

Aus der Klinik für Innere Medizin mit dem Schwerpunkt Kardiologie
und Angiologie (CCM)
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss des CYP 2C9-Genotyps auf die Endothelfunktion und
auf kardiovaskuläre Erkrankungen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Vanessa Witzel

aus Frankfurt am Main

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. K. Stangl

2. Prof. Dr. med. J. Fröhlich

3. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. I. Cascorbi

Datum der Promotion: 09.05.2007

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG	1
1. VASKULÄRE HOMÖOSTASE.....	1
1.1. <i>NO-</i> und <i>PGI₂</i> -abhängige Vasodilatation.....	1
1.2. <i>NO-</i> und <i>PGI₂</i> -unabhängige Vasodilatation.....	2
2. CYTOCHROM P450 ENZYME	4
3. CYTOCHROM P450-ABHÄNGIGER ARACHIDONSÄUREMETABOLISMUS	5
3.1. <i>Synthese von Epoxyeicosatriensäuren (EETs)</i>	6
3.2. <i>Abbau von Epoxyeicosatriensäuren (EETs)</i>	6
4. FUNKTIONEN DER EPOXYEICOSATRIENSÄUREN (EETs)	7
4.1. <i>Vasodilatation</i>	7
4.2. <i>Antiinflammatorische Wirkung</i>	9
4.3. <i>Fibrinolytische Wirkung und Hemmung der Thrombozytenadhäsion</i>	9
4.4. <i>Hemmung der Migration von Gefäßmuskelzellen</i>	10
4.5. <i>Bildung von Sauerstoffradikalen</i>	10
4.6. <i>Kardiodepressive Wirkung</i>	11
5. CYTOCHROME P450 2C9, 2C8 UND 2J2	11
5.1. <i>CYP 2C9</i>	11
5.2. <i>CYP 2C8</i>	14
5.3. <i>Linkage zwischen CYP 2C9 und CYP 2C8</i>	15
5.4. <i>CYP 2J2</i>	15
6. CYP 2C9*2 UND 2C9*3 POLYMORPHISMEN UND KARDIOVASKULÄRE ERANKUNGEN	16
6.1. <i>Endotheliale Dysfunktion</i>	16
6.2. <i>Koronare Herzerkrankung</i>	17
6.3. <i>Arterielle Hypertonie</i>	17
6.4. <i>Arzneimittelinteraktionen kardiovaskulärer Medikamente</i>	18
7. ZIEL DER STUDIE	19
II. MATERIAL UND METHODEN	20
1. PROBANDEN	20
2. ENDOTHELFUNKTIONSMESSUNG	21

2.1. Prinzip der Venenverschlussplethysmographie	21
2.2. Messung des Blutflusses mittels Venenverschlussplethysmographie.....	21
3. GENOTYPISIERUNG DER CYP 2C9*2 UND 2C9*3 POLYMORPHISMEN	24
3.1. Probengewinnung	24
3.2. DNA-Extraktion	24
3.3. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	25
3.4. Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP)	27
3.5. Bestimmung des CYP 2C9 Genotyps	28
4. STATISTIK.....	29
III. ERGEBNISSE.....	30
1. CYP 2C9*2 UND 2C9*3 POLYMORPHISMEN.....	30
1.1. CYP 2C9*2 und 2C9*3 Genotypverteilung.....	30
1.2. Verteilung wichtiger Einflussfaktoren in den Genotypgruppen	31
2. CYP 2C9*2 UND 2C9*3 POLYMORPHISMEN UND ENDOTHELFUNKTION.....	33
2.1. Einfluss der CYP 2C9*2 und CYP 2C9*3 Polymorphismen auf die Endothelfunktion bei gesunden Probanden	33
2.2. Einfluss der CYP 2C9*2 und CYP 2C9*3 Polymorphismen auf die Endothelfunktion bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen	35
2.3. Geschlechtsspezifische Analyse der Endothelfunktion	38
3. CYP 2C9*2 UND 2C9*3 POLYMORPHISMEN UND KARDIOVASKULÄRE ERKRANKUNGEN...	39
3.1. CYP 2C9*2 und 2C9*3 Polymorphismen und koronare Herzerkrankung.....	39
3.2. CYP 2C9*2 und 2C9*3 Polymorphismen und Herzinsuffizienz	40
3.3. CYP 2C9*2 und 2C9*3 Polymorphismen und arterielle Hypertonie	43
4. SUBGRUPPENANALYSEN: KORONARE HERZERKRANKUNG.....	44
5. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	45
IV. DISKUSSION	47
1. CYP 2C9*2 UND 2C9*3 POLYMORPHISMEN UND ENDOTHELFUNKTION.....	47
1.1. Methode.....	47
1.2. Ergebnisse der Endothelfunktionsmessung bei gesunden Probanden	48
1.3. Ergebnisse der Endothelfunktionsmessung bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen.....	49

1.4. <i>Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Endothelfunktion</i>	52
2. CYP 2C9*2 UND 2C9*3 POLYMORPHISMEN UND KARDIOVASKULÄRE ERKRANKUNGEN ...	54
2.1. <i>Koronare Herzerkrankung</i>	54
2.2. <i>Herzinsuffizienz</i>	55
2.3. <i>Arterielle Hypertonie</i>	56
V. ZUSAMMENFASSUNG	57
VI. ANHANG	59
1. LITERATURVERZEICHNIS	59
2. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	71
3. CURRICULUM VITAE	73
4. DANKSAGUNG	75
5. ERKLÄRUNG	76

V. Zusammenfassung

Die stickstoffoxid (NO)- und prostacyclinunabhängige Vasodilatation wird durch einen endothelialen Hyperpolarisierenden Faktor (EDHF) und mit der Aktivierung von Cytochrom (CYP) P450 Epoxygenasen, die in Endothelzellen exprimiert werden, in Verbindung gebracht. Cytochrom P450 Epoxygenasen synthetisieren aus Arachidonsäure Epoxyeicosatriensäuren (EET), die auf das Gefäßendothel vasodilatierend wirken und als ein wahrscheinlicher EDHF diskutiert werden. EETs haben neben einer vasodilatorischen eine antiinflammatorische und eine fibrinolytische Wirkung.

Insbesondere die Cytochrome der Familie CYP 2C scheinen als endotheliale CYP-Epoxygenasen von besonderer Bedeutung zu sein. Polymorphismen dieser CYP Enzyme gehen mit einer unterschiedlich stark ausgeprägten Reduktion der Enzymaktivität einher. Die funktionelle Bedeutung dieser Polymorphismen wurde bisher nicht geklärt. Die Ergebnisse mehrerer Studien weisen jedoch auf einen Einfluss des CYP 2C9-Genotyps auf die Endothelfunktion und auf die Entwicklung einer KHK sowie eines arteriellen Hypertonus hin.

In dieser Studie wurde der mögliche Einfluss des CYP 2C9-Genotyps auf die Endothelfunktion und auf kardiovaskuläre Erkrankungen untersucht. Bei 284 gesunden, männlichen Probanden und bei 527 Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen wurde der CYP 2C9-Genotyp und die Endothelfunktion mittels Venenverschußplethysmographie bestimmt sowie Daten zu kardiovaskulären Erkrankungen, deren Schweregrad und deren Risikofaktoren erfasst.

Die EET-vermittelte Vasodilatation gilt als ein Backup-System, welches erst bei endothelialer Dysfunktion (Reduktion der NO-Bioverfügbarkeit) zum Tragen kommt. Damit übereinstimmend fand sich bei den jungen, gesunden Probanden eine allenfalls tendentiell schlechtere Endothelfunktion der Träger der CYP 2C9 Polymorphismen. Bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen zeigte sich ein signifikant niedriger Ruheblutfluß ($p=0,013$) beim CYP 2C9*2/*3 Genotyps als bei Trägern von CYP 2C9*1/*1 (Wildtyp). Bei Frauen besteht eine geringere endothelabhängige Vasodilatation bei Trägern des CYP 2C9*1/*2 oder *2/*3

Genotyps mit grenzwertiger Signifikanz ($p=0,051$). Zwischen dem CYP 2C9 Phänotyp und der Endothelfunktion ließ sich weder für die jungen, gesunden Probanden noch für die Probanden mit kardiovaskulären Erkrankungen ein Zusammenhang finden.

In experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass die Bedeutung der EDHF-vermittelten Vasodilatation positiv mit dem Östrogenspiegel korreliert ist. Tatsächlich fand sich bei Frauen ein größerer Einfluss der CYP 2C9 Polymorphismen als bei Männern, welcher sich auch tendenziell auch stärker bei prämenopausalen als bei postmenopausalen Frauen zeigte.

Träger der CYP 2C9*2 Variante (Genotyp *1/*2 oder *2/*3) erkrankten hochsignifikant ($p= 0,001$) häufiger an einer Herzinsuffizienz als Träger des CYP 2C9-Wildtyps. Im Zusammenhang mit einer KHK scheint der CYP 2C9*2/*2 Genotyp ein Risikofaktor für eine Herzinsuffizienz darzustellen.

Die CYP 2C9*2-Homozygoten erkrankten grenzwertig signifikant ($p=0,038$) häufiger an einer arteriellen Hypertonie als Träger des CYP 2C9-Wildtyps, was sich jedoch in der multivariaten Analyse nicht bestätigte.

In dieser Studie scheint die funktionelle Bedeutung von CYP 2C9*2 größer zu sein als diese von CYP 2C9*3, was an der Kopplung von CYP 2C9*2 und der gering aktiven CYP 2C8*3 liegen mag. Insgesamt fand sich ein möglicher Zusammenhang zwischen dem CYP 2C9 Genotyp und der Endothelfunktion sowie dem Auftreten einer Herzinsuffizienz, welcher sich jedoch in der phänotypischen Betrachtung nicht bestätigte.

2. Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
ACE	Angiotensin converting enzyme
ACh	Acetylcholin
AS	Aminosäure
ASS	Acetylsalizylsäure
AT ₁	Angiotensinrezeptor 1
BK	Bradykinin
BMI	Body-Mass-Index
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
COX	Cyclooxygenase
CSE-Hemmer	Cholesterin-Synthese-Enzym-Hemmer
CYP	Cytochrom P450
DCMP	Dilatative Kardiomyopathie
DHET	Dihydroxyeicosatriensäuren
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDHF	Endothelium derived hyperpolarizing factor
EDRF	Endothelium derived relaxing factor
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EET	Epoxyeicosatriensäure
EF	Ejektionsfraktion
EM	extensive metabolizer
GTN	Glyceroltrinitrat
HETE	Hydroxyeicosatetraensäuren
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IM	intermediate metabolizer
kb	Kilo base (= 1000 Basenpaare)
KHK	Koronare Herzkrankheit
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
LA	Linolensäure
LDL	Low density lipoproteine

LVEDD	Linksventrikulärer enddiastolischer Diameter
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenosin-Dinucleotid-Phosphat
Na-K-ATPase	Natrium-Kalium-ATPase
NF-κB	Nukleärer Transkriptionsfaktor kappa B
NO	Sickstoffmonoxid
NSAID	Nicht-Steroidale Antiphlogistika
PAI-1	Plasminogenaktivator-Inhibitor-1
PAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PGI ₂	Prostacyclin
PKA	Proteinkinase A
PL	Phospholipide
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PM	poor metabolizer
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RH	Reaktive Hyperämie
RR	Riva-rocci
sEH	Lösliche Epoxyhydrolasen
SHR	Spontanisch hypertensive rats
SNP	Single nucleotide polymorphismus
SRS	Substrate recognition site
TNF-α	Tumornekrosefaktor alpha
t-PA	Gewebsplasminogen-Aktivator
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
V _{max}	Maximale Metabolisierungsrate

3. Curriculum vitae

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

4. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Professor Karl Stangl für die Überlassung des Dissertationsthemas und die besondere Unterstützung bei der Durchführung und Vollendung meiner Arbeit. Herr Stangl stand mir jederzeit mit Rat und Tat zu Seite und hat mich, weit über das übliche Maß hinaus, motiviert, betreut und beraten.

Ich möchte auch meiner Arbeitsgruppe und insbesondere Herrn PD Dr. med. Michael Laule, Herr Wasiem Sanad, Frau Konstanze Jung und Herrn Salim Martin für die gute und vertrauensvolle Zusammenarbeit danken. Frau Dr. Karla Köpke und Herrn Dr. Uwe Malzahn danke ich für die Unterstützung in statistischen Fragestellungen.

Für die Geduld sowie die immaterielle und materielle Unterstützung während der Dissertation danke ich in besonderer Weise meinem Eltern und meinen Geschwistern Caroline und David sowie Philippe Raab.

5. Erklärung

Ich, Vanessa Witzel erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Einfluss des CYP 2C9-Genotyps auf die Endothelfunktion und auf kardiovaskuläre Erkrankungen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

30.01.07

Vanessa Witzel