

II. Material und Methoden

1. Probanden

Die Untersuchungen erfolgten an 284 gesunden Probanden sowie an 527 Probanden mit kardiovaskulären Erkrankungen (im folgenden Patienten genannt). Die Probanden waren Männer im Alter 18-35 Jahren, im Mittel 26 Jahre (Median 26 Jahre) alt. Voraussetzungen des Studieneinschlusses waren neben dem schriftlichen Einverständnis, eine deutsche Abstammung sowie das Fehlen einer Vorerkrankung. Neben der Anamnese mussten ein Basislabor (Blutbild, Lipidstatus, Blutzucker) sowie eine körperliche Untersuchung unauffällig gewesen sein. Die Probanden waren ausschließlich Nichtraucher. Das Gewicht lag im Mittel bei 76 kg (Median 75 kg) bei einer Körpergröße vom 182,4 cm (Median 182 cm). Der Blutdruck (zum Zeitpunkt der Endothelfunktionsmessung) lag im Mittel bei 117/77 mmHg (Median 120/80 mmHg).

Die 527 in die Studie eingeschlossenen Patienten waren im Mittel 60 Jahre (Median 62 Jahre) alt. Der jüngste in die Untersuchung eingeschlossene Patient war 18 Jahre und der älteste 89 Jahre alt. Der Anteil an männlichen Patienten betrug 70,2 %, der weiblichen 29,8 %. Voraussetzung für den Einschluss war neben dem schriftlichen Einverständnis der Teilnahme eine stationäre Behandlung auf einer kardiologischen Station der Medizinischen Klinik für Kardiologie, Angiologie und Pneumologie der Charité - Campus Mitte. Es wurden Daten zu Diagnosen, deren Schweregrad, zu Vorerkrankungen und zur Medikation erfasst.

Eine wichtige Subgruppe stellen die Patienten mit einer koronaren Herzerkrankung dar. Im Kollektiv fanden sich 336 Patienten mit einer koronaren Herzerkrankung (Diagnose einer koronaren Ein- bis Dreifäßerkrankung im Herzkatheter oder bekannte Diagnose einer Herzkatheterintervention (PTCA) bzw. einer Bypassoperation aus der Krankenakte). Das mittlere Alter dieser Patienten betrug 64 Jahre (Median 65 Jahre), der Anteil an Männern 75,4% (Frauen 24,6%). In der Tabelle 2.1.1. findet sich eine Übersicht der kardiovaskulären Risikofaktoren dieser Subgruppe.

Arterielle Hypertonie	69,9%
Nikotinkonsum (aktuell)	13,9%
Nikotinkonsum (früher)	56,9%
Hypercholesterinämie	75,4%
Diabetes mellitus	24,6%
Familienanamnese einer KHK	51,7%
Alter	64 Jahre
BMI	27,2 kg KG/cm ²
Adipositas (BMI>30)	22,3%

Tabelle 2.1.1: Übersicht des kardiovaskulären Risikoprofils in der Subgruppe der KHK-Patienten.

2. Endothelfunktionsmessung

2.1. Prinzip der Venenverschlussplethysmographie

Die Venenverschlussplethysmographie stellt ein anerkanntes Verfahren zur nichtinvasiven Messung des Blutflusses dar. Mit Hilfe einer am Oberarm angebrachten aufblasbaren Manschette wird vorübergehend der venöse Abstrom ohne Beeinträchtigung des arteriellen Einstroms durch subdiastolische Drücke der Manschette unterbrochen. Die Volumenzunahme am Unterarm wird distal der Manschette mit einem Dehnungsstreifen erfasst und mittels Schreiber als Zeit-Volumen-Kurve abgebildet.

2.2. Messung des Blutflusses mittels Venenverschlussplethysmographie

Der Unterarm-Blutfluss Probanden wurde mittels Venenverschlussplethysmographie an Plethysmographen nach Gutmann (Periquant 815 und Compactus 700) gemessen. Es wurde der Ruheblutfluss, die endothelunabhängige Vasodilatation als Blutfluss nach einer Gabe von Glyceroltrinitrat (GTN) und die endothelabhängige Vasodilatation als den Blutfluss bei postischämischer, reaktiver Hyperämie bestimmt. Dazu wurde eine aufblasbare Manschette in der Mitte des Oberarmes angelegt. Ein Dehnungsstreifen, der Änderungen des Unterarmumfangs während der Messung erfasst, wurde an der Stelle des größten Unterarmumfangs angelegt. Eine weitere aufblasbare Manschette wurde am Handgelenk angelegt.

Die Messung der Probanden fand in einem ruhigen Raum mit konstanter Raumtemperatur von $21\pm 1^\circ\text{C}$ und nach einer mindestens fünfzehnminütigen Ruhephase im Liegen statt. Wir untersuchten nach Möglichkeit immer den dominanten Arm, der so gelagert wurde, daß der Arm frei und das Handgelenk über Vorhofniveau lag.

Für jede Messphase (Ruheblutfluss, Blutfluss nach GTN-Gabe und Blutfluss nach Ischämie) wurde mindestens 30 Sekunden vor Beginn der Messung die Manschette am Handgelenk auf 200 mmHg, bzw. mind. 50 mmHg über dem systolischen arteriellen Blutdruck des Untersuchten aufgepumpt, um die Durchblutung der Hand von der Messung auszuschließen.

Vor jeder Einzelmessung wurde die Oberarmmanschette auf 50 mmHg aufgepumpt, um den venösen Rückstrom zu unterbinden. Danach wurde die Volumenzunahme des Unterarmes anhand des Dehnungstreifens erfasst und auf einer Zeit-Volumen-Kurve wiedergegeben. Der Blutfluss wurde in ml/100 ml Gewebe/min angegeben und errechnete sich aus der Geschwindigkeit der Volumensteigerung in der Anfangsphase des arteriellen Einstroms ($\Delta V/\Delta t$). Der Blutdruck der Patienten und Probanden wurde direkt nach jeder der drei Messphasen erfasst.

2.2.1 Ruheblutfluss

Die Messung erfolgte im Minutentakt (5 Sekunden Messung, 55 Sekunden Pause) mit mindestens drei Einzelmessungen. Der Ruheblutfluss stellt den Mittelwert dieser Messungen dar.

2.2.2 Endothelunabhängige Vasodilatation

Nach der Gabe von Glyceroltrinitrat (2 Hübe „Nitrosublingual“ Pumpspray; 1 Hub zu 48 mg entspricht 0,4 mg GTN) erfolgte nach einer Minute Wirkzeit die Messung im Minutentakt über sechs Minuten. Der maximale Blutfluss nach Gabe von Nitroglycerin wird mit dem höchsten Wert einer Einzelmessung aus dieser Messreihe gleichgesetzt.

Messphase	Zeitpunkt der Messung	Bemerkung
Ruheblutfluss	- 30 s	Manschette am Handgelenk: mind. 50 mmHg >RR _{Syst}
	0	Beginn der Messung , Oberarmmanschette: 50 mmHg
	5 s	Messung (Aufzeichnung als Zeit-Volumen-Kurve)
	55 s	Pause, danach erneute Messung
Blutfluss nach Gabe von Nitroglycerin (Endothelunabhängige Vasodilatation)	- 60 s	Gabe von Nitroglycerin
	- 30 s	Manschette am Handgelenk: mind. 50 mmHg >RR _{Syst}
	0	Beginn der Messung , weiterer Ablauf siehe Messung des Ruheblutflusses
Reaktive Hyperämie (Endothelabhängige Vasodilatation)	- 5 Min	Oberarmmanschette: 200mmHg bzw. mind. 50mmHG>RR _{Syst}
	- 30 s	Manschette am Handgelenk: 50 mmHg>RR _{Syst}
	- 5 s	Oberarmmanschette wird abgelassen
	0	Beginn der Messung , Oberarmmanschette: 50 mmHg
	5 s	Pause, danach alle 5 s Messungen (insg: 5 Mal)

Tabelle 2.2.1: Übersicht der Messphasen der Endothelfunktionsmessung mittels Venenverschlussplethysmographie.

2.2.3 Endothelabhängige Vasodilatation

Nach einer Ruhephase von 15 Minuten erfolgte die Bestimmung der vaskulären Reserve (Reaktive Hyperämie). Dazu wurde die Oberarmmanschette über fünf Minuten auf einen Druck von 200 mmHg, bzw. mind. 50 mmHg über dem systolischen arteriellen Blutdruck des Untersuchten aufgepumpt, und bei Messbeginn wieder abgelassen. Es folgten fünf unmittelbar aufeinander folgende Messungen, die vom Gerät automatisiert abgelaufen sind. Jede von ihnen betrug 5 Sekunden,

getrennt von der Folgenden durch eine 5 Sekunden dauernde Pause. In dieser erfolgt der venöse Ausfluss bzw. Rückfluss zum Herzen. Die vaskuläre Reserve, also der maximale, postischämische Blutfluss entspricht dem höchsten gemessenen Wert in der Reihe der 5 Einzelmessungen.

3. Genotypisierung der CYP 2C9*2 und 2C9*3 Polymorphismen

3.1. Probengewinnung

Nach Aufklärung und der schriftlichen Einverständniserklärung der Patienten bzw. Probanden erfolgte die Entnahme von 10 ml Blut aus der Kubitalvene mit Hilfe einer EDTA-Monovette (EDTA = Äthylendiamintetraessigsäure). Nach Beschriftung der Monovetten erfolgte die Lagerung bei einer Temperatur von -85°C.

3.2. DNA-Extraktion

Die Extraktion und Reinigung der DNA aus den von Patienten bzw. Probanden gewonnenen Vollblutproben erfolgte mit dem MagNA Pure LC Instrument (Roche) und dem MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I (Roche). Nach dem Setup und dem Starten des Protokolls erfolgt die DNA-Extraktion automatisch nach dem Prinzip der Festphasenextraktion.

3.2.1 Das Prinzip der Festphasenextraktion

1. Dem Vollblut wird der Lysis/Binding-Puffer zugesetzt. Dadurch werden die Zellen lysiert, die Proteine denaturiert und die DNA freigesetzt.
2. Die Proteinase K wird dazugegeben, um die zellulären Proteine aufzuspalten.
3. Die DNA wird an spezielle magnetische Glaspartikel (MGPs) gebunden. Voraussetzung für die Bindung der DNA an die mit Siliziumoxid beschichteten Magnetpartikel sind die chaotropische Salze enthaltende Lysis/Bindung-Puffer.
4. Durch ein Waschpuffer 1 werden ungebundene Substanzen wie Proteine und Zellmembranen sowie PCR-Hemmstoffe wie Heparin oder Hämoglobin entfernt.
5. Ein Waschpuffer 2 entfernt Verunreinigungen und reduziert die Salzkonzentration.
6. Die gelöste DNA liegt bei erhöhter Temperatur zur weiteren Bearbeitung vor.

3.2.2 Durchführung der DNA-Extraktion

Zur Vorbereitung der DNA-Extraktion wird die im MagNA Pure Isolation Kit I enthaltene Proteinase K in Lösung gebracht. Es müssen alle notwendigen

Reagenzien (Waschpuffer I und II, Lysis/Binding-Puffer, Proteinase K, MGP-Suspension, Elution-Puffer) und 200µl Vollblutprobe in das MagNA Pure LC Instrument eingebracht werden. Die Extraktion kann gestartet werden. Nach etwa 90 Minuten steht die isolierte DNA in einer Lösung von 100µl zur weiteren Bearbeitung zur Verfügung.

Nach der Extraktion wird die DNA-Konzentration mittels UV-Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch gemessen. Die Protein-Konzentration wird bei 280 nm gemessen. Der Quotient 260 nm/280 nm soll zwischen 1,8 und 2 liegen. Die DNA-Konzentration wird mit destilliertem Wasser auf 30 µg/ml eingestellt.

3.3. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion wurde Mitte der achtziger Jahre entwickelt und gehört seither zu einer der wichtigsten Methoden der Molekulargenetik. Sie ermöglicht die Amplifizierung unterschiedlich großer, spezifischer Nukleinsäurefragmente mit einer hohen Anzahl von Kopien. Das Ausgangsmaterial für die PCR ist die genomische DNA, die die gewünschte Sequenz enthält (i.d.R. das Gesamtgenom). Diese muss nicht sequenziert werden, da die Primer spezifisch das zu amplifizierende DNA-Fragment einschließen. Bei den Primern handelt es sich um synthetische Oligonukleotide von 15 – 25 Basenpaaren Länge, die zu den Sequenzen beiderseits des DNA-Abschnittes, der amplifiziert werden soll, komplementär sind.

CYP	Primer	Sequenz	Richtung
2C9*2	2CL1	5´-CACTGGCTGAAAGAGCTAACAGAG	Forward
2C9*2	2CR1	5´-GTGATATGGAGTAGGGTCACCCAC	Reverse
2C9*3	C5	5´-AGGAAGAGATTGAACGTGTGA	Forward
2C9*3	6A	5´- TGCATGGGGCAGGCTGGTGGGGAGAAGGTCAA	Reverse

Tabelle 2.3.1: Übersicht der verwendeten spezifischen Primer.

Die Durchführung der PCR erfolgte mit einem vollautomatischen Thermocycler (Perkin-Elmer 9700 oder 9600 Cycler). Je Probe wurden 1 µl genomische DNA und 25 µl PCR-Mastermix (siehe Tabelle 2.3.2), bestehend aus

Desoxyribonukleosidtriphosphaten, hitzestabilen DNA-Polymerasen (sog. Taq-Polymerase), Puffer, Magnesiumchlorid und den spezifischen Primern, verwendet. Die DNA wurde bei einer Temperatur von 94°C zu Einzelsträngen denaturiert. Die nun vorliegenden Einzelstränge können als Matrize für die Synthese eines neuen komplementären Stranges dienen. In der folgenden Phase wurde die Temperatur auf 62°C reduziert. Jetzt können die Oligonukleotidprimer an die Einzelstränge binden (engl. *anneal*). Dann wurde die Temperatur auf 72°C erhöht. Das ist die optimale Temperatur für die Taq-Polymerase, eine hitzestabile DNA-Polymerase, die von dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* stammt. Im nächsten Schritt wurde die Temperatur wieder auf 94°C erhöht, die neu synthetisierten Doppelstränge werden getrennt und der Zyklus von *Denaturierung*, *Annealing* und *Elongation* beginnt von neuem. Es erfolgen 35 Zyklen (siehe Tabelle 2.3.3), wonach theoretisch 2^{35} Kopien der gewünschten Sequenz vorliegen. Nach Ablauf des letzten Zyklus fand die sog. terminale Elongation bei 72°C statt, um den vollständigen Verbrauch der Reagentien zu gewährleisten.

PCR Mastermix: CYP 2C9*2	PCR Mastermix: CYP 2C9*3
10x Gene Craft Puffer: 2,5 µl	10x Gene Craft Puffer: 2,0 µl
MgCl ₂ (50 mM): 0,6 µl	MgCl ₂ (50 mM): 0,6 µl
dNTPs (2mM): 2,5 µl	dNTPs (2mM): 2,0 µl
H ₂ O (steril, bidest.): 18,25 µl	H ₂ O (steril, bidest.): 14,25 µl
Primer 2CL1 (10 µM): 0,5 µl	Primer 2CL1 (10 µM): 0,5 µl
Primer 2CR1 (10 µM): 0,5 µl	Primer 2CR1 (10 µM): 0,5 µl
AmpliTaq Polymerase (Biotherm): 0,15	AmpliTaq Polymerase (Biotherm): 0,15

Tabelle 2.3.2: PCR-Mastermix für CYP 2C9*2 und 2C9*3.

Phase	Temperatur (°C)	Dauer	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	94	2 min	1
Annealing	62	10 sec	35
Elongation	72	1 min	35
Denaturierung	94	30 sec	35
Terminale Elongation	72	7 min	1

Tabelle 2.3.3: Übersicht der PCR mittels Thermocycler.

Zur Kontrolle des PCR-ergebnisses erfolgte eine Elektrophorese mit je 10 µl des Amplifikates und mit 10 µl Bromphenolblaupuffer als Farbmarker. Die Elektrophorese erfolgte auf einem 2,5%igen Agarosegel bei 120 Volt über 40 min (Protrans-Kammer). In Abhängigkeit der Länge des PCR-Produktes wandern diese aufgrund ihrer negativen Ladung unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes durch das Agarosegel. Die Laufgeschwindigkeit verhält sich umgekehrt proportional zum Logarithmus der Länge des Amplifikates. Das Ergebnis der Elektrophorese wurde mit dem Bildverarbeitungssystem Stratagene Eagle Eye durch UV-Wellen visualisiert und dokumentiert. Die Probe wurde als positiv gewertet, wenn im Falle von CYP 2C9*2 eine 372 bp-Bande und im Falle von CYP 2C9*3 eine 137 bp-Bande vorgelegen hat.

Polymorphismus	PCR-Primer	Fragmentlänge	Restriktionsenzym
*2 (Arg>144/Cys)	2CL1/2CR1	372	Cfr 13 I
*3 (Ile>359/Leu)	C5/6A	137	Sty I

Tabelle 2.3.4: Übersicht der PCR-RFLP-Analyse der CYP 2C9 Polymorphismen.

3.4. Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP)

Die amplifizierten DNA-Sequenzen, die in der Elektrophorese eine 372 bp-Bande bzw. eine 137 bp-Bande aufwiesen, wurden durch die Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus-Analyse weiter untersucht. Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die die DNA sequenzspezifisch schneiden und somit DNA-Fragmente ähnlicher Länge produzeiren. Bei einem Abweichen der Nucleotid-Sequenz kann es zu veränderten Schnittstellen kommen, so dass unterschiedliche Fragmentlängen daraus resultieren. Dies wird als Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus bezeichnet.

3.4.1. RLFP-Analyse des CYP 2C9*2 Polymorphismus

Das PCR-Produkt (s.o.) wurde über Nacht schüttelnd bei 37°C mit dem Restriktionsenzym Cfr 13 I inkubiert. Es wurden 15 µl des PCR-Produktes mit 10 µl Enzymmastermix (7 µl destilliertes Wasser, 2 µl Puffer und 1 µl Cfr 13 I) versetzt.

3.4.2. RLFP-Analyse des CYP 2C9*3 Polymorphismus

Das PCR-Produkt (s.o.) wurde über Nacht schüttelnd bei 37°C mit dem Restriktionsenzym Sty I inkubiert. Es wurden das PCR-Produkt mit 10 µl Enzymmastermix (6,5 µl destilliertes Wasser, 2 µl Puffer und 1,5 µl Cfr 13 I) versetzt.

Reagenzien	Typ & Hersteller
Agarose	Molecular Biology Grade; EUROGENTEC, Deutschland
Desoxynukleotide	dATP, dGTP, dCTP, dTTP; Boehringer, Mannheim
DNA Extraktion Kit	MagNA Pure LC DNA Kit; Roche Diagnostics, Mannheim
DNA Längenstandards	GeneRuler 100bp-DNA-Ladder; MBI Fermentas
DNA Polymerase	BioTherm Taq-Polymerase; Perkin Elmer, Weiterstadt
Magnesium Chlorid	MgCl ₂ ; GIBCO BRL®, Eggenheim
PCR Puffer	Gene Craft Puffer
Restriktionsendonuklease	BspTI; MBI Fermentas
Start-Oligonukleotide	divers; TIB Molbiol, Berlin
UV Farbstoff	SybrGreen, GelStar® Nucleid Acid Gel Stain; BioScience
Verdau Puffer	Buffer 0 ⁺ ; MBI Fermentas

Tabelle 2.3.5: Übersicht der Reagenzien.

3.5. Bestimmung des CYP 2C9 Genotyps

Nach der Amplifizierung der zwei DNA-Segmente, die die Punktmutationen CYP 2C9*2 und 2C9*3 enthalten, und der Verdauung durch die Restriktions-Enzyme erfolgte die Auftrennung der einzelnen DNA-Abschnitte durch eine erneute Gelelektrophorese. Es wurden 3 µl des verdauten PCR-Produktes mit 10 µl Bromphenolblaupuffer auf ein 3,5%iges Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 Volt für 60 min (Sullivan-Klose et al., 1996). Durch UV-Wellen wurden die DNA-Banden sichtbar gemacht und zu dokumentationszwecken fotografiert (s.o.). Anhand der entstandenen Restriktionsmuster konnten die CYP 2C9 Genotypen entsprechend der Tabellen 2.3.6 und 2.3.7 abgelesen werden.

Genotyp	*1/*1	*1/*2	*2/*2
Muster (bp)	-	253	253
	179	179	-
	119	119	119
	74	74	-

Tabelle 2.3.6: Auswertung der Restriktionsmuster für CYP 2C9*2.

Genotyp	*1/*1	*1/*3	*3/*3
Muster (bp)	137	137	-
	-	104	104
	-	33	33

Tabelle 2.3.7: Auswertung der Restriktionsmuster für CYP 2C9*3.

4. Statistik

Die Ergebnisse der Endothelfunktion wurden als Mittelwerte bzw. Median angegeben. Die Auswertung erfolgte durch eine univariate Analyse mit dem Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest. Die Ergebnisse der CYP 2C9 Polymorphismen bei kardiovaskulären Erkrankungen wurden sowohl univariat als auch multivariat mit logistischer Regression analysiert.