

2. Material und Methoden

2.1 Patienten

Im Rahmen einer großen molekular-epidemiologischen Fall-Kontroll-Studie wurden 1000 konsekutive Patienten mit Verdacht auf eine KHK (Altersgrenzen 30-90 Jahre, Altersmedian 60,9) der Medizinischen Klinik und Poliklinik I des Universitätsklinikums Charité Campus Mitte (Direktor Prof. Dr. G. Baumann) im Zeitraum zwischen Oktober 1995 und Januar 1997 der invasiven Herzkatheterdiagnostik oder interventionellen Therapie einer Koronarsklerose zugeführt. Die Klassifizierung der KHK-Individuen wurde streng nach angiographischen Kriterien vorgenommen. Die Angiogramme wurden von erfahrenen Kardiologen beurteilt, ohne dass sie über Identität oder Anamnese der Patienten informiert gewesen wären. Als Kriterium zur Definition einer KHK wurde eine mindestens 50%ige Stenose einer großen Koronararterie oder eines anderen wichtigen Astes herangezogen. Die Schweregradeinteilung der Erkrankung richtete sich auch nach der Anzahl der betroffenen Arterien (1-, 2- oder 3-Gefäßerkrankung). Eine Myokardinfarkt-Diagnose wurde nach WHO-Kriterien und angiographischen Befunden festgelegt (Tab. 2).

Die KHK- Patienten wurden alters- und geschlechtsgematcht einer Kontrollgruppe, ebenfalls bestehend aus 1000 Patienten - Altersgrenze 33-92 Jahre, Altersmedian 60,5) gegenübergestellt. Diese Kontrollgruppe wies keine klinischen Zeichen einer KHK auf (gesichert mittels Anamnese, klinischer Untersuchung, EKG und Echokardiographie) (Tab. 2).

Patienten dieser Kontrollgruppe entstammten verschiedenen Abteilungen (u.a. aus der Urologie, Dermatologie, HNO, Innere Medizin, Chirurgie, Gynäkologie, Orthopädie, Neurologie und Poliklinik I) der Charité.

Ausgeschlossen wurden Patienten mit schweren systemischen Erkrankungen, die möglicherweise einen Einfluss auf die kardiovaskulären Risikofaktoren hätten nehmen können. Das gesamte Patientenkollektiv (KHK-Patienten und Kontrollgruppe) setzte sich aus Individuen deutscher Abstammung zusammen. Alle Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis für die Teilnahme an dieser Studie. Zur Durchführung der Studie lag das Votum der Ethikkommission des Universitätsklinikums Charite vor.

Tab. 2: Klinische Daten, der in KHK-Patienten und der Kontroll-Personen.

	Kontrollen	KHK-Patienten	Odds ratio	95%-KI	p-Wert
Patienten (n)	1000	1000	-	-	-
männlich	734 (73,4%)	746 (74,6%)	-	-	-
Weiblich	231 (23,1%)	235 (23,5%)	-	-	-
Alter < 61 J.	455	457	-	-	-
Alter > 61 J.	510	524	-	-	-
Risikofaktoren:					
Diabetes mellitus	114 (11,4%)	228 (22,8%)	2,295	1,8-2,9	<0,001
Hypertonus	359 (35,9%)	552 (55,2%)	2,2	1,8-2,6	<0,001
Hypercholesterinämie	303 (30,3%)	527 (52,7%)	2,56	2,1-3,1	<0,001
Nicotinabusus	352 (35,2%)	440 (44,0%)	1,5	1,2-1,7	<0,001
Akutes Koronarsyndrom (n=981)	-	227 (23,1%)	-	-	-
Akuter Myokardinfarkt	-	89 (9,1%)	-	-	-
Myokardinfarkt	-	651 (66,4%)	-	-	-
Komplikation 30 Tage nach Intervention (von 656 Intervenierten)	-	43 (6,6%)	-	-	-
Gefäßbeteiligung	-	293 (29,9%)	-	-	-
1-Gefäßkrankung	-				
2-Gefäßkrankung	-	360 (36,73%)	-	-	-
3-Gefäßkrankung	-	327 (33,37%)	-	-	-

2.2 DNA-Gewinnung aus Vollblut:

Genomische DNA wurde mittels einer Standard-Proteinase K-Phenol/Chloroform-Extraktion aus Leukozyten einer 3-10 ml EDTA/Venenblutmischung isoliert. Die Extraktion erfolgte manuell oder mit Hilfe eines DNA-Extraktors (Modell 341 A, Applied Biosystems, Weiterstadt). Zur weiteren Analyse wurde die gewonnene DNA in 10 mmol Tris-Puffer (pH 7,4) gelöst und anschließend bei 4°C bis zur weiteren Analyse gelagert. Diese Isolierung und Extraktion erfolgte überwiegend am Institut für klinische Pharmakologie der Medizinischen Hochschule Poznan, Polen. Durch eine Mischung von 10 ml EDTA-Vollblut mit 30 ml hypoosmolarem Lysepuffer (1,15 mol/l Ammoniumchlorid, 0,1 mol/l Kaliumhydrogencarbonat, 1 mmol/l Na₂-EDTA) und anschließender Kühlung auf Eis für 30 Minuten erfolgte eine selektive Erythrozytenlyse. Die Sedimentierung der Leukozyten erfolgte durch Zentrifugation des Gemisches für 30 Minuten bei 1200 rpm mit anschließender Resuspension der pelletierten Zellen des Überstandes in 10 ml TEN-Puffer (0,2 mol/l Tris HCl pH 7,5, 0,02 mol/l EDTA, 0,3 mol/l NaCl ad 1 Liter H₂O). Noch vorhandene Proteine wurden durch Zugabe von 100 µl Proteinase K (1-2 mg gelöst in 20 mmol/l Tris HCl, Boehringer- Mannheim, Deutschland) (Endkonzentration) inaktiviert. Das Gemisch wurde über Nacht bei 37°C auf einem Überkopf-Schüttler inkubiert, die Fällung der Proteine erfolgte mittels 5 ml Phenol 99,5% (Merck, Darmstadt, Deutschland), die Lösung der Lipide durch Hinzufügen und Mischung mit 5 ml Chloroform-Isoamylalkohol (Merck, Darmstadt, Deutschland). Die Trennung der organischen und der wässrigen Phase erfolgte durch anschließendes Zentrifugieren für 30 Minuten bei 5000 rpm. Die DNA-enhaltende wässrige Phase wurde einer weiteren Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen. Die nach diesem Extraktionsschritt erneut gewonnene wässrige Phase wurde mit einem Volumen Chloroform-Isoamylalkohol versetzt, um Phenolreste zu entfernen. Nach erneuter Zentrifugation dieses Gemisches über 15 Minuten bei 4500 rpm wurde dem wässrigen Überstand 1/10 Volumen 2 M Natriumacetat und 2 Volumen eiskaltes Ethanol 99,5% (Merck, Darmstadt, Deutschland) p.A. zur Präzipitation der DNA hinzu gegeben; die Lösung wurde vorsichtig geschwenkt, ein sichtbarer DNA-Faden entstand. Er wurde herausgehoben und zum Waschen in 70% Ethanol getaucht. Die Resuspension der DNA erfolgte mit 0,25-1 ml 10 mM Tris/HCL-Puffer (Trishydroxymethylaminomethan HCL, Merck, Darmstadt, Deutschland, pH 8) über Nacht bei 37°C auf dem Überkopf-Schüttler. Die DNA wurde bei 4°C aufbewahrt.

2.3 Genotypisierung

Die Amplifikation des 373-bp-Fragmentes fand mittels PCR in einem 26 µl-Ansatz statt. Eingesetzt wurde 1 µl DNA. Zur Hybridisierung der DNA wurden jeweils 0,5 µl der Oligonucleotid-5'-Primer 1B1-1 (10 µM) und des 3'-Primer 1B1-2 (10 µM) (TIB Molbiol, Berlin, Deutschland) verwendet (Tab. 3). Des weiteren wurden 2,5 µl 2 mM dNTPs (Desoxynucleosid-Triphosphate, MBI Fermentas, Vilnius, Litauen) und 0,1 µl Taq-Polymerase (Perkin Elmer, Weiterstadt, Deutschland) bzw. oder 0,1 µl Taq-Polymerase (GIBCO BRL) sowie 2,5 µl 10x-Reaktionspuffer Puffer (Perkin Elmer bzw. GIBCO BRL), 1,0 µl 50 mM MgCl₂ (Perkin Elmer) und 17,9 µl H₂O addiert. Nach der DNA-Denaturierung bei 95 °C über 2 Minuten erfolgte die Hybridisierung bei 94°C über 0,5 Minuten, 0,5 Minuten bei 63°C, 0,5 Minuten bei 72°C. Die terminale Elongation erfolgte bei 72°C über 7 Minuten. Die 35 Zyklen umfassende PCR wurde mittels der Thermocycler Perkin Elmer 9600 oder 9700 durchgeführt. Bei allen Versuchsansätzen wurde eine Negativprobe (PCR-Ansatz ohne DNA) hinzugefügt, um eine eventuell falsch positive Amplifikation, z.B. durch DNA-Kontamination, erkennen zu können. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden bei 4°C aufbewahrt.

Tab. 3. Oligonucleotid-Primer zur Amplifikation eines 373-bp Fragments von CYP1B1

Primer	Bindungsposition	Nukleotidsequenz
1B1-1	7966-7984	5`- AAC CTG CCC TAT GTC CTG G
1B1-2	8321-8338	3`- CAG GCT CAT TTG GGT TGG

2.4. Gelelektrophorese und Fotodokumentation des 373 bp-Produktes

Die DNA- Amplifikation wurde mit Hilfe der Gelelektrophorese nachgewiesen. Es wurde ein 2,0%- Agarosegel verwendet (Life Technologies, Paisley, Schottland) in 100 ml 1x TBE-Puffer 15 g FICOLL 400 Pharmacia, Uppsala, Schweden, 0,25 g Bromphenolblau, 1x TBE) In die äußeren Geltaschen wurde jeweils der DNA-Größen-Standard V (1:10 , Basenpaarspektrum 8 bp- 587 bp, Boehringer-Mannheim, Deutschland) mit einem genau definierten Basenpaarspektrum (8 bp- 587 bp) aufgetragen. Die Elektrophoresezeit betrug bei 100 V 15 Minuten (Elektrophoresekammer mit einem Elektrodenabstand von 14 cm, Biorad; Spannungsgerät Renner 500/500). Zur Auswertung der PCR-Produkte wurde das Gel mit einer Wellenlänge von 300 nm auf einem Transilluminator bestrahlt und mit einer Videokamera (Eagle-Eye, Stratagene) fotografiert. Anschließend wurden die Aufnahmen ausgewertet, die Negativproben und die Proben auf Anwesenheit der 373 bp- Bande kontrolliert.

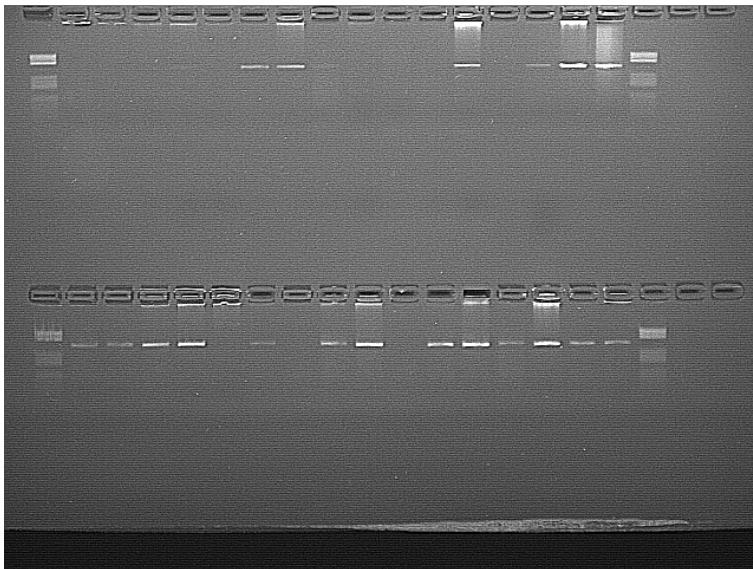


Abb.1: 2,0%-Agarose-Elektrophorese der 373-bp-Bande des CYP1B1-Gen. Die Visualisierung erfolgte mittels 1 mg/l Ethidiumbromid.

Die Restriktionsendonuclease *BsrI* (New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland) entstammt *Bacillus stearothermophilus* und spaltet doppelsträngige DNA bei der Sequenz 5'...ACTGGN'...3' und 3'...TGAC'CN...5'. Mittels 0,5 µl Restriktionsendonuclease *BsrI* wurden jeweils 12,5 µl der erfolgreich amplifizierten

DNA-Fragmente mit den zusätzlichen Reagenzien 2,5 µl NEB 3 – Puffer (New England Biolabs, USA) und 9,5 µl H₂O verdaut. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 65°C. Die Auswertung erfolgte mit einem 3,5% NuSieve 3:1 Agarosegel mit Agarose von Bioproducts, Rockland Maine, USA. 25 µl des Verdauansatzes wurden zusammen mit 7 µl des Probenauftragspuffers in eine Geltasche übertragen. Zum Vergleich der Basenpaarlängen wurde wieder der DNA-Größen-Standard V verwendet. Die Elektrophorese erfolgte über 75 Minuten bei 100 Volt.

Alle Chemikalien waren pro Analyse oder von höchstem kommerziellen Reinheitsgrad. Ein homozygoter Genotyp C/C lag vor, wenn nur zwei Schnittstellen, nämlich an Position 8106 und 8304 vorlagen. Somit entstanden drei Fragmente mit der jeweiligen Länge von 198 bp, 141 bp und 34 bp. Lag ein homozygoter Genotyp G/G vor, ergaben sich drei Schnittpositionen, nämlich an Nucleotid 8106, 8128 und an 8304. Es entstehen Fragmente der Länge 176 bp, 141 bp, 34 bp und 22 bp. Bei einem heterozygoten Genotyp C/G ließen sich alle fünf Fragmente in Form von Banden erkennen (Abb. 2). Auch hier wurde bei allen Ansätzen eine Negativprobe (Verdau-Ansatz ohne DNA) mitgeführt.

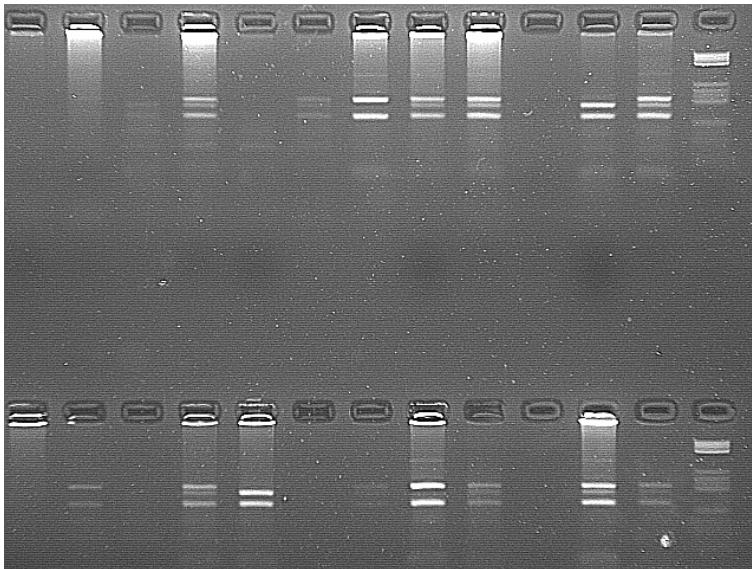


Abb.2: PCR/RFLP des CYP1B1*3-Polymorphismus mittels BsrI. M=Standard. Lane 1 Wildtyp (*1/*1), heterozygoter Genotyp (*1/*3), homozygote Variante.

2.5. Statistische Methoden

Die Zuordnung in der vorliegenden nichtgepaarten Fall-Kontroll-Studie erfolgte nur nach Alter und Geschlecht. Beide Gruppen wurden auf Homogenität getestet. Die Verteilung der Genotypenhäufigkeit der Haupt- und Untergruppen wurde anhand der Allelhäufigkeiten nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz untersucht. Unterschiede klinischer Parameter innerhalb der Genotypen der KHK- und Kontrollgruppen wurden mittels Mann-Whitney-U-Test verglichen.

Genotyphäufigkeiten wurden als Odds ratio ausgedrückt und es wurden 95%-Konfidenzintervalle berechnet. Eine Untersuchung der Genotypenhäufigkeit auf signifikante Unterschiede innerhalb der Untergruppen der KHK- mit der Vergleichsgruppe fand mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson statt. Der Einfluss der Genotypen im Zusammenhang mit bestimmten Risikofaktoren auf die Entwicklung einer KHK wurde mit Hilfe der Logistischen Regression untersucht. Verwendet wurde das Programm SPSS 10.0.