entsprechende Punktmutation in diesen beiden SNPs zu einer mengenmäßig veränderten TGF- β 1 Sekretion führt [504, 505]. In einer aktuellen in-vitro-Studie im Zusammenhang mit Leberfibrose konnten Mohren et al. diese Ergebnisse bestätigen [506].

Die Studie ergab eine verminderte TGF- β 1 Expression bei Vorliegen von Prolin in einer der beiden relevanten Positionen. Die höchste intrazelluläre TGF- β 1-Konzentration ergab sich bei Vorliegen der Allelkombination von Leucin in Codon 10 (rs1800470) und Arginin in Codon 25 (rs1800471) (10Leu25Arg), die niedrigste bei Vorliegen von 10Pro/25Arg.

Als Ursache dieser veränderten Konzentrationen sehen die Autoren eine veränderte Translation auf Grund einer veränderten mRNA-Sekundärstruktur von TGF- β 1 und damit eine Beeinflussung der Expression. Sekretorisch entsprachen die Konzentrationsveränderungen den veränderten Expressionskonzentrationen, weswegen eher nicht eine Veränderung der Sekretion als Ursache der veränderten TGF- β 1 Sekretion anzusehen ist.

Da sich in unseren Untersuchungen bei MMD-Patienten vielfach häufiger die oben beschriebene Risikokonstellation 10Leu25Arg fand im Vergleich zur Kontrollgruppe, bieten diese Ergebnisse eine mögliche Erklärung für die erhöhten TGF- β 1 Konzentrationen, welche in STA und Blutserum nachgewiesen werden konnten.

Bezüglich des Krankheitswertes dieser Mutationen lässt sich jedoch weiterhin keine klare Aussage machen.

Hojo et al. konnten z.B. trotz ihrer Theorie, dass TGF- β 1 vermutlich bei MMD, jedoch nicht bei Arteriosklerose eine wichtige Rolle in Bezug auf die Neovaskularisation zukomme, keine Korrelation zwischen Expression oder Serumlevel von TGF- β 1 und dem Ausmaß der Neoangiogenese feststellen. Hieraus schlossen sie, dass TGF- β 1 nicht notwendigerweise ein kausaler Faktor von MMD ist [56].

Weiterhin muss bedacht werden, dass TGF- β 1 auch von anderen Zytokinen induziert werden kann, was bedeutet, dass eine veränderte Expression von TGF- β 1 auch durch eine veränderte Expression im Rahmen dieser vorgeschalteten Zytokine verursacht werden könnte. So konnten z.B. Akasaka et al. [166] eine Induktion der TGF- β 1 Expression durch bFGF nachweisen und Yue et al. eine erhöhte Sekretion von TGF- β 1 von Ratten-SMCs durch IL-1 [507].

Andererseits ist allgemein akzeptiert, dass die Plasmakonzentrationen von TGF- β 1 mit der Genese verschiedener Krankheiten assoziiert sind, wie z.B. Leberfibrose, Lungenfibrose, Myokardinfarkt oder atopische Dermatitis. Zudem ist anerkannt, dass die Produktion von TGF- β 1 vorwiegend unter genetischer Kontrolle steht und signifikant assoziiert ist mit Genpolymorphismen [465]. Allerdings gibt es im Zusammenhang mit MMD diesbezüglich bislang keine eindeutig beweisenden Untersuchungen.

Um daher eine mögliche Beteiligung von TGF- β 1 und speziell dieser Mutationen an der Genese von MMD zu klären, sind somit weitere genetische und funktionale Studien mit größeren Kohorten und unter Einbezug verschiedener Ethnizitäten nötig.

Resümierend ließ sich im Rahmen dieser Studie bei zwei der untersuchten SNPs eine Korrelation zwischen dem jeweils untersuchten Polymorphismus und dem Vorliegen von MMD nachweisen. Bei Interpretation der Ergebnisse muss jedoch allgemein bedacht werden, dass die Fallzahl bei genetischen Assoziationsstudien möglichst groß sein sollte, um eine hinreichende statistische Aussagekraft zu gewährleisten. Zu kleine Kollektive erhöhen die Gefahr für falsch positive Ergebnisse und führten oft zu einer fehlenden Reproduzierbarkeit in größeren Studien.

Auf Grund der geringen Fallzahl der Studie sowohl durch die Seltenheit von MMD im europäischen Raum als auch durch die daraus resultierende Unwissenheit über die Erkrankung und damit häufig fehlende Diagnosestellung, sind daher falsch positive oder negative Ergebnisse nicht ausschließbar. Allerdings beinhaltet diese Studie, nach unserem Wissen, dennoch die bisher größte Anzahl an MMD-Patienten mit europäischer Herkunft.

Weiterhin muss bei Interpretation der Ergebnisse bedacht werden, dass eventuelle Störgrößen wie stattgehabte Infektionen oder andere Gen-Umwelt-Interaktionen nicht berücksichtigt werden konnten. Bei der Interpretation der Ergebnisse wurde von einer annähernden Gleichverteilung dieser Parameter ausgegangen. Trotzdem muss bei kritischer Beurteilung berücksichtigt werden, dass die Assoziation der Polymorphismen mit einer anderen unbekanntem Variablen, die für den beobachteten Effekt verantwortlich ist („linkage disequilibrium“), nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann.

Weiterführende Studien sind demnach notwendig um einerseits diese Ergebnisse mit größeren Fallzahlen zu bestätigen und andererseits die Folgen der nachgewiesenen Polymorphismen auf die Expression und Funktion der jeweiligen Zytokine und damit deren Rolle bei der Ätiopathogenese von MMD zu untersuchen. Zudem könnte die Untersuchung weiterer SNPs im Bereich relevant erscheinender Zytokine noch zusätzliche Polymorphismen offenbaren und damit Hinweise auf mögliche Verbindungen zu MMD geben.

Patienten mit der Erkrankung MMD haben häufig, zu den direkt durch die Krankheit verursachten körperlichen und seelischen Einschränkungen, Schwierigkeiten, auf Grund der Seltenheit der Erkrankung, passende Anlaufstellen und

somit einen gewissen sozialen Rückhalt zu finden. Als Anlaufstellen sind sowohl Ärzte mit entsprechenden theoretischen und praktischen Fachkenntnissen als auch andere Betroffene anzusehen. Es ist daher trotz oder eben gerade wegen der Seltenheit der Erkrankung wichtig die Forschung in diesem Gebiet weiter voranzutreiben, um somit einerseits eine Kooperation verschiedener Studiengruppen zu ermöglichen und andererseits den verhältnismäßig wenigen Betroffenen dennoch die bestmögliche Unterstützung, Behandlung und Prognose gewährleisten zu können.

E Zusammenfassung

Die Moyamoya-Krankheit ist eine zerebrovaskuläre Krankheit, die charakterisiert ist durch eine progressive Stenosierung der hirnzuführenden Gefäße bis hin zur Okklusion und einer hierdurch bedingten Hypoperfusion des Gehirns. Diese Minderversorgung kann auch nicht durch die ebenfalls für Moyamoya typischen multiplen Kollateralgefäße kompensiert werden. Es resultiert die entsprechende Krankheitssymptomatik mit transitorisch ischämischen Attacken, Schlaganfällen, Krampfleiden, Hirnblutungen und vielen anderen mehr bis hin zum Tod. Bislang existiert keine kurative Therapie, unter anderem da Ätiologie und Pathogenese von Moyamoya noch weitgehend ungeklärt sind.

Bezüglich der Ätiologie scheint eine genetische Ursache wahrscheinlich und an der Pathogenese scheint eine (Mit-)Beteiligung von diversen Zytokinen wahrscheinlich, welche bei Moyamoya-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen als verändert exprimiert nachgewiesen wurden.

Ziel dieser Studie war es, Polymorphismen im genetischen Bereich verändert exprimierter Zytokine bzw. deren Rezeptoren bei Moyamoya-Patienten aufzudecken und somit Hinweise auf eine mögliche Korrelation zwischen diesen genetischen Variationen und der Ätiopathogenese von Moyamoya zu erhalten.

In unserer Studie untersuchten wir dreizehn Einzelnukleotid-Polymorphismen, sogenannte „Single Nucleotide Polymorphisms“, auf Differenzen zwischen einer Fallgruppe mit Moyamoya-Patienten und einer gesunden Kontrollgruppe durch Sequenzierung entsprechender Genregionen. Die hierfür benötigte DNS extrahierten wir aus Blutproben von 41 betroffenen Patienten und 68 gesunden Kontrollpersonen aus dem europäischen Raum, schwerpunktmäßig Zentral-europa. Die untersuchten Einzelnukleotid-Polymorphismen liegen in den genetischen Regionen von bFGF, CRABP-I, PDGFRB und TGF- β 1, welche von uns auf Grund ausführlicher Literaturrecherchen als mögliche relevante Faktoren bei der Ätiopathogenese von Moyamoya eingestuft wurden.

Als Ergebnis wiesen zwei SNPs positive Ergebnisse auf bzgl. einer Korrelation zwischen Polymorphismus und Vorhandensein von Moyamoya. Der erste SNP liegt im genetischen Bereich des PDGFRB (rs3828610), der zweite im gene-

tischen Bereich von TGF- β 1 (rs1800471). Zudem wies ein weiterer Einzelnukleotid-Polymorphismus im genetischen Bereich von TGF- β 1 (rs1800470) eine starke Tendenz für ein Risikoallel auf.

Die anderen Einzelnukleotid-Polymorphismen ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

rs3828610 liegt in der Promotorregion des PDGFRB. In unserer Studie zeigten sich für diesen Einzelnukleotid-Polymorphismus signifikante Unterschiede zwischen der Patienten- und der Kontrollgruppe mit einem p-Wert von 0,0373 und einer Odds Ratio von 1,81, 95% Konfidenzintervall = 1,03;3,17 für den Alleltest. Der Rezeptor ist auf Zellen von Moyamoya-Patienten vermindert nachweisbar [447]. Er vermittelt durch Bindung der entsprechenden PDGF-Isoformen vielfältige Funktionen u.a. im Bereich Angiogenese und Intimahyperplasie bzw. Neointimabildung und ist somit involviert in pathogenetisch relevante Prozesse bei Moyamoya. Eine mögliche Beteiligung von PDGF bei der Genese von Moyamoya ist eine gestörte Gefäßwandheilung durch veränderte Expression des PDGFRB, auch bezeichnet als „Moyamoya-Genese-Hypothese“. Die veränderte Expression wäre denkbar durch eine im Rahmen der Punktmutation veränderte Transkriptionsrate des Gens.

rs1800471 liegt in Exon 1 (Codon 10) des TGF- β 1-Gens und verursacht eine Punktmutation mit Aminosäureaustausch von Arginin (CGG) zu Prolin (CCG). In unserer Studie zeigte sich eine statistisch signifikante Assoziation mit Moyamoya mit einem p-Wert von 0,0345 und einer Odds Ratio 7,65, 95% Konfidenzintervall = 0,97;59,95 für den Alleltest. Bei Moyamoya-Patienten findet sich nach Hojo et al. eine signifikant erhöhte Konzentration von TGF- β 1 im Serum und eine signifikant erhöhte Expression von TGF- β 1 mRNA in kultivierten glatten Muskelzellen aus der Arteria temporalis superficialis [56]. TGF- β 1 beeinflusst vielfältige Mechanismen u.a. im Bereich Angiogenese, Erhaltung der Gefäßwandhomöostase und Neointimabildung. Die Punktmutation von TGF- β 1 im Bereich dieses Einzelnukleotid-Polymorphismus verursacht nach Untersuchungen von Mohren et al. eine veränderte Expression, wodurch die veränderte

Expression bei Moyamoya und damit eine Dysregulation der durch TGF- β 1 beeinflussten Mechanismen verursacht werden könnte [506].

rs1800470 liegt in Exon 1 (Codon 25) des TGF- β 1-Gens und verursacht eine Punktmutation mit Aminosäureaustausch von Leucin (CTG) zu Prolin (CCG). In unseren Untersuchungen zeigte sich trotz fehlender Signifikanz eine starke Tendenz für die Überrepräsentation des T-Allels in der Fallgruppe mit einer Frequenz von 0,675 versus einer Frequenz von 0,596 in der Kontrollgruppe. Das T-Allel, kodierend für Leucin, könnte damit ein möglicher Risikofaktor für Moyamoya sein und nach demselben Mechanismus wie der SNP rs1800471 bei der Pathogenese von Moyamoya involviert sein.

Im Rahmen unserer Studie fanden wir zusammenfassend zwei SNPs im genetischen Bereich von PDGFRB und TGF- β 1, welche eine klare Korrelation mit Moyamoya aufwiesen. Sie könnten somit hinweisend sein für eine genetische Beteiligung dieser Faktoren an der Ätiopathogenese von Moyamoya.

Um zukünftig eine vollständige Aufklärung der Ätiopathogenese von Moyamoya und damit eine kurative Therapie mit besserer Prognose der Patienten zu ermöglichen, werden weitere Studien mit größeren Kohorten zur Bestätigung unserer Ergebnisse und genaueren Untersuchung der hierdurch veränderten Mechanismen benötigt.

Anhang**Abkürzungsverzeichnis**

µm	Mikrometer
A	Adenin
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ACA	Anterior Cerebral Artery, dt.: Arteria cerebri anterior
ACI	Arteria carotis interna
aFGF	Acidic Fibroblast Growth Factor
Arg	Arginin
atRA	all-trans-Retinsäure
Bp	Basenpaar
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
BMP	Bone Morphogenetic Proteins
C	Cytosin
CRABP-I	Cellular Retinoic Acid Binding Protein I
CRBP	Cellular Retinol Binding Protein
CSF	Cerebrospinal fluid, dt.: Liquor cerebrospinalis
CT	Computer Tomographie
CTA	Computertomographische Angiographie
dNTP	Deoxynukleosidtriphosphat
ddNTP	Dideoxynukleosidtriphosphat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dt.	Deutsch
DVR	Decapentaplegic and Vegetal-1-Related group
ECA	External Carotid Artery, dt.: Arteria carotis externa
EZM	Extrazellulärmatrix
EDAS	Enzephaloduroarteriosynangiose

EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
EMAS	Enzephalomyoarteriosynangiose
EMS	Enzephalomyosynangiose
engl.	Englisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	Et alii/aliae = "und andere"
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
G	Guanin
GDNF	Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor
griech.	Griechisch
HWG	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht
ICA	Internal Carotid Artery, dt.: Arteria carotis interna
kDa	Kilodalton
KI	Konfidenzintervall
LAP	Latency Associated Peptide, dt.: Latenz-assoziiertes Peptid
Leu	Leucin
LLC	Large Latent Complex, dt.: großer latenter Komplex
LTBP	Latent TGF- β Binding Protein, dt.: latentes TGF- β bindendes Protein
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MCA	Middle Cerebral Artery, dt.: Arteria cerebri media
MMD	Moyamoya Disease (kurz: Moyamoya), dt.: Moyamoya- Krankheit
MRA	Magnet-Resonanz-Angiographie
MRI/MRT	Magnetic Resonance Imaging/ Magnet-Resonanz- Tomographie
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid, dt.: Boten-Ribonukleinsäure
NF1	Neurofibromatose Typ 1
OA	Ophthalmic Artery, dt.: Arteria ophthalmica
OR	Odds Ratio
PCA	Posterior Cerebral Artery, dt.: Arteria cerebri posterior
PCR	Polymerase Chain Reaction, dt.: Polymerase-Ketten-

	Reaktion
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDGFRB	Platelet Derived Growth Factor Rezeptor Beta
PNS	Peripheres Nervensystem
Pro	Prolin
RA	Retinoic Acid, dt.: Retinsäure
RAR	Retinoic Acid Receptor
RARE	Retinoic Acid Response Element
rs	RefSNP, Referenz-SNP
RXR	Retinoid X Receptor
SLC	Small Latent Complex, dt.: kleiner latenter Komplex
Smad	Small Mothers Against Decapentaplegic
SMC	Smooth Muscle Cell, dt.: glatte Muskelzelle
SNP	Single Nucleotide Polymorphism, dt.: Einzelbasenmutation
STA	Superficial Temporal Artery, dt.: Arteria temporalis superficialis
T	Thymin
Tab.	Tabelle
-ter	Terminale Region
TGF- β	Transforming Growth Factor Beta
TIA	Transiente Ischämische Attacke
TIEG	Transforming Growth Factor Beta Inducible Early Growth Response
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
VA	Vertebral Artery, dt.: A. temporalis
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vSMC	Vascular Smooth Muscle Cell, dt.: glatte Gefäßmuskelzelle
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Angiographische Darstellung der linken Arteria carotis interna (ACI) bei einem Patienten mit MMD-Krankheit. Quelle: modifiziert nach [7]
- Abb. 2: Anzahl von MMD-Fällen im zeitlichen Verlauf in Japan. Quelle: [16]
- Abb. 3: Altersverteilung bei Krankheitsausbruch von MMD in Japan (2003-2007). Quelle: modifiziert nach [21]
- Abb. 4: Autopsie-Präparat des Circulus Wilisii von einem Patienten mit MMD. Quelle: [2]
- Abb. 5: Schnittpräparat eines MMD-Gefäßes (Elastica-van-Gieson-Färbung). Quelle: [49]
- Abb. 6: Elektronenmikroskopische Darstellung eines MMD-Gefäßes. Quelle: Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Akio Koizumi M.D., Ph.D., Department of Health and Environmental Sciences, Kyoto University Graduate School of Medicine, Japan.
- Abb. 7: Algorithmus für die Diagnosestellung von MMD. Quelle: [77]
- Abb. 8: MMD-Stadien nach Suzuki und Takaku. Quelle: [6]
- Abb. 9: Darstellung einer STA-MCA-Anastomose. Quelle: [5]
- Abb. 10: Operationsmethode Enzephalomyosynangiose (EMS). Quelle: [5]
- Abb. 11: Dreidimensionale Struktur von bFGF. Quelle: [4]
- Abb. 12: Möglicher Wirkmechanismus von CRABP-I bei MMD. Quelle: [1]
- Abb. 13: Bindungsfähigkeit der PDGF-Isoformen an die PDGF-Rezeptoren. Quelle: modifiziert nach [3]
- Abb. 14: Die vier Wundheilungsphasen. Quelle: [292]
- Abb. 15: Verwandtschaften der TGF- β -Superfamilie. Quelle: [343]
- Abb. 16: TGF- β 1 Synthese und Sekretion. Quelle: [384]
- Abb. 17: Durch TGF- β 1 beeinflusste pathologische Prozesse. Quelle: [396]
- Abb. 18: Altersverteilung bei Studienbeginn in der Fallgruppe
- Abb. 19: Altersverteilung bei klinischer Erstmanifestation in der Fallgruppe
- Abb. 20: Geschlechtsverteilung in der Fallgruppe
- Abb. 21: Symptomatik bei Erstmanifestation in der Fallgruppe
- Abb. 22: Betroffene Gefäße in der Fallgruppe in Prozent

Abb. 23: Gesamtanzahl der betroffenen Gefäße pro Patient in der Fallgruppe

Abb. 24: Altersverteilung bei Studienbeginn in der Kontrollgruppe

Abb. 25: Geschlechtsverteilung in der Kontrollgruppe

Abb. 26: MMD-Genese-Hypothese

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Häufigkeit verschiedener Symptome bei MMD. Quelle: [71]

Tab. 2: MMD-Stadien nach Suzuki und Takaku. Quelle: [6]

Tab. 3: Synthese- und Expressionsorte der PDGF-Ketten. Quelle: s. Tabelle

Tab. 4: Zelluläre Expression von PDGF-Rezeptoren. Quelle: s. Tabelle

Tab. 5: Die vier Wundheilungsphasen. Quelle: [292]

Tab. 6: Herkunftsländer der MMD-Patienten

Tab. 7: Verwendete Primersequenzen und Hybridisierungstemperaturen

Tab. 8: PCR-Protokoll

Tab. 9: Sequenzierungsprotokoll

Tab. 10: Untersuchte SNPs dieser Studie

Tab. 11: Darstellung der Untersuchungsergebnisse unserer Studie

Literaturverzeichnis

1. Kim, S.K., et al., *Elevation of CRABP-I in the cerebrospinal fluid of patients with Moyamoya disease*. *Stroke*, 2003. 34(12): p. 2835-41.
2. Scott, R.M. and E.R. Smith, *Moyamoya Disease and Moyamoya Syndrome*. *N Engl J Med*, 2009. 360(12): p. 1226-1237.
3. Heldin, C.H. and B. Westermark, *Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor*. *Physiol Rev*, 1999. 79(4): p. 1283-316.
4. Ornitz, D.M. and N. Itoh, *Fibroblast growth factors*. *Genome Biol*, 2001. 2(3): p. reviews3005.1–3005.12.
5. Baaj, A.A., et al., *Surgical management of moyamoya disease: a review*. *Neurosurg Focus*, 2009. 26(4): p. E7.
6. Suzuki, J. and N. Kodama, *Moyamoya disease--a review*. *Stroke*, 1983. 14(1): p. 104-9.
7. Bacigaluppi, S., et al., *The contribution of imaging in diagnosis, preoperative assessment, and follow-up of moyamoya disease: a review*. *Neurosurg Focus*, 2009. 26(4): p. E3.
8. Takeuchi, K. and K. Shimizu, *Hypoplasia of the bilateral internal carotid arteries*. *Brain Nerve*, 1957. 9: p. 37-43.
9. Krayenbuehl, H.A. and M.G. Yasargil, *Die zerebrale Angiographie: Lehrbuch für Klinik und Praxis*. Stuttgart: Thieme, 1965.
10. Suzuki, J. and A. Takaku, *Cerebrovascular'' moyamoya'' disease. Disease showing abnormal net-like vessels in base of brain*. *Arch Neurol*, 1969. 20(3): p. 288-99.
11. Cassius, *The history of neurosurgical procedures for MMD*. *Neurosurg focus*, 2006. 20(6): p. 1-5.
12. Fukui, M., *Guidelines for the diagnosis and treatment of spontaneous occlusion of the circle of Willis ('moyamoya' disease)*. *Research Committee on Spontaneous Occlusion of the Circle of Willis (Moyamoya Disease) of the Ministry of Health and Welfare, Japan*. *Clin Neurol Neurosurg*, 1997. 99 Suppl 2: p. S238-40.
13. Chiu, D., et al., *Clinical features of moyamoya disease in the United States*. *Stroke*, 1998. 29(7): p. 1347-51.
14. Kraemer, M., W. Heienbrok, and P. Berlit, *Moyamoya disease in Europeans*. *Stroke*, 2008. 39(12): p. 3193-200.
15. Yonekawa, Y., et al., *Moyamoya disease in Europe, past and present status*. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 1997. 99(Supplement 2): p. S58-S60.
16. Kuriyama, S., et al., *Prevalence and Clinicoepidemiological Features of Moyamoya Disease in Japan: Findings From a Nationwide Epidemiological Survey*. *Stroke*, 2008. 39(1): p. 42-47.
17. Iwama, T. and S. Yoshimura, *Present status of Moyamoya disease in Japan*. *Acta Neurochir Suppl*, 2008. 103: p. 115-8.
18. Wakai, K., et al., *Epidemiology of spontaneous occlusion of the circle of Willis: results of national epidemiologic survey*. In: *The Research Committee on Spontaneous Occlusion of the Circle of Willis (Moyamoya Disease) of the Ministry of Health and Welfare Japan: Annual Report 1995*. Tokyo, Japan: Ministry of Health and Welfare Japan, 1995: p. 33-37.

19. Baba, T., K. Houkin, and S. Kuroda, *Novel epidemiological features of moyamoya disease*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2008. 79(8): p. 900-4.
20. Uchino, K., et al., *Moyamoya disease in Washington State and California*. *Neurology*, 2005. 65(6): p. 956-8.
21. Oki, K., H. Hoshino, and N. Suzuki, eds. *Database count of the Research Committee on Spontaneous Occlusion of the Circle of Willis (moyamoya disease)*. 2008, In: Hashimoto N (ed), *A summarized report of 2005-2007 of the Research Committee on Spontaneous Occlusion of the Circle of Willis (Moyamoya Disease)*. The Research Committee on Spontaneous Occlusion of the Circle of Willis (Moyamoya Disease) Kyoto, Japan. 15-20.
22. Yamauchi, T., et al., *Familial occurrence of moyamoya disease*. *Clin Neurol Neurosurg*, 1997. 99 Suppl 2: p. S162-7.
23. Kitahara, T., et al., *Familial occurrence of moya-moya disease: report of three Japanese families*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1979. 42(3): p. 208-14.
24. Houkin, K., et al., *Familial occurrence of moyamoya disease. Magnetic resonance angiography as a screening test for high-risk subjects*. *Childs Nerv Syst*, 1994. 10(7): p. 421-5.
25. Kuroda, S. and K. Houkin, *Moyamoya disease: current concepts and future perspectives*. *Lancet Neurol*, 2008. 7(11): p. 1056-66.
26. Nanba, R., et al., *Clinical features of familial moyamoya disease*. *Childs Nerv Syst*, 2006. 22(3): p. 258-62.
27. Goto, Y. and Y. Yonekawa, *Worldwide distribution of moyamoya disease*. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 1992. 32(12): p. 883-6.
28. Koc, F., D. Yerdelen, and Z. Koc, *Neurofibromatosis type 1 association with moyamoya disease*. *Int J Neurosci*, 2008. 118(8): p. 1157-63.
29. Fukuyama, Y., M. Osawa, and N. Kanai, *Moyamoya disease (syndrome) and the Down syndrome*. *Brain Dev*, 1992. 14(4): p. 254-6.
30. Barrall, J.L. and C.G. Summers, *Ocular ischemic syndrome in a child with moyamoya disease and neurofibromatosis*. *Surv Ophthalmol*, 1996. 40(6): p. 500-4.
31. Ikeda, H., et al., *Mapping of a Familial Moyamoya Disease Gene to Chromosome 3p24. 2-p26*. *The American Journal of Human Genetics*, 1999. 64(2): p. 533-537.
32. Nanba, R., et al., *Sequence analysis and bioinformatics analysis of chromosome 17q25 in familial moyamoya disease*. *Child's Nervous System*, 2005. 21(1): p. 62-68.
33. Inoue, T.K., et al., *Linkage Analysis of Moyamoya Disease on Chromosome 6*. *J Child Neurol*, 2000. 15(3): p. 179-182.
34. Sakurai, K., et al., *A novel susceptibility locus for moyamoya disease on chromosome 8q23*. *J Hum Genet*, 2004. 49(5): p. 278-81.
35. Han, H., et al., *Associations of Moyamoya patients with HLA class I and class II alleles in the Korean population*. *J Korean Med Sci*, 2003. 18(6): p. 876-80.
36. Aoyagi, M., et al., *Human leukocyte antigen in patients with moyamoya disease*. *Stroke*, 1995. 26(3): p. 415-7.
37. Yamauchi, T., et al., *Linkage of familial moyamoya disease (spontaneous occlusion of the circle of Willis) to chromosome 17q25*. *Stroke*, 2000. 31(4): p. 930-5.

38. Kang, H.S., et al., *Single nucleotide polymorphisms of tissue inhibitor of metalloproteinase genes in familial moyamoya disease*. *Neurosurgery*, 2006. 58(6): p. 1074-80; discussion 1074-80.
39. Mineharu, Y., et al., *Autosomal dominant moyamoya disease maps to chromosome 17q25.3*. *Neurology*, 2008. 70(24_Part_2): p. 2357-2363.
40. Guo, D.C., et al., *Mutations in smooth muscle alpha-actin (ACTA2) lead to thoracic aortic aneurysms and dissections*. *Nat Genet*, 2007. 39(12): p. 1488-93.
41. Guo, D.C., et al., *Mutations in smooth muscle alpha-actin (ACTA2) cause coronary artery disease, stroke, and Moyamoya disease, along with thoracic aortic disease*. *Am J Hum Genet*, 2009. 84(5): p. 617-27.
42. Tanghetti, B., et al., *Moyamoya syndrome in only one of two identical twins. Case report*. *J Neurosurg*, 1983. 59(6): p. 1092-4.
43. Yamada, H., et al., *The relationship between moyamoya disease and bacterial infection*. *Clin Neurol Neurosurg*, 1997. 99 Suppl 2: p. S221-4.
44. Tanigawara, T., et al., *Studies on cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infection in moyamoya disease*. *Clin Neurol Neurosurg*, 1997. 99 Suppl 2: p. S225-8.
45. Ullrich, N.J., et al., *Moyamoya following cranial irradiation for primary brain tumors in children*. *Neurology*, 2007. 68(12): p. 932-938.
46. Fukui, *Guidelines for the diagnosis and treatment of spontaneous occlusion of the circle of Willis ('Moyamoya' disease)*. 1997.
47. Hosoda, Y., *Pathology of so-called "spontaneous occlusion of the circle of Willis"*. *Pathol Annu*, 1984. 19 Pt 2: p. 221-44.
48. Yamashita, M., K. Oka, and K. Tanaka, *Histopathology of the brain vascular network in moyamoya disease*. *Stroke*, 1983. 14(1): p. 50-8.
49. Ikezaki, K., ed. *Moyamoya Disease, Page 57*. 2001, Thieme international.
50. Achrol, A.S., et al., *Pathophysiology and genetic factors in moyamoya disease*. *Neurosurg Focus*, 2009. 26(4): p. E4.
51. Takagi, Y., et al., *Caspase-3-dependent apoptosis in middle cerebral arteries in patients with moyamoya disease*. *Neurosurgery*, 2006. 59(4): p. 894-900; discussion 900-1.
52. Masuda, J., J. Ogata, and C. Yutani, *Smooth muscle cell proliferation and localization of macrophages and T cells in the occlusive intracranial major arteries in moyamoya disease*. *Stroke*, 1993. 24(12): p. 1960-7.
53. Takagi, Y., et al., *Histological features of middle cerebral arteries from patients treated for Moyamoya disease*. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 2007. 47(1): p. 1-4.
54. Yamamoto, M., et al., *Increase in prostaglandin E(2) production by interleukin-1beta in arterial smooth muscle cells derived from patients with moyamoya disease*. *Circ Res*, 1999. 85(10): p. 912-8.
55. Takebayashi, S., K. Matsuo, and M. Kaneko, *Ultrastructural studies of cerebral arteries and collateral vessels in moyamoya disease*. *Stroke*, 1984. 15(4): p. 728-32.
56. Hojo, M., et al., *Role of transforming growth factor-beta1 in the pathogenesis of moyamoya disease*. *J Neurosurg*, 1998. 89(4): p. 623-9.

57. Lim, M., S. Cheshier, and G.K. Steinberg, *New vessel formation in the central nervous system during tumor growth, vascular malformations, and Moyamoya*. *Curr Neurovasc Res*, 2006. 3(3): p. 237-45.
58. Kono, S., K. Oka, and K. Sueishi, *Histopathologic and morphometric studies of leptomenigeal vessels in moyamoya disease*. *Stroke*, 1990. 21(7): p. 1044-50.
59. Czabanka, *Characterization of cortical microvascularization in adult MMD*. *Stroke*, 2008. 39: p. 000-000.
60. Oka, K., et al., *Cerebral haemorrhage in Moyamoya disease at autopsy*. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*, 1981. 392(3): p. 247-61.
61. Yamashita, M., K. Oka, and K. Tanaka, *Cervico-cephalic arterial thrombi and thromboemboli in moyamoya disease--possible correlation with progressive intimal thickening in the intracranial major arteries*. *Stroke*, 1984. 15(2): p. 264-70.
62. Malek, A.M., et al., *Elevation of cerebrospinal fluid levels of basic fibroblast growth factor in moyamoya and central nervous system disorders*. *Pediatr Neurosurg*, 1997. 27(4): p. 182-9.
63. Nanba, R., et al., *Increased expression of hepatocyte growth factor in cerebrospinal fluid and intracranial artery in moyamoya disease*. *Stroke*, 2004. 35(12): p. 2837-42.
64. Takagi, Y., et al., *Expression of hypoxia-inducing factor-1 alpha and endoglin in intimal hyperplasia of the middle cerebral artery of patients with Moyamoya disease*. *Neurosurgery*, 2007. 60(2): p. 338-45; discussion 345.
65. Yoshimoto, T., et al., *Angiogenic factors in moyamoya disease*. *Stroke*, 1996. 27(12): p. 2160-5.
66. Houkin, K., et al., *Role of basic fibroblast growth factor in the pathogenesis of moyamoya disease*. *Neurosurg Focus*, 1998. 5(5): p. e2.
67. Hoshimaru, M., et al., *Possible roles of basic fibroblast growth factor in the pathogenesis of moyamoya disease: an immunohistochemical study*. *J Neurosurg*, 1991. 75(2): p. 267-70.
68. Takahashi, A., et al., *The cerebrospinal fluid in patients with moyamoya disease (spontaneous occlusion of the circle of Willis) contains high level of basic fibroblast growth factor*. *Neurosci Lett*, 1993. 160(2): p. 214-6.
69. Soriano, S.G., et al., *Levels of soluble adhesion molecules are elevated in the cerebrospinal fluid of children with moyamoya syndrome*. *Neurosurgery*, 2002. 50(3): p. 544-9.
70. Smith, E.R. and R.M. Scott, *Surgical management of moyamoya syndrome*. *Skull Base*, 2005. 15(1): p. 15-26.
71. Handa, H., et al., *Analysis of the filling data bank of 1500 cases of spontaneous occlusion of the circle of Willis and follow-up study of 200 cases for more than 5 years*. In: Handa H (ed.). *Annual Report (1984) of Research Comitee on Spontaneous Occlusion of Circle of Willis (Moyamoya Disease)*. Tokyo: Ministry of Health and Welfare, Japan, 1985: p. 14-22.
72. Scott, R.M., et al., *Long-term outcome in children with moyamoya syndrome after cranial revascularization by pial synangiosis*. *J Neurosurg*, 2004. 100(2 Suppl Pediatrics): p. 142-9.
73. Grabel, J.C., et al., *Moyamoya-like disease associated with a lenticulostriate region aneurysm. Case report*. *J Neurosurg*, 1989. 70(5): p. 802-3.

74. Iwama, T., T. Todaka, and N. Hashimoto, *Direct surgery for major artery aneurysm associated with moyamoya disease*. Clin Neurol Neurosurg, 1997. 99 Suppl 2: p. S191-3.
75. Kawaguchi, S., et al., *Characteristics of intracranial aneurysms associated with moyamoya disease. A review of 111 cases*. Acta Neurochir (Wien), 1996. 138(11): p. 1287-94.
76. Ikezaki, K., *Moyamoya Disease, Page 25*. 2001: Thieme International.
77. Ikezaki, K., *Moyamoya Disease, Page 21*. 2001: Thieme International.
78. Fushimi, Y., et al., *Comparison of 3.0- and 1.5-T three-dimensional time-of-flight MR angiography in moyamoya disease: preliminary experience*. Radiology, 2006. 239(1): p. 232-7.
79. Yamada, I., et al., *High-resolution turbo magnetic resonance angiography for diagnosis of Moyamoya disease*. Stroke, 2001. 32(8): p. 1825-31.
80. Katz, D.A., et al., *Circle of Willis: evaluation with spiral CT angiography, MR angiography, and conventional angiography*. Radiology, 1995. 195(2): p. 445-9.
81. Saeki, N., et al., *Comparative performance of magnetic resonance angiography and conventional angiography in moyamoya disease*. J Clin Neurosci, 2000. 7(2): p. 112-5.
82. Yamada, I., S. Suzuki, and Y. Matsushima, *Moyamoya disease: comparison of assessment with MR angiography and MR imaging versus conventional angiography*. Radiology, 1995. 196(1): p. 211-8.
83. Chang, K.H., et al., *MR imaging findings of moyamoya disease*. J Korean Med Sci, 1990. 5(2): p. 85-90.
84. Takanashi, J.I., K. Sugita, and H. Niimi, *Evaluation of magnetic resonance angiography with selective maximum intensity projection in patients with childhood moyamoya disease*. Eur J Paediatr Neurol, 1998. 2(2): p. 83-9.
85. Yamada, I., Y. Matsushima, and S. Suzuki, *Childhood moyamoya disease before and after encephalo-duro-arterio-synangiosis: an angiographic study*. Neuroradiology, 1992. 34(4): p. 318-22.
86. Yamada, I., Y. Matsushima, and S. Suzuki, *Moyamoya disease: diagnosis with three-dimensional time-of-flight MR angiography*. Radiology, 1992. 184(3): p. 773-8.
87. Yamada, I., S. Suzuki, and Y. Matsushima, *Moyamoya disease: diagnostic accuracy of MRI*. Neuroradiology, 1995. 37(5): p. 356-61.
88. Krings, T. and F. Hans, *New developments in MRA: time-resolved MRA*. Neuroradiology, 2004. 46 Suppl 2: p. s214-22.
89. Hans, F.J., et al., *Clinical applications of 2-D dynamic contrast-enhanced MR subtraction angiography in neurosurgery -- preliminary results*. Zentralbl Neurochir, 2005. 66(4): p. 170-9.
90. Aoki, S., et al., *Two-dimensional thick-slice MR digital subtraction angiography for assessment of cerebrovascular occlusive diseases*. Eur Radiol, 2000. 10(12): p. 1858-64.
91. Murai, Y., et al., *Three-dimensional computerized tomography angiography in patients with hyperacute intracerebral hemorrhage*. J Neurosurg, 1999. 91(3): p. 424-31.

92. Takeuchi, S., et al., *Cerebral hemodynamics in patients with moyamoya disease. A study of regional cerebral blood flow by the ¹³³Xe inhalation method.* Surg Neurol, 1985. 23(5): p. 468-74.
93. Takase, K., M. Kashihara, and T. Hashimoto, *Transcranial Doppler ultrasonography in patients with moyamoya disease.* Clin Neurol Neurosurg, 1997. 99 Suppl 2: p. S101-5.
94. Shirane, R., et al., *Assessment of encephalo-galeo-myo-synangiosis with dural pedicle insertion in childhood moyamoya disease: characteristics of cerebral blood flow and oxygen metabolism.* Clin Neurol Neurosurg, 1997. 99 Suppl 2: p. S79-85.
95. Nakai, H., et al., *[A ruptured aneurysm at the peripheral collateral circulation of the anterior choroidal artery in a patient with moyamoya disease: a case report].* No Shinkei Geka, 1992. 20(9): p. 985-90.
96. Nambu, K., R. Suzuki, and K. Hirakawa, *Cerebral blood flow: measurement with xenon-enhanced dynamic helical CT.* Radiology, 1995. 195(1): p. 53-7.
97. Lee, Y.S., K.H. Jung, and J.K. Roh, *Diagnosis of moyamoya disease with transcranial Doppler sonography: correlation study with magnetic resonance angiography.* J Neuroimaging, 2004. 14(4): p. 319-23.
98. Liu, H.M., S.S. Peng, and Y.W. Li, *The preoperative and postoperative cerebral blood flow and vasoreactivity in childhood moyamoya disease.* Keio J Med, 2000. 49 Suppl 1: p. A86-9.
99. Kodama, N., et al., *Electroencephalographic findings in children with moyamoya disease.* Arch Neurol, 1979. 36(1): p. 16-9.
100. Ohaegbulam, C., S. Magge, and R. Scott, *Moyamoya syndrome.* In: McLone DG, editor-in-chief. Pediatric Neurosurgery. Surgery of the developing nervous system. Philadelphia, W B Saunders, 2001: p. 1077-1092.
101. Scott, R.M., *Moyamoya syndrome: a surgically treatable cause of stroke in the pediatric patient.* Clin Neurosurg, 2000. 47: p. 378-84.
102. Scott, R.M., *Surgery for moyamoya syndrome? Yes.* Arch Neurol, 2001. 58(1): p. 128-9.
103. Bowen, M.D., C.R. Burak, and T.F. Barron, *Childhood ischemic stroke in a nonurban population.* J Child Neurol, 2005. 20(3): p. 194-7.
104. Choi, J.U., et al., *Natural history of moyamoya disease: comparison of activity of daily living in surgery and non surgery groups.* Clin Neurol Neurosurg, 1997. 99 Suppl 2: p. S11-8.
105. Kurokawa, T., et al., *Cerebrovascular occlusive disease with and without the moyamoya vascular network in children.* Neuropediatrics, 1985. 16(1): p. 29-32.
106. Matsushima, T., et al., *An indirect revascularization method in the surgical treatment of moyamoya disease--various kinds of indirect procedures and a multiple combined indirect procedure.* Neurol Med Chir (Tokyo), 1998. 38: p. 297-302.
107. Kawaguchi, S., S. Okuno, and T. Sakaki, *Effect of direct arterial bypass on the prevention of future stroke in patients with the hemorrhagic variety of moyamoya disease.* Journal of Neurosurgery, 2000. 93(3): p. 397-401.
108. Houkin, K., et al., *Surgical Therapy for Adult Moyamoya Disease Can Surgical Revascularization Prevent the Recurrence of Intracerebral Hemorrhage?* Stroke, 1996. 27(8): p. 1342-1346.

109. Sencer, S., et al., *Recent experience with Moyamoya disease in Turkey*. Eur Radiol, 2000. 10(4): p. 569-72.
110. Houkin, K., S. Kuroda, and N. Nakayama, *Cerebral revascularization for moyamoya disease in children*. Neurosurg Clin N Am, 2001. 12(3): p. 575-84, ix.
111. Sato, H., et al., [*Influence of superior cervical ganglion on cerebral hemodynamics--measurements of cerebral blood flow and metabolism during superior cervical ganglionectomy in patients with moyamoya disease*]. No To Shinkei, 1990. 42(2): p. 203-8.
112. Ohtaki, M., et al., *Intellectual functions and regional cerebral haemodynamics after extensive omental transplantation spread over both frontal lobes in childhood moyamoya disease*. Acta Neurochir (Wien), 1998. 140(10): p. 1043-53; discussion 1052-3.
113. Matsushima, T., et al., *Multiple combined indirect procedure for the surgical treatment of children with moyamoya disease. A comparison with single indirect anastomosis and direct anastomosis*. Neurosurg Focus, 1998. 5(5): p. e4.
114. Matsushima, Y., *Indirect anastomoses for moyamoya disease*. No Shinkei Geka, 1998. 26(9): p. 769-86.
115. Yoshioka, N., S. Tominaga, and T. Inui, *Cerebral revascularization using omentum and serratus anterior muscle free flap transfer for adult moyamoya disease: case report*. Surg Neurol, 1996. 46(5): p. 430-5; discussion 435-6.
116. Yoshioka, N., et al., *Cerebral revascularization using omentum and muscle free flap for ischemic cerebrovascular disease*. Surg Neurol, 1998. 49(1): p. 58-65.
117. Touho, H., et al., *Omental transplantation using a superficial temporal artery previously used for encephaloduroarteriosynangiosis*. Surg Neurol, 1996. 45(6): p. 550-8; discussion 558-9.
118. Karasawa, J., et al., *Cerebral revascularization using omental transplantation for childhood moyamoya disease*. J Neurosurg, 1993. 79(2): p. 192-6.
119. Karasawa, J., et al., *Intracranial transplantation of the omentum for cerebrovascular moyamoya disease: a two-year follow-up study*. Surg Neurol, 1980. 14(6): p. 444-9.
120. Havlik, R.J., et al., *Encephalo-omental synangiosis in the management of moyamoya disease*. Surgery, 1992. 111(2): p. 156-62.
121. Suzuki, J., et al., *An attempt to treat cerebrovascular 'Moyamoya' disease in children*. Childs Brain, 1975. 1(4): p. 193-206.
122. Imaizumi, T., et al., *Long-term outcomes of pediatric moyamoya disease monitored to adulthood*. Pediatr Neurol, 1998. 18(4): p. 321-5.
123. Kuroda, S., et al., *Incidence and clinical features of disease progression in adult moyamoya disease*. Stroke, 2005. 36(10): p. 2148-53.
124. Kurokawa, T., et al., *Prognosis of occlusive disease of the circle of Willis (moyamoya disease) in children*. Pediatr Neurol, 1985. 1(5): p. 274-7.
125. Fung, L.W., D. Thompson, and V. Ganesan, *Revascularisation surgery for paediatric moyamoya: a review of the literature*. Childs Nerv Syst, 2005. 21(5): p. 358-64.
126. Ikezaki, K., *Rational approach to treatment of moyamoya disease in childhood*. J Child Neurol, 2000. 15(5): p. 350-6.

127. Veeravagu, A., et al., *Moyamoya disease in pediatric patients: outcomes of neurosurgical interventions*. *Neurosurg Focus*, 2008. 24(2): p. E16.
128. Smith, E.R. and R.M. Scott, *Progression of disease in unilateral moyamoya syndrome*. *Neurosurg Focus*, 2008. 24(2): p. E17.
129. Maki, Y. and T. Enomoto, *Moyamoya disease*. *Childs Nerv Syst*, 1988. 4(4): p. 204-12.
130. Welsch, U., ed. *Sobotta Lehrbuch Histologie*. 2. Auflage ed. 2006, Urban & Fischer, Elsevier.
131. Nathan, C. and M. Sporn, *Cytokines in context*. *J Cell Biol*, 1991. 113(5): p. 981-6.
132. Holländer, G.A., ed. *Immunologie: Grundlagen für Klinik und Praxis 1*. Auflage ed. 2005, Elsevier, München 304.
133. Armelin, H.A., *Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1973. 70(9): p. 2702-6.
134. Gospodarowicz, D., et al., *Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor*. *Endocr Rev*, 1987. 8(2): p. 95-114.
135. Mergia, A., et al., *The genes for basic and acidic fibroblast growth factors are on different human chromosomes*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1986. 138(2): p. 644-51.
136. Sommer, A., et al., *A form of human basic fibroblast growth factor with an extended amino terminus*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1987. 144(2): p. 543-50.
137. Mignatti, P., T. Morimoto, and D.B. Rifkin, *Basic fibroblast growth factor, a protein devoid of secretory signal sequence, is released by cells via a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex*. *J Cell Physiol*, 1992. 151(1): p. 81-93.
138. Yoshida, T., et al., *Genomic sequence of hst, a transforming gene encoding a protein homologous to fibroblast growth factors and the int-2-encoded protein*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. 84(20): p. 7305-9.
139. Moscatelli, D., et al., *Both normal and tumor cells produce basic fibroblast growth factor*. *J Cell Physiol*, 1986. 129(2): p. 273-6.
140. Vlodavsky, I., et al., *Endothelial cell-derived basic fibroblast growth factor: synthesis and deposition into subendothelial extracellular matrix*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. 84(8): p. 2292-6.
141. Schweigerer, L., et al., *Capillary endothelial cells express basic fibroblast growth factor, a mitogen that promotes their own growth*. *Nature*, 1987. 325(6101): p. 257-9.
142. Schweigerer, L., et al., *Basic fibroblast growth factor is synthesized in cultured retinal pigment epithelial cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1987. 143(3): p. 934-40.
143. Hatten, M.E., et al., *In vitro neurite extension by granule neurons is dependent upon astroglial-derived fibroblast growth factor*. *Dev Biol*, 1988. 125(2): p. 280-9.
144. Schweigerer, L., et al., *Basic fibroblast growth factor: production and growth stimulation in cultured adrenal cortex cells*. *Endocrinology*, 1987. 120(2): p. 796-800.
145. Schweigerer, L., et al., *Basic fibroblast growth factor in human rhabdomyosarcoma cells: implications for the proliferation and*

- neovascularization of myoblast-derived tumors. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. 84(3): p. 842-6.*
146. Klagsbrun, M., et al., *Human tumor cells synthesize an endothelial cell growth factor that is structurally related to basic fibroblast growth factor. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. 83(8): p. 2448-52.*
 147. Folkman, J., et al., *A heparin-binding angiogenic protein--basic fibroblast growth factor--is stored within basement membrane. Am J Pathol, 1988. 130(2): p. 393-400.*
 148. Joseph-Silverstein, J., et al., *Basic fibroblast growth factor in the chick embryo: immunolocalization to striated muscle cells and their precursors. J Cell Biol, 1989. 108(6): p. 2459-66.*
 149. Hanneken, A., et al., *Localization of basic fibroblast growth factor to the developing capillaries of the bovine retina. J Cell Physiol, 1989. 138(1): p. 115-20.*
 150. Olwin, B.B. and S.D. Hauschka, *Identification of the fibroblast growth factor receptor of Swiss 3T3 cells and mouse skeletal muscle myoblasts. Biochemistry, 1986. 25(12): p. 3487-92.*
 151. Moscatelli, D., *High and low affinity binding sites for basic fibroblast growth factor on cultured cells: absence of a role for low affinity binding in the stimulation of plasminogen activator production by bovine capillary endothelial cells. J Cell Physiol, 1987. 131(1): p. 123-30.*
 152. Neufeld, G. and D. Gospodarowicz, *The identification and partial characterization of the fibroblast growth factor receptor of baby hamster kidney cells. J Biol Chem, 1985. 260(25): p. 13860-8.*
 153. Neufeld, G. and D. Gospodarowicz, *Basic and acidic fibroblast growth factors interact with the same cell surface receptors. J Biol Chem, 1986. 261(12): p. 5631-7.*
 154. Sato, Y. and D.B. Rifkin, *Autocrine activities of basic fibroblast growth factor: regulation of endothelial cell movement, plasminogen activator synthesis, and DNA synthesis. J Cell Biol, 1988. 107(3): p. 1199-205.*
 155. Klagsbrun, M., *The fibroblast growth factor family: structural and biological properties. Prog Growth Factor Res, 1989. 1(4): p. 207-35.*
 156. Gospodarowicz, D., et al., *Basic fibroblast growth factor: expression in cultured bovine vascular smooth muscle cells. Eur J Cell Biol, 1988. 46(1): p. 144-51.*
 157. Winkles, J.A. and C.G. Gay, *Serum, phorbol ester, and polypeptide mitogens increase class 1 and 2 heparin-binding (acidic and basic fibroblast) growth factor gene expression in human vascular smooth muscle cells. Cell Growth Differ, 1991. 2(11): p. 531-40.*
 158. Montesano, R., et al., *Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. 83(19): p. 7297-301.*
 159. Fox, J.C. and J.R. Shanley, *Antisense inhibition of basic fibroblast growth factor induces apoptosis in vascular smooth muscle cells. J Biol Chem, 1996. 271(21): p. 12578-84.*
 160. Takagi, *Expression of hypoxia-inducing factor 1a and endoglin in intimal hyperplasia of the middle cerebral artery of patients with moyamoya disease. Neurosurgery, 2007. 60: p. 338-345.*

161. Suzui, *Immunohistochemical reactions for fibroblast growth factor receptor in arteries of patients with moyamoya disease*. *Neurosurgery*, 1994. 35: p. 20-24.
162. Yamamoto, *Differences in cellular responses to mitogens in arterial smooth muscle cells derived from patients with moyamoya disease*. *Stroke*, 1998. 29: p. 1188-1193.
163. Yoshimoto, *Angiogenic factors in MMD*. *Stroke*, 1996. 27: p. 2160-2165.
164. Houkin, *Role of basic fibroblast growth factor in the pathogenesis of MMD*. *Neurosurg focus*, 1998. 5(5): p. article 2.
165. Pepper, M.S., et al., *Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992. 189(2): p. 824-31.
166. Akasaka, Y., et al., *Basic fibroblast growth factor promotes apoptosis and suppresses granulation tissue formation in acute incisional wounds*. *J Pathol*, 2004. 203(2): p. 710-20.
167. Dormann, S. and G. Bauer, *TGF-beta and FGF-trigger intercellular induction of apoptosis: analogous activity on non-transformed but differential activity on transformed cells*. *Int J Oncol*, 1998. 13(6): p. 1247-52.
168. Donovan, M., et al., *The cellular retinoic acid binding proteins*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1995. 53(1-6): p. 459-65.
169. Astrom, A., et al., *Retinoic acid induction of human cellular retinoic acid-binding protein-II gene transcription is mediated by retinoic acid receptor-retinoid X receptor heterodimers bound to one far upstream retinoic acid-responsive element with 5-base pair spacing*. *J Biol Chem*, 1994. 269(35): p. 22334-9.
170. Dong, D., et al., *Distinct roles for cellular retinoic acid-binding proteins I and II in regulating signaling by retinoic acid*. *J Biol Chem*, 1999. 274(34): p. 23695-8.
171. Blomhoff, R., *Vitamin A in Health and Disease* New York: Marcel, Dekker Inc., 1994.
172. Miano, J.M. and B.C. Berk, *Retinoids: versatile biological response modifiers of vascular smooth muscle phenotype*. *Circ Res*, 2000. 87(5): p. 355-62.
173. Miano, J.M., et al., *all-Trans-retinoic acid reduces neointimal formation and promotes favorable geometric remodeling of the rat carotid artery after balloon withdrawal injury*. *Circulation*, 1998. 98(12): p. 1219-27.
174. Miano, J.M., et al., *Retinoid receptor expression and all-trans retinoic acid-mediated growth inhibition in vascular smooth muscle cells*. *Circulation*, 1996. 93(10): p. 1886-95.
175. Neuville, P., et al., *Retinoic acid regulates arterial smooth muscle cell proliferation and phenotypic features in vivo and in vitro through an RARalpha-dependent signaling pathway*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. 19(6): p. 1430-6.
176. Kato, S., Y. Sasaguri, and M. Morimatsu, *Down-regulation in the production of matrix metalloproteinase 1 by human aortic intimal smooth muscle cells*. *Biochem Mol Biol Int*, 1993. 31(2): p. 239-48.
177. Chen, S. and D.G. Gardner, *Retinoic acid uses divergent mechanisms to activate or suppress mitogenesis in rat aortic smooth muscle cells*. *J Clin Invest*, 1998. 102(4): p. 653-62.

178. DeRose, J.J., Jr., et al., *Retinoic acid suppresses intimal hyperplasia and prevents vessel remodeling following arterial injury*. *Cardiovasc Surg*, 1999. 7(6): p. 633-9.
179. Boylan, J.F. and L.J. Gudas, *Overexpression of the cellular retinoic acid binding protein-I (CRABP-I) results in a reduction in differentiation-specific gene expression in F9 teratocarcinoma cells*. *J Cell Biol*, 1991. 112(5): p. 965-79.
180. Boyle, B.J., et al., *Differential regulation of a fibroblast growth factor-binding protein by receptor-selective analogs of retinoic acid*. *Biochem Pharmacol*, 2000. 60(11): p. 1677-84.
181. Boylan, J.F. and L.J. Gudas, *The level of CRABP-I expression influences the amounts and types of all-trans-retinoic acid metabolites in F9 teratocarcinoma stem cells*. *J Biol Chem*, 1992. 267(30): p. 21486-91.
182. Ross, R., et al., *A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1974. 71(4): p. 1207-10.
183. Antoniades, H.N., C.D. Scher, and C.D. Stiles, *Purification of human platelet-derived growth factor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. 76(4): p. 1809-13.
184. Antoniades, H.N., *Human platelet-derived growth factor (PDGF): purification of PDGF-I and PDGF-II and separation of their reduced subunits*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981. 78(12): p. 7314-7.
185. Li, X., et al., *PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor*. *Nat Cell Biol*, 2000. 2(5): p. 302-9.
186. Bergsten, E., et al., *PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta-receptor*. *Nat Cell Biol*, 2001. 3(5): p. 512-6.
187. LaRoche, W.J., et al., *PDGF-D, a new protease-activated growth factor*. *Nat Cell Biol*, 2001. 3(5): p. 517-21.
188. Hammacher, A., et al., *A major part of platelet-derived growth factor purified from human platelets is a heterodimer of one A and one B chain*. *J Biol Chem*, 1988. 263(31): p. 16493-8.
189. Hammacher, A., et al., *A human glioma cell line secretes three structurally and functionally different dimeric forms of platelet-derived growth factor*. *Eur J Biochem*, 1988. 176(1): p. 179-86.
190. Hart, C.E., et al., *Purification of PDGF-AB and PDGF-BB from human platelet extracts and identification of all three PDGF dimers in human platelets*. *Biochemistry*, 1990. 29(1): p. 166-72.
191. Kenney, W.C., et al., *Formation of mitogenically active PDGF-B dimer does not require interchain disulfide bonds*. *J Biol Chem*, 1994. 269(16): p. 12351-9.
192. Prestrelski, S.J., et al., *The conformational stability of a non-covalent dimer of a platelet-derived growth factor-B mutant lacking the two cysteines involved in interchain disulfide bonds*. *Int J Pept Protein Res*, 1994. 44(4): p. 357-63.
193. Andersson, M., et al., *Assignment of interchain disulfide bonds in platelet-derived growth factor (PDGF) and evidence for agonist activity of monomeric PDGF*. *J Biol Chem*, 1992. 267(16): p. 11260-6.
194. Fredriksson, L., et al., *Tissue plasminogen activator is a potent activator of PDGF-CC*. *EMBO J*, 2004. 23(19): p. 3793-802.

195. Fredriksson, L., H. Li, and U. Eriksson, *The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2004. 15(4): p. 197-204.
196. DiCorleto, P.E. and D.F. Bowen-Pope, *Cultured endothelial cells produce a platelet-derived growth factor-like protein*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1983. 80(7): p. 1919-23.
197. Raines, E.W., D.F. Bowen-Pope, and R. Ross, *Platelet-Derived Growth Factor*. Heidelberg: Springer-Verlag, 1990. 95(I): p. 173-262.
198. Nilsson, J., et al., *Arterial smooth muscle cells in primary culture produce a platelet-derived growth factor-like protein*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. 82(13): p. 4418-22.
199. Seifert, R.A., S.M. Schwartz, and D.F. Bowen-Pope, *Developmentally regulated production of platelet-derived growth factor-like molecules*. *Nature*, 1984. 311(5987): p. 669-71.
200. Shimokado, K., et al., *A significant part of macrophage-derived growth factor consists of at least two forms of PDGF*. *Cell*, 1985. 43(1): p. 277-86.
201. Kaplan, D.R., et al., *Platelet alpha granules contain a growth factor for fibroblasts*. *Blood*, 1979. 53(6): p. 1043-52.
202. Uutela, M., et al., *Chromosomal location, exon structure, and vascular expression patterns of the human PDGFC and PDGFD genes*. *Circulation*, 2001. 103(18): p. 2242-7.
203. Fang, L., et al., *PDGF C is a selective alpha platelet-derived growth factor receptor agonist that is highly expressed in platelet alpha granules and vascular smooth muscle*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. 24(4): p. 787-92.
204. Eitner, F., et al., *PDGF-C expression in the developing and normal adult human kidney and in glomerular diseases*. *J Am Soc Nephrol*, 2003. 14(5): p. 1145-53.
205. Raines, E.W., *PDGF and cardiovascular disease*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2004. 15(4): p. 237-54.
206. Chen, J., et al., *PDGF-D contributes to neointimal hyperplasia in rat model of vessel injury*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. 329(3): p. 976-83.
207. Changsirikulchai, S., et al., *Platelet-derived growth factor-D expression in developing and mature human kidneys*. *Kidney Int*, 2002. 62(6): p. 2043-54.
208. Silberstein, F.C., et al., *Cytokine-regulated expression of platelet-derived growth factor gene and protein in cultured human astrocytes*. *J Neurochem*, 1996. 66(4): p. 1409-17.
209. Eccleston, P.A., et al., *Schwann Cells Secrete a PDGF-like Factor: Evidence for an Autocrine Growth Mechanism involving PDGF*. *Eur J Neurosci*, 1990. 2(11): p. 985-992.
210. Yeh, H.J., et al., *PDGF A-chain gene is expressed by mammalian neurons during development and in maturity*. *Cell*, 1991. 64(1): p. 209-16.
211. Sasahara, M., et al., *PDGF B-chain in neurons of the central nervous system, posterior pituitary, and in a transgenic model*. *Cell*, 1991. 64(1): p. 217-27.
212. Reigstad, L.J., J.E. Varhaug, and J.R. Lillehaug, *Structural and functional specificities of PDGF-C and PDGF-D, the novel members of the platelet-derived growth factors family*. *FEBS J*, 2005. 272(22): p. 5723-41.

213. Mendoza, A.E., et al., *Increased platelet-derived growth factor A-chain expression in human uterine smooth muscle cells during the physiologic hypertrophy of pregnancy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. 87(6): p. 2177-81.
214. Mercola, M., D.A. Melton, and C.D. Stiles, *Platelet-derived growth factor A chain is maternally encoded in Xenopus embryos*. Science, 1988. 241(4870): p. 1223-5.
215. Gnessi, L., et al., *Testicular development involves the spatiotemporal control of PDGFs and PDGF receptors gene expression and action*. J Cell Biol, 1995. 131(4): p. 1105-21.
216. Campochiaro, P.A., et al., *Retinal pigment epithelial cells produce PDGF-like proteins and secrete them into their media*. Exp Eye Res, 1989. 49(2): p. 217-27.
217. Li, R., et al., *PDGF-C and -D induced proliferation/migration of human RPE is abolished by inflammatory cytokines*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007. 48(12): p. 5722-32.
218. Paulsson, Y., et al., *Possible positive autocrine feedback in the prereplicative phase of human fibroblasts*. Nature, 1987. 328(6132): p. 715-7.
219. Ansel, J.C., et al., *Human keratinocytes are a major source of cutaneous platelet-derived growth factor*. J Clin Invest, 1993. 92(2): p. 671-8.
220. Dirks, R.P. and H.P. Bloemers, *Signals controlling the expression of PDGF*. Mol Biol Rep, 1995. 22(1): p. 1-24.
221. Kourembanas, S., et al., *Mechanisms by which oxygen regulates gene expression and cell-cell interaction in the vasculature*. Kidney Int, 1997. 51(2): p. 438-43.
222. Harlan, J.M., et al., *Alpha-thrombin induces release of platelet-derived growth factor-like molecule(s) by cultured human endothelial cells*. J Cell Biol, 1986. 103(3): p. 1129-33.
223. Daniel, T.O., et al., *Thrombin stimulates c-sis gene expression in microvascular endothelial cells*. J Biol Chem, 1986. 261(21): p. 9579-82.
224. LaMarre, J., et al., *An alpha 2-macroglobulin receptor-dependent mechanism for the plasma clearance of transforming growth factor-beta 1 in mice*. J Clin Invest, 1991. 87(1): p. 39-44.
225. Fischer, W.H. and D. Schubert, *Characterization of a novel platelet-derived growth factor-associated protein*. J Neurochem, 1996. 66(5): p. 2213-6.
226. Kelly, J.L., et al., *Accumulation of PDGF B and cell-binding forms of PDGF A in the extracellular matrix*. J Cell Biol, 1993. 121(5): p. 1153-63.
227. LaRochelle, W.J., et al., *A novel mechanism regulating growth factor association with the cell surface: identification of a PDGF retention domain*. Genes Dev, 1991. 5(7): p. 1191-9.
228. Lustig, F., et al., *Alternative splicing determines the binding of platelet-derived growth factor (PDGF-AA) to glycosaminoglycans*. Biochemistry, 1996. 35(37): p. 12077-85.
229. Spritz, R.A., et al., *A YAC contig spanning a cluster of human type III receptor protein tyrosine kinase genes (PDGFRA-KIT-KDR) in chromosome segment 4q12*. Genomics, 1994. 22(2): p. 431-6.
230. Yarden, Y., et al., *Structure of the receptor for platelet-derived growth factor helps define a family of closely related growth factor receptors*. Nature, 1986. 323(6085): p. 226-32.

231. Claesson-Welsh, L., et al., *cDNA cloning and expression of the human A-type platelet-derived growth factor (PDGF) receptor establishes structural similarity to the B-type PDGF receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. 86(13): p. 4917-21.
232. Matsui, T., et al., *Isolation of a novel receptor cDNA establishes the existence of two PDGF receptor genes*. Science, 1989. 243(4892): p. 800-4.
233. Vassbotn, F.S., et al., *Negative feedback regulation of human platelets via autocrine activation of the platelet-derived growth factor alpha-receptor*. J Biol Chem, 1994. 269(19): p. 13874-9.
234. Smits, A., et al., *Rat brain capillary endothelial cells express functional PDGF B-type receptors*. Growth Factors, 1989. 2(1): p. 1-8.
235. Heldin, C.-H. and B. Westermark, *Role of Platelet-Derived Growth Factor In Vivo*. 2nd ed., 1996. New York: Plenum: p. 249-273.
236. Yang, M., et al., *Identification of PDGF receptors on human megakaryocytes and megakaryocytic cell lines*. Thromb Haemost, 1997. 78(2): p. 892-6.
237. Yan, X.Q., G. Brady, and N.N. Iscove, *Platelet-derived growth factor (PDGF) activates primitive hematopoietic precursors (pre-CFCmulti) by up-regulating IL-1 in PDGF receptor-expressing macrophages*. J Immunol, 1993. 150(6): p. 2440-8.
238. Pantazis, P., et al., *Coexpression of the genes for platelet-derived growth factor B-chain receptor and macrophage colony-stimulating factor 1 receptor during monocytic differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. 88(6): p. 2481-5.
239. Inaba, T., et al., *Expression of platelet-derived growth factor beta receptor on human monocyte-derived macrophages and effects of platelet-derived growth factor BB dimer on the cellular function*. J Biol Chem, 1993. 268(32): p. 24353-60.
240. Bar, R.S., et al., *The effects of platelet-derived growth factor in cultured microvessel endothelial cells*. Endocrinology, 1989. 124(4): p. 1841-8.
241. Lindahl, P., et al., *Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice*. Science, 1997. 277(5323): p. 242-5.
242. Sundberg, C., et al., *Microvascular pericytes express platelet-derived growth factor-beta receptors in human healing wounds and colorectal adenocarcinoma*. Am J Pathol, 1993. 143(5): p. 1377-88.
243. Daynes, R.A., T. Dowell, and B.A. Araneo, *Platelet-derived growth factor is a potent biologic response modifier of T cells*. J Exp Med, 1991. 174(6): p. 1323-33.
244. Deinhardt, F., *The Biology of Primate Retrovirus*. New York: Raven, 1980: p. 359-398.
245. Eccleston, P.A., K. Funa, and C.H. Heldin, *Expression of platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF alpha- and beta-receptors in the peripheral nervous system: an analysis of sciatic nerve and dorsal root ganglia*. Dev Biol, 1993. 155(2): p. 459-70.
246. Weinmaster, G. and G. Lemke, *Cell-specific cyclic AMP-mediated induction of the PDGF receptor*. EMBO J, 1990. 9(3): p. 915-20.
247. Schatteman, G.C., et al., *Regulation and role of PDGF receptor alpha-subunit expression during embryogenesis*. Development, 1992. 115(1): p. 123-31.

248. Smits, A., et al., *Neurotrophic activity of platelet-derived growth factor (PDGF): Rat neuronal cells possess functional PDGF beta-type receptors and respond to PDGF*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. 88(18): p. 8159-63.
249. Hart, I.K., et al., *PDGF receptors on cells of the oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O-2A) cell lineage*. Development, 1989. 105(3): p. 595-603.
250. Alpers, C.E., et al., *Developmental patterns of PDGF B-chain, PDGF-receptor, and alpha-actin expression in human glomerulogenesis*. Kidney Int, 1992. 42(2): p. 390-9.
251. Heldin, P., et al., *Differential expression of platelet-derived growth factor alpha- and beta- receptors on fat-storing cells and endothelial cells of rat liver*. Exp Cell Res, 1991. 193(2): p. 364-9.
252. Campochiaro, P.A., et al., *Platelet-derived growth factor is an autocrine growth stimulator in retinal pigmented epithelial cells*. J Cell Sci, 1994. 107 (Pt 9): p. 2459-69.
253. Pinzani, M., et al., *Effects of platelet-derived growth factor and other polypeptide mitogens on DNA synthesis and growth of cultured rat liver fat-storing cells*. J Clin Invest, 1989. 84(6): p. 1786-93.
254. Jin, P., et al., *Expression of PDGF A-chain and beta-receptor genes during rat myoblast differentiation*. J Cell Biol, 1990. 110(5): p. 1665-72.
255. Rubin, K., et al., *Induction of B-type receptors for platelet-derived growth factor in vascular inflammation: possible implications for development of vascular proliferative lesions*. Lancet, 1988. 1(8599): p. 1353-6.
256. Heidaran, M.A., et al., *Chimeric alpha- and beta-platelet-derived growth factor (PDGF) receptors define three immunoglobulin-like domains of the alpha-PDGF receptor that determine PDGF-AA binding specificity*. J Biol Chem, 1990. 265(31): p. 18741-4.
257. Omura, T., C.H. Heldin, and A. Ostman, *Immunoglobulin-like domain 4-mediated receptor-receptor interactions contribute to platelet-derived growth factor-induced receptor dimerization*. J Biol Chem, 1997. 272(19): p. 12676-82.
258. Lokker, N.A., et al., *Functional importance of platelet-derived growth factor (PDGF) receptor extracellular immunoglobulin-like domains. Identification of PDGF binding site and neutralizing monoclonal antibodies*. J Biol Chem, 1997. 272(52): p. 33037-44.
259. Seifert, R.A., et al., *Two different subunits associate to create isoform-specific platelet-derived growth factor receptors*. J Biol Chem, 1989. 264(15): p. 8771-8.
260. Kanakaraj, P., et al., *Ligand-induced interaction between alpha- and beta-type platelet-derived growth factor (PDGF) receptors: role of receptor heterodimers in kinase activation*. Biochemistry, 1991. 30(7): p. 1761-7.
261. Cao, R., et al., *Angiogenesis stimulated by PDGF-CC, a novel member in the PDGF family, involves activation of PDGFR-alphaalpha and -alphabeta receptors*. FASEB J, 2002. 16(12): p. 1575-83.
262. Gilbertson, D.G., et al., *Platelet-derived growth factor C (PDGF-C), a novel growth factor that binds to PDGF alpha and beta receptor*. J Biol Chem, 2001. 276(29): p. 27406-14.

263. Sorkin, A., et al., *Effect of receptor kinase inactivation on the rate of internalization and degradation of PDGF and the PDGF beta-receptor*. J Cell Biol, 1991. 112(3): p. 469-78.
264. Fantl, W.J., J.A. Escobedo, and L.T. Williams, *Mutations of the platelet-derived growth factor receptor that cause a loss of ligand-induced conformational change, subtle changes in kinase activity, and impaired ability to stimulate DNA synthesis*. Mol Cell Biol, 1989. 9(10): p. 4473-8.
265. Kazlauskas, A. and J.A. Cooper, *Autophosphorylation of the PDGF receptor in the kinase insert region regulates interactions with cell proteins*. Cell, 1989. 58(6): p. 1121-33.
266. Heldin, C.H., A. Ostman, and L. Ronnstrand, *Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors*. Biochim Biophys Acta, 1998. 1378(1): p. F79-113.
267. Mori, S., C.H. Heldin, and L. Claesson-Welsh, *Ligand-induced polyubiquitination of the platelet-derived growth factor beta-receptor*. J Biol Chem, 1992. 267(9): p. 6429-34.
268. Mori, S., et al., *Degradation process of ligand-stimulated platelet-derived growth factor beta-receptor involves ubiquitin-proteasome proteolytic pathway*. J Biol Chem, 1995. 270(49): p. 29447-52.
269. Hosang, M., et al., *Both homodimeric isoforms of PDGF (AA and BB) have mitogenic and chemotactic activity and stimulate phosphoinositol turnover*. J Cell Physiol, 1989. 140(3): p. 558-64.
270. Koyama, H., et al., *The fumagillin analogue TNP-470 inhibits DNA synthesis of vascular smooth muscle cells stimulated by platelet-derived growth factor and insulin-like growth factor-I. Possible involvement of cyclin-dependent kinase 2*. Circ Res, 1996. 79(4): p. 757-64.
271. Osornio-Vargas, A.R., et al., *Maximal PDGF-induced lung fibroblast chemotaxis requires PDGF receptor-alpha*. Am J Physiol, 1996. 271(1 Pt 1): p. L93-9.
272. Shure, D., et al., *PDGF AA homodimers are potent chemoattractants for fibroblasts and neutrophils, and for monocytes activated by lymphocytes or cytokines*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. 186(3): p. 1510-4.
273. Siegbahn, A., et al., *Differential effects of the various isoforms of platelet-derived growth factor on chemotaxis of fibroblasts, monocytes, and granulocytes*. J Clin Invest, 1990. 85(3): p. 916-20.
274. Yokote, K., et al., *Structural determinants in the platelet-derived growth factor alpha-receptor implicated in modulation of chemotaxis*. J Biol Chem, 1996. 271(9): p. 5101-11.
275. Yu, J.C., et al., *Tyrosine mutations within the alpha platelet-derived growth factor receptor kinase insert domain abrogate receptor-associated phosphatidylinositol-3 kinase activity without affecting mitogenic or chemotactic signal transduction*. Mol Cell Biol, 1991. 11(7): p. 3780-5.
276. Hossain, M.Z., P. Ao, and A.L. Boynton, *Rapid disruption of gap junctional communication and phosphorylation of connexin43 by platelet-derived growth factor in T51B rat liver epithelial cells expressing platelet-derived growth factor receptor*. J Cell Physiol, 1998. 174(1): p. 66-77.

277. Yao, R. and G.M. Cooper, *Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor*. *Science*, 1995. 267(5206): p. 2003-6.
278. Ataliotis, P. and M. Mercola, *Distribution and functions of platelet-derived growth factors and their receptors during embryogenesis*. *Int Rev Cytol*, 1997. 172: p. 95-127.
279. Bostrom, H., et al., *PDGF-A signaling is a critical event in lung alveolar myofibroblast development and alveogenesis*. *Cell*, 1996. 85(6): p. 863-73.
280. Leveen, P., et al., *Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities*. *Genes Dev*, 1994. 8(16): p. 1875-87.
281. Soriano, P., *The PDGF alpha receptor is required for neural crest cell development and for normal patterning of the somites*. *Development*, 1997. 124(14): p. 2691-700.
282. Soriano, P., *Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice*. *Genes Dev*, 1994. 8(16): p. 1888-96.
283. Sasahara, A., et al., *Platelet-derived growth factor B-chain-like immunoreactivity in the developing and adult rat brain*. *Brain Res Dev Brain Res*, 1992. 68(1): p. 41-53.
284. Orr-Urtreger, A., et al., *Developmental expression of the alpha receptor for platelet-derived growth factor, which is deleted in the embryonic lethal Patch mutation*. *Development*, 1992. 115(1): p. 289-303.
285. Fressinaud, C., J.M. Vallat, and A. Pouplard-Barthelaix, *Platelet-derived growth factor partly prevents chemically induced oligodendrocyte death and improves myelin-like membranes repair in vitro*. *Glia*, 1996. 16(1): p. 40-50.
286. Othberg, A., et al., *Specific effects of platelet derived growth factor (PDGF) on fetal rat and human dopaminergic neurons in vitro*. *Exp Brain Res*, 1995. 105(1): p. 111-22.
287. Pietz, K., et al., *Protective effect of platelet-derived growth factor against 6-hydroxydopamine-induced lesion of rat dopaminergic neurons in culture*. *Neurosci Lett*, 1996. 204(1-2): p. 101-4.
288. Hermanson, M., et al., *PDGF and its receptors following facial nerve axotomy in rats: expression in neurons and surrounding glia*. *Exp Brain Res*, 1995. 102(3): p. 415-22.
289. Bryckaert, M.C., et al., *Collagen-induced binding to human platelets of platelet-derived growth factor leading to inhibition of P43 and P20 phosphorylation*. *J Biol Chem*, 1989. 264(8): p. 4336-41.
290. Martins, R.N., et al., *The role of PDGF-BB on the development of the collateral circulation after acute arterial occlusion*. *Growth Factors*, 1994. 10(4): p. 299-306.
291. Brown, D.M., et al., *Platelet-derived growth factor BB induces functional vascular anastomoses in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(13): p. 5920-4.
292. Reuterdaahl, C., et al., *Tissue localization of beta receptors for platelet-derived growth factor and platelet-derived growth factor B chain during wound repair in humans*. *J Clin Invest*, 1993. 91(5): p. 2065-75.
293. Eckersley, J.R. and H.A. Dudley, *Wounds and wound healing*. *Br Med Bull*, 1988. 44(2): p. 423-36.

294. Cromack, D.T., B. Porras-Reyes, and T.A. Mustoe, *Current concepts in wound healing: growth factor and macrophage interaction*. J Trauma, 1990. 30(12 Suppl): p. S129-33.
295. Soma, Y., V. Dvonch, and G.R. Grotendorst, *Platelet-derived growth factor AA homodimer is the predominant isoform in human platelets and acute human wound fluid*. FASEB J, 1992. 6(11): p. 2996-3001.
296. Katz, M.H., et al., *Human wound fluid from acute wounds stimulates fibroblast and endothelial cell growth*. J Am Acad Dermatol, 1991. 25(6 Pt 1): p. 1054-8.
297. Walker, L.N., et al., *Production of platelet-derived growth factor-like molecules by cultured arterial smooth muscle cells accompanies proliferation after arterial injury*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. 83(19): p. 7311-5.
298. Pierce, G.F., et al., *Detection of platelet-derived growth factor (PDGF)-AA in actively healing human wounds treated with recombinant PDGF-BB and absence of PDGF in chronic nonhealing wounds*. J Clin Invest, 1995. 96(3): p. 1336-50.
299. Terracio, L., et al., *Induction of platelet-derived growth factor receptor expression in smooth muscle cells and fibroblasts upon tissue culturing*. J Cell Biol, 1988. 107(5): p. 1947-57.
300. Krane, J.F., et al., *Increased dermal expression of platelet-derived growth factor receptors in growth-activated skin wounds and psoriasis*. J Invest Dermatol, 1991. 96(6): p. 983-6.
301. Green, R.J., et al., *Immunolocalization of platelet-derived growth factor A and B chains and PDGF-alpha and beta receptors in human gingival wounds*. J Periodontal Res, 1997. 32(2): p. 209-14.
302. Beer, H.D., M.T. Longaker, and S. Werner, *Reduced expression of PDGF and PDGF receptors during impaired wound healing*. J Invest Dermatol, 1997. 109(2): p. 132-8.
303. Blatti, S.P., et al., *Induction of fibronectin gene transcription and mRNA is a primary response to growth-factor stimulation of AKR-2B cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. 85(4): p. 1119-23.
304. Schonherr, E., et al., *Effects of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta 1 on the synthesis of a large versican-like chondroitin sulfate proteoglycan by arterial smooth muscle cells*. J Biol Chem, 1991. 266(26): p. 17640-7.
305. Heldin, P., T.C. Laurent, and C.H. Heldin, *Effect of growth factors on hyaluronan synthesis in cultured human fibroblasts*. Biochem J, 1989. 258(3): p. 919-22.
306. Bauer, E.A., et al., *Stimulation of in vitro human skin collagenase expression by platelet-derived growth factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. 82(12): p. 4132-6.
307. Grotendorst, G.R., et al., *Stimulation of granulation tissue formation by platelet-derived growth factor in normal and diabetic rats*. J Clin Invest, 1985. 76(6): p. 2323-9.
308. Sprugel, K.H., et al., *Effects of growth factors in vivo. I. Cell ingrowth into porous subcutaneous chambers*. Am J Pathol, 1987. 129(3): p. 601-13.

309. Pierce, G.F., et al., *Tissue repair processes in healing chronic pressure ulcers treated with recombinant platelet-derived growth factor BB*. Am J Pathol, 1994. 145(6): p. 1399-410.
310. Pierce, G.F., et al., *Platelet-derived growth factor-BB and transforming growth factor beta 1 selectively modulate glycosaminoglycans, collagen, and myofibroblasts in excisional wounds*. Am J Pathol, 1991. 138(3): p. 629-46.
311. Pierce, G.F., et al., *Role of platelet-derived growth factor in wound healing*. J Cell Biochem, 1991. 45(4): p. 319-26.
312. Mustoe, T.A., et al., *Growth factor-induced acceleration of tissue repair through direct and inductive activities in a rabbit dermal ulcer model*. J Clin Invest, 1991. 87(2): p. 694-703.
313. Hermanson, M., et al., *Association of loss of heterozygosity on chromosome 17p with high platelet-derived growth factor alpha receptor expression in human malignant gliomas*. Cancer Res, 1996. 56(1): p. 164-71.
314. Guha, A., et al., *Expression of PDGF and PDGF receptors in human astrocytoma operation specimens supports the existence of an autocrine loop*. Int J Cancer, 1995. 60(2): p. 168-73.
315. Wang, J., M.D. Coltrera, and A.M. Gown, *Cell proliferation in human soft tissue tumors correlates with platelet-derived growth factor B chain expression: an immunohistochemical and in situ hybridization study*. Cancer Res, 1994. 54(2): p. 560-4.
316. Katoh, O., et al., *Platelet derived growth factor messenger RNA is increased in bone marrow megakaryocytes in patients with myeloproliferative disorders*. Am J Hematol, 1990. 35(3): p. 145-50.
317. Kimura, A., et al., *Platelet-derived growth factor expression in accelerated and blastic phase of chronic myelogenous leukaemia with myelofibrosis*. Br J Haematol, 1994. 86(2): p. 303-7.
318. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s*. Nature, 1993. 362(6423): p. 801-9.
319. Libby, P., et al., *Functions of vascular wall cells related to development of transplantation-associated coronary arteriosclerosis*. Transplant Proc, 1989. 21(4): p. 3677-84.
320. Libby, P., et al., *Production of platelet-derived growth factor-like mitogen by smooth-muscle cells from human atheroma*. N Engl J Med, 1988. 318(23): p. 1493-8.
321. Wilcox, J.N., et al., *Platelet-derived growth factor mRNA detection in human atherosclerotic plaques by in situ hybridization*. J Clin Invest, 1988. 82(3): p. 1134-43.
322. Golden, M.A., et al., *Platelet-derived growth factor activity and mRNA expression in healing vascular grafts in baboons. Association in vivo of platelet-derived growth factor mRNA and protein with cellular proliferation*. J Clin Invest, 1991. 87(2): p. 406-14.
323. Ross, R., et al., *Localization of PDGF-B protein in macrophages in all phases of atherogenesis*. Science, 1990. 248(4958): p. 1009-12.
324. Uchida, K., et al., *Expression of platelet-derived growth factor B-chain in neointimal smooth muscle cells of balloon injured rabbit femoral arteries*. Atherosclerosis, 1996. 124(1): p. 9-23.

325. Majesky, M.W., et al., *PDGF ligand and receptor gene expression during repair of arterial injury*. J Cell Biol, 1990. 111(5 Pt 1): p. 2149-58.
326. Kanzaki, T., et al., *Enhanced arterial intimal thickening after balloon catheter injury in diabetic animals accompanied by PDGF beta-receptor overexpression of aortic media*. Eur J Clin Invest, 1994. 24(6): p. 377-81.
327. Ueda, M., et al., *In situ detection of platelet-derived growth factor-A and -B chain mRNA in human coronary arteries after percutaneous transluminal coronary angioplasty*. Am J Pathol, 1996. 149(3): p. 831-43.
328. Kraiss, L.W., et al., *Acute reductions in blood flow and shear stress induce platelet-derived growth factor-A expression in baboon prosthetic grafts*. Circ Res, 1996. 79(1): p. 45-53.
329. Mondy, J.S., et al., *Platelet-derived growth factor ligand and receptor expression in response to altered blood flow in vivo*. Circ Res, 1997. 81(3): p. 320-7.
330. Hart, C.E. and A.W. Clowes, *Platelet-derived growth factor and arterial response to injury*. Circulation, 1997. 95(3): p. 555-6.
331. Nabel, E.G., et al., *Direct transfer of transforming growth factor beta 1 gene into arteries stimulates fibrocellular hyperplasia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(22): p. 10759-63.
332. Sirois, M.G., M. Simons, and E.R. Edelman, *Antisense oligonucleotide inhibition of PDGFR-beta receptor subunit expression directs suppression of intimal thickening*. Circulation, 1997. 95(3): p. 669-76.
333. Pompili, V.J., et al., *Expression and function of a recombinant PDGF B gene in porcine arteries*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. 15(12): p. 2254-64.
334. Yamamoto, M., et al., *Differences in cellular responses to mitogens in arterial smooth muscle cells derived from patients with moyamoya disease*. Stroke, 1998. 29(6): p. 1188-93.
335. Antoniades, H.N., et al., *Platelet-derived growth factor in idiopathic pulmonary fibrosis*. J Clin Invest, 1990. 86(4): p. 1055-64.
336. Katayose, D., et al., *Increased expression of PDGF A- and B-chain genes in rat lungs with hypoxic pulmonary hypertension*. Am J Physiol, 1993. 264(2 Pt 1): p. L100-6.
337. Yi, E.S., et al., *Platelet-derived growth factor causes pulmonary cell proliferation and collagen deposition in vivo*. Am J Pathol, 1996. 149(2): p. 539-48.
338. Ohta, K., et al., *Suppressive effect of antisense DNA of platelet-derived growth factor on murine pulmonary fibrosis with silica particles*. Chest, 1997. 111(6 Suppl): p. 105S.
339. Abboud, H.E., *Role of platelet-derived growth factor in renal injury*. Annu Rev Physiol, 1995. 57: p. 297-309.
340. Pinzani, M., et al., *Mitogenic signals for platelet-derived growth factor isoforms in liver fat-storing cells*. Am J Physiol, 1991. 260(3 Pt 1): p. C485-91.
341. Pinzani, M., et al., *Expression of platelet-derived growth factor and its receptors in normal human liver and during active hepatic fibrogenesis*. Am J Pathol, 1996. 148(3): p. 785-800.
342. Massague, J., *The transforming growth factor-beta family*. Annu Rev Cell Biol, 1990. 6: p. 597-641.

343. Bottner, M., K. Krieglstein, and K. Unsicker, *The transforming growth factor-betas: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions*. J Neurochem, 2000. 75(6): p. 2227-40.
344. Moses, H.L., et al., *Transforming growth factor production by chemically transformed cells*. Cancer Res, 1981. 41(7): p. 2842-8.
345. Roberts, A.B., et al., *New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. 78(9): p. 5339-43.
346. Childs, C.B., et al., *Serum contains a platelet-derived transforming growth factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. 79(17): p. 5312-6.
347. Assoian, R.K., et al., *Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization*. J Biol Chem, 1983. 258(11): p. 7155-60.
348. Derynck, R., et al., *A new type of transforming growth factor-beta, TGF-beta 3*. EMBO J, 1988. 7(12): p. 3737-43.
349. Seyedin, S.M., et al., *Cartilage-inducing factor-B is a unique protein structurally and functionally related to transforming growth factor-beta*. J Biol Chem, 1987. 262(5): p. 1946-9.
350. Cheifetz, S., et al., *The transforming growth factor-beta system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors*. Cell, 1987. 48(3): p. 409-15.
351. Marquardt, H., M.N. Lioubin, and T. Ikeda, *Complete amino acid sequence of human transforming growth factor type beta 2*. J Biol Chem, 1987. 262(25): p. 12127-31.
352. ten Dijke, P., et al., *Identification of another member of the transforming growth factor type beta gene family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. 85(13): p. 4715-9.
353. Moses, H.L., E.Y. Yang, and J.A. Pietsenpol, *TGF-beta stimulation and inhibition of cell proliferation: new mechanistic insights*. Cell, 1990. 63(2): p. 245-7.
354. Baird, A. and T. Durkin, *Inhibition of endothelial cell proliferation by type beta-transforming growth factor: interactions with acidic and basic fibroblast growth factors*. Biochem Biophys Res Commun, 1986. 138(1): p. 476-82.
355. Seyedin, S.M., et al., *Cartilage-inducing factor-A. Apparent identity to transforming growth factor-beta*. J Biol Chem, 1986. 261(13): p. 5693-5.
356. Roberts, A.B., et al., *Transforming growth factor beta: biochemistry and roles in embryogenesis, tissue repair and remodeling, and carcinogenesis*. Recent Prog Horm Res, 1988. 44: p. 157-97.
357. Wyss-Coray, T., et al., *Increased central nervous system production of extracellular matrix components and development of hydrocephalus in transgenic mice overexpressing transforming growth factor-beta 1*. Am J Pathol, 1995. 147(1): p. 53-67.
358. Roberts, A.B., et al., *Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. 83(12): p. 4167-71.
359. Lucas, P.A., *Chemotactic response of osteoblast-like cells to transforming growth factor beta*. Bone, 1989. 10(6): p. 459-63.

360. Beck, L.S., et al., *Accelerated healing of ulcer wounds in the rabbit ear by recombinant human transforming growth factor-beta 1*. *Growth Factors*, 1990. 2(4): p. 273-82.
361. Beck, L.S., et al., *Recombinant human transforming growth factor-beta 1 (rhTGF-beta 1) enhances healing and strength of granulation skin wounds*. *Growth Factors*, 1990. 3(4): p. 267-75.
362. Schmitz, B., et al., *Influence of cytokine stimulation (granulocyte macrophage-colony stimulating factor, interleukin-3 and transforming growth factor-beta-1) on adhesion molecule expression in normal human bone marrow fibroblasts*. *Acta Haematol*, 1995. 94(4): p. 173-81.
363. Wahl, S.M., et al., *Macrophage production of TGF-beta and regulation by TGF-beta*. *Ann N Y Acad Sci*, 1990. 593: p. 188-96.
364. Tsunawaki, S., et al., *Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta*. *Nature*, 1988. 334(6179): p. 260-2.
365. Coffman, R.L., H.F. Savelkoul, and D.A. Leberman, *Cytokine regulation of immunoglobulin isotype switching and expression*. *Semin Immunol*, 1989. 1(1): p. 55-63.
366. Meng, S.Z., et al., *Roles of glutamate transporter and receptors, poly (ADPribose) polymerase, and transforming growth factor-beta1 in pontosubicular neuron necrosis*. *J Child Neurol*, 2000. 15(6): p. 362-9.
367. Flanders, K.C., R.F. Ren, and C.F. Lippa, *Transforming growth factor-betas in neurodegenerative disease*. *Prog Neurobiol*, 1998. 54(1): p. 71-85.
368. Krieglstein, K., L. Farkas, and K. Unsicker, *TGF-beta regulates the survival of ciliary ganglionic neurons synergistically with ciliary neurotrophic factor and neurotrophins*. *J Neurobiol*, 1998. 37(4): p. 563-72.
369. Roberts, A.B. and M.B. Sporn, *The transforming growth factor-betas*. in *Handbook of Experimental Pharmacology*, Springer Verlag, Heidelberg, 1990. 95: p. 419-472.
370. Daopin, S., et al., *Crystal structure of transforming growth factor-beta 2: an unusual fold for the superfamily*. *Science*, 1992. 257(5068): p. 369-73.
371. Schlunegger, M.P. and M.G. Grutter, *An unusual feature revealed by the crystal structure at 2.2 Å resolution of human transforming growth factor-beta 2*. *Nature*, 1992. 358(6385): p. 430-4.
372. McDonald, N.Q. and W.A. Hendrickson, *A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif*. *Cell*, 1993. 73(3): p. 421-4.
373. Archer, S.J., et al., *Transforming growth factor beta 1: secondary structure as determined by heteronuclear magnetic resonance spectroscopy*. *Biochemistry*, 1993. 32(4): p. 1164-71.
374. Kingsley, D.M., *The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms*. *Genes Dev*, 1994. 8(2): p. 133-46.
375. Gray, A.M. and A.J. Mason, *Requirement for activin A and transforming growth factor--beta 1 pro-regions in homodimer assembly*. *Science*, 1990. 247(4948): p. 1328-30.
376. Gentry, L.E., et al., *Molecular events in the processing of recombinant type I pre-pro-transforming growth factor beta to the mature polypeptide*. *Mol Cell Biol*, 1988. 8(10): p. 4162-8.

377. Gentry, L.E., et al., *Type I transforming growth factor beta: amplified expression and secretion of mature and precursor polypeptides in Chinese hamster ovary cells*. *Mol Cell Biol*, 1987. 7(10): p. 3418-27.
378. Miyazono, K., et al., *A role of the latent TGF-beta 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1*. *EMBO J*, 1991. 10(5): p. 1091-101.
379. Nunes, I., et al., *Latent transforming growth factor-beta binding protein domains involved in activation and transglutaminase-dependent cross-linking of latent transforming growth factor-beta*. *J Cell Biol*, 1997. 136(5): p. 1151-63.
380. Lyons, R.M., J. Keski-Oja, and H.L. Moses, *Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium*. *J Cell Biol*, 1988. 106(5): p. 1659-65.
381. Lawrence, D.A., R. Pircher, and P. Jullien, *Conversion of a high molecular weight latent beta-TGF from chicken embryo fibroblasts into a low molecular weight active beta-TGF under acidic conditions*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1985. 133(3): p. 1026-34.
382. Brown, P.D., et al., *Physicochemical activation of recombinant latent transforming growth factor-beta's 1, 2, and 3*. *Growth Factors*, 1990. 3(1): p. 35-43.
383. Huber, D., J. Philipp, and A. Fontana, *Protease inhibitors interfere with the transforming growth factor-beta-dependent but not the transforming growth factor-beta-independent pathway of tumor cell-mediated immunosuppression*. *J Immunol*, 1992. 148(1): p. 277-84.
384. Janssens, K., et al., *Transforming growth factor-beta1 to the bone*. *Endocr Rev*, 2005. 26(6): p. 743-74.
385. Lopez-Casillas, F., J.L. Wrana, and J. Massague, *Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor*. *Cell*, 1993. 73(7): p. 1435-44.
386. Cheifetz, S., et al., *Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells*. *J Biol Chem*, 1992. 267(27): p. 19027-30.
387. Löffler and Petrides, *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer, 2003. 7.
388. Yamashita, H., et al., *Formation of hetero-oligomeric complexes of type I and type II receptors for transforming growth factor-beta*. *J Biol Chem*, 1994. 269(31): p. 20172-8.
389. Massague, J., *TGF-beta signal transduction*. *Annu Rev Biochem*, 1998. 67: p. 753-91.
390. Wrana, J.L., et al., *TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex*. *Cell*, 1992. 71(6): p. 1003-14.
391. Chen, Y., J.J. Lebrun, and W. Vale, *Regulation of transforming growth factor beta- and activin-induced transcription by mammalian Mad proteins*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(23): p. 12992-7.
392. Lagna, G., et al., *Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways*. *Nature*, 1996. 383(6603): p. 832-6.
393. Zhang, Y., et al., *Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF-beta response*. *Nature*, 1996. 383(6596): p. 168-72.
394. Yu, L., M.C. Hebert, and Y.E. Zhang, *TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses*. *EMBO J*, 2002. 21(14): p. 3749-59.

395. Seyedin, S.M., et al., *Purification and characterization of two cartilage-inducing factors from bovine demineralized bone*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. 82(8): p. 2267-71.
396. Bertolino, P., et al., *Transforming growth factor-beta signal transduction in angiogenesis and vascular disorders*. Chest, 2005. 128(6 Suppl): p. 585S-590S.
397. Kimelman, D. and M. Kirschner, *Synergistic induction of mesoderm by FGF and TGF-beta and the identification of an mRNA coding for FGF in the early Xenopus embryo*. Cell, 1987. 51(5): p. 869-77.
398. Gatherer, D., et al., *Expression of TGF-beta isoforms during first trimester human embryogenesis*. Development, 1990. 110(2): p. 445-60.
399. Kallapur, S., I. Ormsby, and T. Doetschman, *Strain dependency of TGFbeta1 function during embryogenesis*. Mol Reprod Dev, 1999. 52(4): p. 341-9.
400. Shull, M.M., et al., *Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease*. Nature, 1992. 359(6397): p. 693-9.
401. Kulkarni, A.B., et al., *Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(2): p. 770-4.
402. Kiefer, R., et al., *Transforming growth factor-beta 1: a lesion-associated cytokine of the nervous system*. Int J Dev Neurosci, 1995. 13(3-4): p. 331-9.
403. Unsicker, K., et al., *Transforming growth factor beta isoforms in the adult rat central and peripheral nervous system*. Neuroscience, 1991. 44(3): p. 613-25.
404. Flood, C., et al., *Transforming growth factor-beta1 in the cerebrospinal fluid of patients with subarachnoid hemorrhage: titers derived from exogenous and endogenous sources*. J Cereb Blood Flow Metab, 2001. 21(2): p. 157-62.
405. Krieglstein, K., et al., *Reduction of endogenous transforming growth factors beta prevents ontogenetic neuron death*. Nat Neurosci, 2000. 3(11): p. 1085-90.
406. Pratt, B.M. and J.M. McPherson, *TGF-beta in the central nervous system: potential roles in ischemic injury and neurodegenerative diseases*. Cytokine Growth Factor Rev, 1997. 8(4): p. 267-92.
407. Unsicker, K., et al., *Cytokines in neural regeneration*. Curr Opin Neurobiol, 1992. 2(5): p. 671-8.
408. Prehn, J.H., et al., *Regulation of neuronal Bcl2 protein expression and calcium homeostasis by transforming growth factor type beta confers wide-ranging protection on rat hippocampal neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(26): p. 12599-603.
409. Rota, E., et al., *Increased intrathecal TGF-beta1, but not IL-12, IFN-gamma and IL-10 levels in Alzheimer's disease patients*. Neurol Sci, 2006. 27(1): p. 33-9.
410. Krupinski, J., et al., *Increased expression of TGF-beta 1 in brain tissue after ischemic stroke in humans*. Stroke, 1996. 27(5): p. 852-7.
411. Raivich, G., et al., *Molecular signals for glial activation: pro- and anti-inflammatory cytokines in the injured brain*. Acta Neurochir Suppl, 1999. 73: p. 21-30.

412. Border, W.A. and E. Ruoslahti, *Transforming growth factor-beta in disease: the dark side of tissue repair*. J Clin Invest, 1992. 90(1): p. 1-7.
413. Logan, A., et al., *Effects of transforming growth factor beta 1 on scar production in the injured central nervous system of the rat*. Eur J Neurosci, 1994. 6(3): p. 355-63.
414. Logan, A., et al., *Inhibition of glial scarring in the injured rat brain by a recombinant human monoclonal antibody to transforming growth factor-beta2*. Eur J Neurosci, 1999. 11(7): p. 2367-74.
415. Krupinski, J., et al., *Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke*. Stroke, 1994. 25(9): p. 1794-8.
416. Krupinski, J., et al., *Prognostic value of blood vessel density in ischaemic stroke*. Lancet, 1993. 342(8873): p. 742.
417. Merwin, J.R., et al., *Transforming growth factor beta 1 modulates extracellular matrix organization and cell-cell junctional complex formation during in vitro angiogenesis*. J Cell Physiol, 1990. 142(1): p. 117-28.
418. Lindholm, D., et al., *Transforming growth factor-beta 1 in the rat brain: increase after injury and inhibition of astrocyte proliferation*. J Cell Biol, 1992. 117(2): p. 395-400.
419. Kehrl, J.H., et al., *Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth*. J Exp Med, 1986. 163(5): p. 1037-50.
420. Coffman, R.L., D.A. Leberman, and B. Shrader, *Transforming growth factor beta specifically enhances IgA production by lipopolysaccharide-stimulated murine B lymphocytes*. J Exp Med, 1989. 170(3): p. 1039-44.
421. Ruscetti, F.W. and M.A. Palladino, *Transforming growth factor-beta and the immune system*. Prog Growth Factor Res, 1991. 3(2): p. 159-75.
422. Goumans, M.J., F. Lebrin, and G. Valdimarsdottir, *Controlling the angiogenic switch: a balance between two distinct TGF- β receptor signaling pathways*. Trends Cardiovasc Med, 2003. 13(7): p. 301-7.
423. Pepper, M.S., et al., *Biphasic effect of transforming growth factor-beta 1 on in vitro angiogenesis*. Exp Cell Res, 1993. 204(2): p. 356-63.
424. Postlethwaite, A.E., et al., *Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor beta*. J Exp Med, 1987. 165(1): p. 251-6.
425. Shim, K.S., et al., *Elevated serum levels of transforming growth factor-beta1 in patients with colorectal carcinoma: its association with tumor progression and its significant decrease after curative surgical resection*. Cancer, 1999. 85(3): p. 554-61.
426. Markowitz, S., et al., *Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability*. Science, 1995. 268(5215): p. 1336-8.
427. Nakamura, M., et al., *Transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) is a preoperative prognostic indicator in advanced gastric carcinoma*. Br J Cancer, 1998. 78(10): p. 1373-8.
428. Tsai, J.F., et al., *Elevated urinary transforming growth factor-beta1 level as a tumour marker and predictor of poor survival in cirrhotic hepatocellular carcinoma*. Br J Cancer, 1997. 76(2): p. 244-50.

429. Shirai, Y., et al., *Elevated levels of plasma transforming growth factor-beta in patients with hepatocellular carcinoma*. *Jpn J Cancer Res*, 1992. 83(7): p. 676-9.
430. Roberts, A.B. and M. Sporn, *Transforming growth factor beta*. In: *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair* (2nd ed.), edited by Clark RAF. New York: Plenum, 1996: p. 275-308.
431. Desmouliere, A., et al., *Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts*. *J Cell Biol*, 1993. 122(1): p. 103-11.
432. Grainger, D.J., *Transforming growth factor beta and atherosclerosis: so far, so good for the protective cytokine hypothesis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. 24(3): p. 399-404.
433. Grainger, D.J. and J.C. Metcalfe, *A pivotal role for TGF-beta in atherogenesis?* *Biol Rev Camb Philos Soc*, 1995. 70(4): p. 571-96.
434. Owens, G.K., et al., *Transforming growth factor-beta-induced growth inhibition and cellular hypertrophy in cultured vascular smooth muscle cells*. *J Cell Biol*, 1988. 107(2): p. 771-80.
435. Bjorkerud, S., *Effects of transforming growth factor-beta 1 on human arterial smooth muscle cells in vitro*. *Arterioscler Thromb*, 1991. 11(4): p. 892-902.
436. Grainger, D.J., et al., *Transforming growth factor beta decreases the rate of proliferation of rat vascular smooth muscle cells by extending the G2 phase of the cell cycle and delays the rise in cyclic AMP before entry into M phase*. *Biochem J*, 1994. 299 (Pt 1): p. 227-35.
437. Kojima, S., P.C. Harpel, and D.B. Rifkin, *Lipoprotein (a) inhibits the generation of transforming growth factor beta: an endogenous inhibitor of smooth muscle cell migration*. *J Cell Biol*, 1991. 113(6): p. 1439-45.
438. Gamble, J.R., Y. Khew-Goodall, and M.A. Vadas, *Transforming growth factor-beta inhibits E-selectin expression on human endothelial cells*. *J Immunol*, 1993. 150(10): p. 4494-503.
439. Argmann, C.A., et al., *Transforming growth factor-beta1 inhibits macrophage cholesteryl ester accumulation induced by native and oxidized VLDL remnants*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001. 21(12): p. 2011-8.
440. Lutgens, E., et al., *Transforming growth factor-beta mediates balance between inflammation and fibrosis during plaque progression*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. 22(6): p. 975-82.
441. Robbie, L. and P. Libby, *Inflammation and atherothrombosis*. *Ann N Y Acad Sci*, 2001. 947: p. 167-79; discussion 179-80.
442. Mallat, Z., et al., *Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice*. *Circ Res*, 2001. 89(10): p. 930-4.
443. Suzui, H., et al., *Immunohistochemical reactions for fibroblast growth factor receptor in arteries of patients with moyamoya disease*. *Neurosurgery*, 1994. 35(1): p. 20-4; discussion 24-5.
444. Malek, *elevation of cerebrospinal fluid levels of bFGF in moyamoya and central nervous system disorders*. *Neurosurgery*, 1997. 35: p. 20-25.

445. Kang, H.S., et al., *Plasma Matrix Metalloproteinases, Cytokines, and Angiogenic Factors in Moyamoya Disease*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2009.
446. Takagi, Y.e.a., 2006, Vol. , No. , page . *Caspase-3-dependent apoptosis in middle cerebral arteries in patients with Moyamoya disease*. Neurosurgery, 2006. 59(4): p. 894-901.
447. Aoyagi, M., et al., *Kinetics of 125I-PDGF binding and down-regulation of PDGF receptor in arterial smooth muscle cells derived from patients with moyamoya disease*. J Cell Physiol, 1993. 154(2): p. 281-8.
448. Aoyagi, M., et al., *Altered cellular responses to serum mitogens, including platelet-derived growth factor, in cultured smooth muscle cells derived from arteries of patients with moyamoya disease*. J Cell Physiol, 1991. 147(2): p. 191-8.
449. Nikol, S., et al., *Expression of transforming growth factor-beta 1 is increased in human vascular restenosis lesions*. J Clin Invest, 1992. 90(4): p. 1582-92.
450. Thannickal, V.J., et al., *Upregulated expression of fibroblast growth factor (FGF) receptors by transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) mediates enhanced mitogenic responses to FGFs in cultured human lung fibroblasts*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. 251(2): p. 437-41.
451. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. 74(12): p. 5463-7.
452. Hanauer, S., et al., *Poster: Automatisierte Aufreinigung von Markierungsreaktionen bei der DNA-Sequenzierung mittels Magnetseparation.*, in *GVC/Dechema-Vortragstagung „Modellierung - Von der Zelle zum Prozess“*. 2008.
453. Brookes, A.J., *The essence of SNPs*. Gene, 1999. 234(2): p. 177-86.
454. Chorley, B.N., et al., *Discovery and verification of functional single nucleotide polymorphisms in regulatory genomic regions: current and developing technologies*. Mutat Res, 2008. 659(1-2): p. 147-57.
455. Wong, G.K., et al., *A population threshold for functional polymorphisms*. Genome Res, 2003. 13(8): p. 1873-9.
456. Kang, H.-S. and K.-C. Wang, eds. *Single Nucleotide Polymorphism and Moyamoya Disease*. Vol. In: Ikezaki K, Loftus CM, eds. Moyamoya Disease. Rolling Meadows, Ill: American Association of Neurological Surgeons. 2010, In: Cho B-K, Tominaga T, eds. Moyamoya Disease Update. Springer
457. Lin, H.J., et al., *Sclera-related gene polymorphisms in high myopia*. Mol Vis, 2009. 15: p. 1655-63.
458. Petrovic, M.G., et al., *Polymorphisms in the promoter region of the basic fibroblast growth factor gene and proliferative diabetic retinopathy in Caucasians with type 2 diabetes*. Clin Experiment Ophthalmol, 2008. 36(2): p. 168-72.
459. Kato, M., et al., *Effect of basic fibroblast growth factor (FGF2) gene polymorphisms on SSRIs treatment response and side effects*. Eur Neuropsychopharmacol, 2009. 19(10): p. 718-25.
460. Johnatty, S.E., et al., *Polymorphisms in the FGF2 gene and risk of serous ovarian cancer: results from the ovarian cancer association consortium*. Twin Res Hum Genet, 2009. 12(3): p. 269-75.

461. Kim, H.J., et al., *Genetic association between 5'-upstream single-nucleotide polymorphisms of PDGFRB and schizophrenia in a Korean population*. Schizophr Res, 2008. 103(1-3): p. 201-8.
462. Sie, M.P., et al., *TGF-beta 1 polymorphisms and risk of myocardial infarction and stroke: the Rotterdam Study*. Stroke, 2006. 37(11): p. 2667-71.
463. Cambien, F., et al., *Polymorphisms of the transforming growth factor-beta 1 gene in relation to myocardial infarction and blood pressure. The Etude Cas-Temoin de l'Infarctus du Myocarde (ECTIM) Study*. Hypertension, 1996. 28(5): p. 881-7.
464. Syrris, P., et al., *Transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms and coronary artery disease*. Clin Sci (Lond), 1998. 95(6): p. 659-67.
465. Grainger, D.J., et al., *Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1*. Hum Mol Genet, 1999. 8(1): p. 93-7.
466. Wang, H., et al., *Transforming growth factor beta 1 gene variants increase transcription and are associated with liver cirrhosis in Chinese*. Cytokine, 2008. 43(1): p. 20-5.
467. Wang, X.L., A.S. Sim, and D.E. Wilcken, *A common polymorphism of the transforming growth factor-beta1 gene and coronary artery disease*. Clin Sci (Lond), 1998. 95(6): p. 745-6.
468. Luedeking, E.K., et al., *Analysis of genetic polymorphisms in the transforming growth factor-beta1 gene and the risk of Alzheimer's disease*. Hum Genet, 2000. 106(5): p. 565-9.
469. Crobu, F., et al., *Role of TGF-beta1 haplotypes in the occurrence of myocardial infarction in young Italian patients*. BMC Med Genet, 2008. 9: p. 13.
470. Koch, W., et al., *Association of transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms with myocardial infarction in patients with angiographically proven coronary heart disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. 26(5): p. 1114-9.
471. Oda, K., et al., *Polymorphisms in pro- and anti-inflammatory cytokine genes and susceptibility to atherosclerosis: a pathological study of 1503 consecutive autopsy cases*. Hum Mol Genet, 2007. 16(6): p. 592-9.
472. Yokota, M., et al., *Association of a T29-->C polymorphism of the transforming growth factor-beta1 gene with genetic susceptibility to myocardial infarction in Japanese*. Circulation, 2000. 101(24): p. 2783-7.
473. Holweg, C.T., et al., *The transforming growth factor-beta1 codon 10 gene polymorphism and accelerated graft vascular disease after clinical heart transplantation*. Transplantation, 2001. 71(10): p. 1463-7.
474. Rao, M., et al., *Transforming growth factor-beta 1 gene polymorphisms and cardiovascular disease in hemodialysis patients*. Kidney Int, 2004. 66(1): p. 419-27.
475. Arosio, B., et al., *+10 T/C polymorphisms in the gene of transforming growth factor-beta1 are associated with neurodegeneration and its clinical evolution*. Mech Ageing Dev, 2007. 128(10): p. 553-7.
476. Yamada, M., *Cerebral amyloid angiopathy and gene polymorphisms*. J Neurol Sci, 2004. 226(1-2): p. 41-4.

477. Kim, Y. and C. Lee, *The gene encoding transforming growth factor beta 1 confers risk of ischemic stroke and vascular dementia*. *Stroke*, 2006. 37(11): p. 2843-5.
478. Liebhart, J., et al., *The G/G genotype of transforming growth factor beta 1 (TGF-beta1) single nucleotide (+915G/C) polymorphism coincident with other host and environmental factors is associated with irreversible bronchoconstriction in asthmatics*. *Int J Immunogenet*, 2008. 35(6): p. 417-22.
479. Ivanov, V.P., et al., *Arg25Pro polymorphism of transforming growth factor-beta1 and its role in the pathogenesis of essential hypertension in Russian population of the Central Chernozem Region*. *Bull Exp Biol Med*, 2007. 144(1): p. 66-8.
480. Hu, B.C., et al., *[Single nucleotide polymorphisms of three candidate genes in essential hypertension]*. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, 2006. 45(4): p. 281-4.
481. Osterreicher, C.H., F. Stickel, and D.A. Brenner, *Genomics of liver fibrosis and cirrhosis*. *Semin Liver Dis*, 2007. 27(1): p. 28-43.
482. Bowen-Pope, D.F. and R. Ross, *Platelet-derived growth factor. II. Specific binding to cultured cells*. *J Biol Chem*, 1982. 257(9): p. 5161-71.
483. Reidy, M.A., *A reassessment of endothelial injury and arterial lesion formation*. *Lab Invest*, 1985. 53(5): p. 513-20.
484. Schwartz, S.M., M.R. Reidy, and A. Clowes, *Kinetics of atherosclerosis: a stem cell model*. *Ann N Y Acad Sci*, 1985. 454: p. 292-304.
485. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis--an update*. *N Engl J Med*, 1986. 314(8): p. 488-500.
486. Majack, R.A., M.W. Majesky, and L.V. Goodman, *Role of PDGF-A expression in the control of vascular smooth muscle cell growth by transforming growth factor-beta*. *J Cell Biol*, 1990. 111(1): p. 239-47.
487. Bjorkerud, S. and G. Bondjers, *Arterial repair and atherosclerosis after mechanical injury. 2. Tissue response after induction of a total local necrosis deep longitudinal injury*. *Atherosclerosis*, 1971. 14(2): p. 259-76.
488. Bjorkerud, S. and G. Bondjers, *Arterial repair and atherosclerosis after mechanical injury. I. Permeability and light microscopic characteristics of endothelium in non-atherosclerotic and atherosclerotic lesions*. *Atherosclerosis*, 1971. 13(3): p. 355-63.
489. Stemerman, M.B. and R. Ross, *Experimental arteriosclerosis. I. Fibrous plaque formation in primates, an electron microscope study*. *J Exp Med*, 1972. 136(4): p. 769-89.
490. Spaet, T.H., et al., *Intimal injury and regrowth in the rabbit aorta; medial smooth muscle cells as a source of neointima*. *Circ Res*, 1975. 36(1): p. 58-70.
491. Schwartz, S.M., M.B. Stemerman, and E.P. Benditt, *The aortic intima. II. Repair of the aortic lining after mechanical denudation*. *Am J Pathol*, 1975. 81(1): p. 15-42.
492. Kleemann, R., S. Zadelaar, and T. Kooistra, *Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice*. *Cardiovasc Res*, 2008. 79(3): p. 360-76.
493. Kher, N. and J.D. Marsh, *Pathobiology of atherosclerosis--a brief review*. *Semin Thromb Hemost*, 2004. 30(6): p. 665-72.

494. Tegos, T.J., et al., *The genesis of atherosclerosis and risk factors: a review*. *Angiology*, 2001. 52(2): p. 89-98.
495. Ross, R., *Mechanisms of atherosclerosis--a review*. *Adv Nephrol Necker Hosp*, 1990. 19: p. 79-86.
496. Ross, R., *Platelet-derived growth factor*. *Lancet*, 1989. 1(8648): p. 1179-82.
497. Khan, R., A. Agrotis, and A. Bobik, *Understanding the role of transforming growth factor-beta1 in intimal thickening after vascular injury*. *Cardiovasc Res*, 2007. 74(2): p. 223-34.
498. Liu, J.M. and J.M. Davidson, *The elastogenic effect of recombinant transforming growth factor-beta on porcine aortic smooth muscle cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988. 154(3): p. 895-901.
499. Kahari, V.M., et al., *Transforming growth factor-beta up-regulates elastin gene expression in human skin fibroblasts. Evidence for post-transcriptional modulation*. *Lab Invest*, 1992. 66(5): p. 580-8.
500. Yamamoto, M., et al., *Increase in elastin gene expression and protein synthesis in arterial smooth muscle cells derived from patients with Moyamoya disease*. *Stroke*, 1997. 28(9): p. 1733-8.
501. Davidson, J.M., O. Zoia, and J.M. Liu, *Modulation of transforming growth factor-beta 1 stimulated elastin and collagen production and proliferation in porcine vascular smooth muscle cells and skin fibroblasts by basic fibroblast growth factor, transforming growth factor-alpha, and insulin-like growth factor-I*. *J Cell Physiol*, 1993. 155(1): p. 149-56.
502. Karnik, S.K., et al., *A critical role for elastin signaling in vascular morphogenesis and disease*. *Development*, 2003. 130(2): p. 411-23.
503. Majesky, M.W., et al., *Production of transforming growth factor beta 1 during repair of arterial injury*. *J Clin Invest*, 1991. 88(3): p. 904-10.
504. Dunning, A.M., et al., *A transforming growth factorbeta1 signal peptide variant increases secretion in vitro and is associated with increased incidence of invasive breast cancer*. *Cancer Res*, 2003. 63(10): p. 2610-5.
505. Awad, M.R., et al., *Genotypic variation in the transforming growth factor-beta1 gene: association with transforming growth factor-beta1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation*. *Transplantation*, 1998. 66(8): p. 1014-20.
506. Mohren, S. and R. Weiskirchen, *Non-synonymous gene polymorphisms in the secretory signal peptide of human TGF-beta1 affect cellular synthesis but not secretion of TGF-beta1*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. 379(4): p. 1015-20.
507. Yue, T.L., et al., *Interleukin-1 beta (IL-1 beta) induces transforming growth factor-beta, (TGF-beta 1) production by rat aortic smooth muscle cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994. 204(3): p. 1186-92.

Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Roder, C., et al., *Polymorphisms in TGFB1 and PDGFRB are associated with Moyamoya disease in European patients. Acta Neurochir (Wien).*

152(12): p. 2153-60.

Danksagung

an Herrn PD Dr. Boris Krischek für die Möglichkeit zur Durchführung meiner Dissertationsarbeit in seiner Arbeitsgruppe, die Hinleitung zu meinem Thema (verbunden mit einem einzigartigen Japanaufenthalt), sowie die gute Präsenz bei jeglichen Rückfragen oder Unklarheiten.

an Herrn Constantin Roder für die Einführung in die laborexperimentelle Arbeit und die Hilfe bei vielen anderen technischen, bürokratischen und interindividuellen Herausforderungen.

an alle Teilnehmer der Studie, ohne die diese Forschungen und damit meine Dissertation nicht möglich gewesen wären.

an Frau Nadia Khan für die wunderbare Zusammenarbeit bei unseren Forschungen.

an alle Mitarbeiter des neurochirurgischen Labors des Universitätsklinikums Tübingen und des Hertie-Instituts für klinische Hirnforschung in Tübingen, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben in Form von Ratschlägen, Erklärungen, Hilfe bei Bestellungen und vielem mehr.

an meine Freunde (und hierbei speziell an Katharina, Katrin und Vera), die zu jeder Tages- und Nachtzeit mit viel Zeit zum Zuhören und guten Ratschlägen für mich da waren.

von ganzem Herzen an meine Familie für ihre bedingungslose Liebe und Unterstützung.