

3 Methoden

3.1 Analytik

3.1.1 Präparationen von humanem Plaque der Arteria Carotis

Um zu untersuchen, ob S100A8/A9 wie aufgrund seiner vielfältigen inflammatorischen Eigenschaften vermutet in humanem Plaque nachweisbar ist, wurden Western Blots aus Plaquematerial der Arteria Carotis angefertigt.

Das bei elektiven Thrombendarterektomien der Arteria Carotis entnommene Material wurde uns freundlicherweise von Herrn Dr. Hagen Kunte aus der Klinik für Neurologie der Charité Campus Mitte zur Verfügung gestellt. Es wurde bei -80°C asserviert.

In einem ersten Schritt erfolgte die sorgfältige Spülung und Säuberung des Materials mit Präparationspuffer. Anschließend wurden die zum Teil ulzerierenden Plaques aus dem Gefäßabschnitt nach visueller Einschätzung präpariert. Nach der Separation dieser beiden Abschnitte erfolgten eine grobe mechanische Zerteilung des Gewebematerials mittels eines Skalpells und die Schockfrostung in Flüssigstickstoff in einem Eppendorff Reaktionsgefäß. Im Anschluss wurde 1 ml Präparationspuffer hinzu gegeben und eine weitere mechanische Zertrümmerung mit einer MM300 Apparatur (Retsch, Deutschland) für 3 mal 2 min. bei 30 Hz vorgenommen. In einem letzten Schritt wurde das Material bei 1500 Umdrehungen pro Minute für 5 min. zentrifugiert.

(1) Präparationspuffer:

| | | |
|---|---------|----------------------------|
| 10 mM Hepes | 2,383 g | |
| 10 mM KCl | 0,746 g | /in 1l dd H ₂ O |
| 1 Tablette Complete Mini Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche, Schweiz) in 10 ml/pH 7,9 | | |

3.1.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösung

Zur Anwendung der Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösung wurde ein BCA Protein Assay (Pierce, USA) durchgeführt. Als Standardprotein wurde der BSA-

Standard der Firma Pierce (Smith et al., 1985) eingesetzt. Die Proben wurden jeweils so verdünnt, dass die Proteinkonzentration im linearen Messbereich des Assays zwischen 20 und 2000 µg/ml lagen.

Reagenzien und Ansatzprotokoll:

- Pipettieren von 25 µl Probe bzw. Standard in ein Reagenzglas
- Hinzugeben von 200 µl Arbeitslösung. Diese setzt sich im Verhältnis 50:1 zusammen aus BCA Reagenz A (Natriumkarbonat, Natriumbikarbonat, Bicinchoninsäure (BCA), Natriumtartrat in 0,1 M Natriumhydroxid) und BCA Reagenz B (4%iges Kupfersulfat)
- Schütteln für 30 sec.
- Inkubation für 30 min. bei 37°C
- Platte auf Raumtemperatur abkühlen lassen und Bestimmung der Extinktion bei 540 nm und 590 nm

3.1.3 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) im Taurin/Tris-Puffersystem

In der Polyacrylamidgelelektrophorese werden Proteine aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichtes gegeneinander aufgetrennt und in einem zweiten Schritt im Western Blot dargestellt.

Die Proteine wurden mittels eines 16% Trenngels und eines 5% Sammelgels (Invitrogen/Novex, USA) aufgetrennt. Pro Geltasche wurden 100 µg Protein aufgetragen. Der pH wurde nicht eingestellt. Der Gellauf fand unter folgenden Laufbedingungen statt:

- (1) Start bei 50 V (10 V/cm Trennstrecke), bis die Probe komplett aus den Taschen in das Sammelgel übergetreten war
- (2) Konstante Stromstärke bei 30 mA/cm²

| | | | |
|-----------------------|--------------|--------|----------------------------|
| Elektrophoresepuffer: | 0,1 M Tris | 12,1 g | |
| | 0,1 M Taurin | 12,6 g | |
| | 0,1% SDS | 2 g | /in 1 l ddH ₂ O |

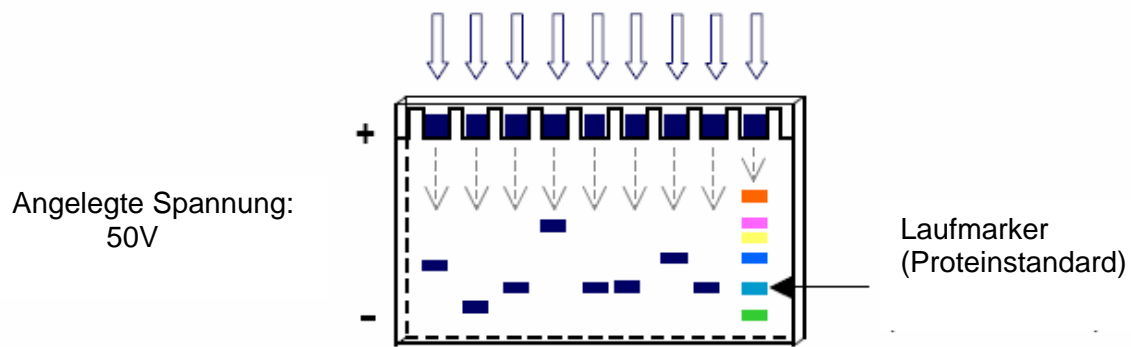


Abb. 3.1: Polyacrylamidgelelektrophorese

3.1.4 Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Die Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen erfolgte mittels Silberfärbung, da dieses Verfahren bei niedrigen Proteinkonzentrationen die beste Sensitivität bietet (Oakley et al., 1980).

Alle Lösungen wurden unmittelbar vor der Färbung angesetzt.

Reagenzien und Lösungen:

| | | | |
|------------------------|-------------------------------------|---------------------|-------------------------------|
| (1) Fixierlösung | 30 % Ethanol | 600 ml | |
| | 10 % Essigsäure | 200 ml | /in 2 l ddH ₂ O |
| (2) Sensitivierlösung | 30 % Ethanol | 75 ml | |
| | 0,5 M Natriumacetat | 10,25 g | |
| | 0,5 % Glutaraldehyd | 1,25 ml | |
| | 0,2 % Natriumthiosulfat | 0,5 g | /in 250 ml ddH ₂ O |
| (3) Silbernitratlösung | 0,2 M AgNO ₃ | 10 ml (2,5 M Stock) | |
| | 0,02 % Formaldehyd 37% | 50 µl | /in 125 ml ddH ₂ O |
| (4) Entwicklerlösung | 3 % Na ₂ CO ₃ | 7,5 g | |
| | 0,01 % Formaldehyd 37% | 50 µl | /in 250 ml ddH ₂ O |

| | | | |
|----------------------|--------------|---------|--------------------------------|
| (5) Stopperlösung | 0,05 M EDTA | 4,65 g | /in 250 ml ddH ₂ O |
| (6) Konservierlösung | 30 % Ethanol | 75 ml | |
| | 5 % Glycerin | 12,5 ml | / in 250 ml ddH ₂ O |

Färbeprotokoll:

- 30 min. Silber-Fixierer
- kurze Spülung mit ddH₂O
- 30 min. Sensitivierlösung
- 3 x 10 min. ddH₂O
- 20 min. 0,2 % AgNO₃
- Entwickler 2-10 min.
- Stopperlösung mindestens 30 min.
- 2 x 30 min. Konservierlösung

Die Entwicklung wurde abgestoppt, sobald sich die Proteinbanden deutlich anfärbten und bevor sich der Hintergrund zu färben begann.

3.1.5 Western Blot für S100A8/A9

Der Transfer der S100-Proteine auf PVDF-Membranen (Polyvinylidenfluorid-Membran) wurde mittels einer Tankblotapparatur (Invitrogen/Novex, USA) durchgeführt.

Für den Proteintransfer wurde die PVDF Membran für eine Minute mit Methanol benetzt und dann für 10 min. im Transferpuffer äquilibriert. Das 3MM Whatman Papier wurde ebenfalls mit Transferpuffer getränkt.

Beim Vorbereiten des Transfersandwich waren Luftblasen stets zu beseitigen.

Laufbedingungen für den Blot :

- (1) konstante Spannung mit U=50 V für 2 Stunden

Lösungen und Puffer:

| | | | |
|-----|------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| (1) | Transferpuffer | 15 mM Glycin | 5,8 g |
| | | 15 mM Tris | 11,6 g |
| | | 10% SDS | 7,4 ml |
| | | 20% Methanol | 400 ml /in 2 l ddH ₂ O |
| (2) | 10x TBS | 0,25 M Tris | 30,28 g |
| | | 1,5 M NaCl | 87,66 g |
| | | 10 mM CaCl ₂ | 1,50 g |
| | | | pH 7,5 /in 1 l ddH ₂ O |
| (3) | 0,05 % PBS-Tween | Tween | 0,5 ml |
| | | 1x PBS | 1000 ml |
| (4) | Blockierpuffer | Roti-Block x 10 (Roth, Deutschland) | 1:10 in ddH ₂ O |

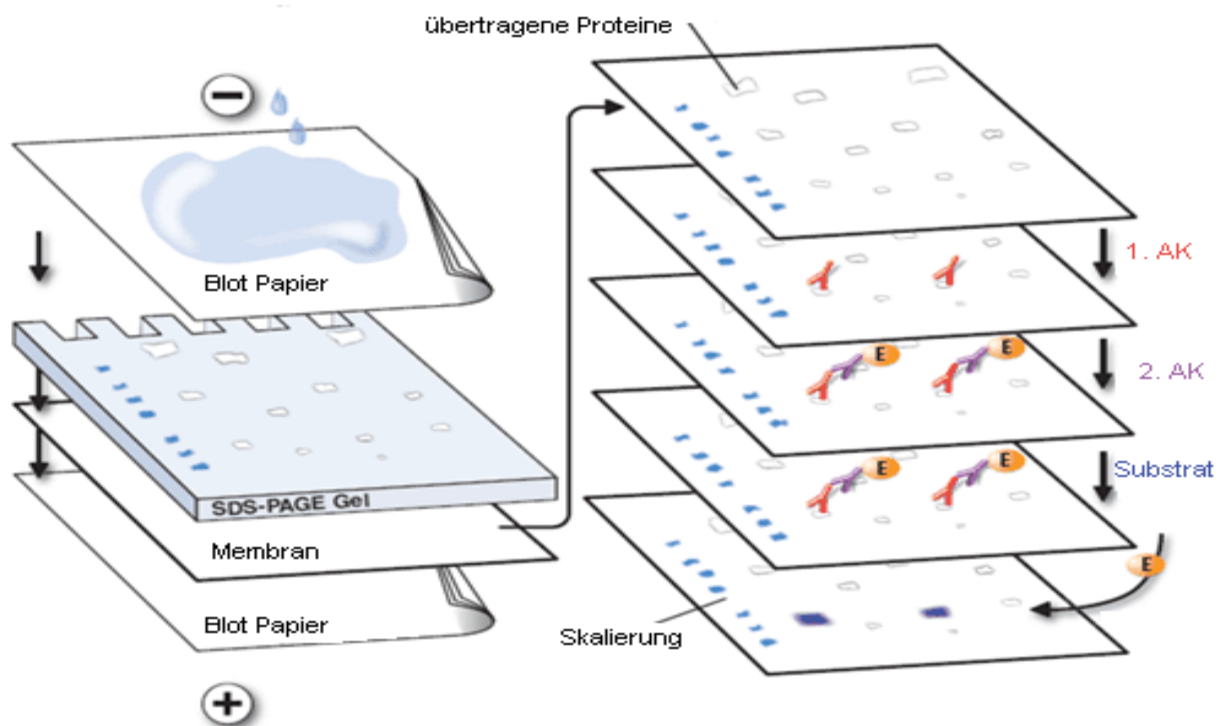


Abb. 3.2: Western Blot: Transfer der S100-Proteine von dem Polyacrylamidgel auf die PVDF-Membran (linke Seite). Anschließend Gabe des Erstantikörpers (1.AK) Maus anti-hu-S100A8/A9 Clone 27E10, des HRP-gekoppelten Zweitantikörpers (2.AK) und des Substrats (rechte Seite)

Bildung des von mAB 27E10 erkannten Epitops. Nach dem Zerfall des Heterodimers durch das Erhitzen der Proben für die Gelelektrophorese bleibt das Epitop auf den beiden Untereinheiten nachweisbar. Die Homoformen aus S100A8 bzw. S100A9 binden hingegen nicht an mAB 27E10.

Der HRP-gekoppelte Zweitantikörper führt mit Lumigen PS-3 zu einer Chemilumineszenzreaktion, welche in Lichtentwicklung umgesetzt wird.

Entwicklungsprotokoll:

- (1) Inkubation für 2 Std. in Rotiblock-Lösung bei Raumtemperatur
- (2) Waschen der Membran mit 0,5% TBS Tween
- (3) Inkubation in dem Erstantikörper Maus anti hu-S100A8/A9 Clone 27E10 (1:1000 in Blockierpuffer) über Nacht
- (4) Waschen mit Blockierpuffer 3 x 20 min.
- (5) Inkubation in dem HRP-gekoppelten Zweitantikörper (1:10.000 in Blockierpuffer)
- (6) Waschen mit Blockierpuffer 3 x 10 min.
- (7) Waschen in Assaypuffer 2 x 5 min.
- (8) Inkubation in Substratlösung für 5 min.
- (9) Abstreifen der Substratlösung und Exposition eines Autoradiographiefilms (Kodak, USA)

Reagenzien und Lösungen:

| | | |
|--------------------|-------------------------|-------------------------------------|
| (1) Assaypuffer | 0,1 M Diethanolamin | 2,4 ml / 2,63g |
| | 1 mM MgCl ₂ | 50 mg /in 250 ml ddH ₂ O |
| (2) Substratlösung | ECL plus Detection Kit | |
| | Reagenz A und Reagenz B | 40:1 |

Die Expositionszeit mit einem Autoradiographiefilm (Amersham, Deutschland) betrug zwischen 10 sec. und 10 min.

3.2 ELISA

Die Serumkonzentrationen von S100A8/A9 in den Blutproben der klinischen Studie wurden mit kommerziellen ELISA-Kits (Bühlmann, Schweiz) bestimmt. Die tiefgefrorenen Patientenproben wurden aufgetaut und streng nach Protokoll des Herstellers in Doppelbestimmung gemessen. Die Probenverdünnung erfolgte so, dass der zu erwartende Wert im linearen Messbereich des Kits lag.

3.3 Klinische Studie

3.3.1 Allgemeines

In der prospektiv angelegten Studie wurden serologische Parameter bei Patienten mit ACS, bei Patienten mit stabiler KHK und bei koronar gesunden Patienten erhoben. In den Proben aus periphervenösem Blut wurden die Konzentrationen von S100A8/A9 zu definierten Zeitpunkten bestimmt und auf Unterschiede in den drei Gruppen untersucht. Des Weiteren wurde der Verlauf dieser Serumspiegel mit dem Verlauf bei den etablierten Nekrosemarkern Troponin, CK, CK-MB und beim inflammatorischen Parameter hs-CRP (high sensitive C-reaktives Protein) korreliert. Schließlich wurde noch die Korrelation der Serumspiegel von S100A8/A9 mit elektrokardiographischen Befunden bezüglich einer Differenzierung des ACS in STEMI und NSTEMI untersucht.

3.3.2 Zeitplan

t₁: frühest mögliche Blutentnahme innerhalb von 24 Stunden nach akutem Schmerzereignis

t₂: Blutentnahme 4 Stunden nach t₁ ($\pm 10\%$)

t₃: Blutentnahme 8 Stunden nach t₁ ($\pm 10\%$)

t₄: Blutentnahme 12 Stunden nach t₁ ($\pm 10\%$)

t₅: Blutentnahme 24 Stunden nach t₁ ($\pm 10\%$)

t₆: Blutentnahme 48 Stunden nach t₁ ($\pm 10\%$)

3.3.3 Patientenkollektiv

In die Studie wurden 46 Patienten eingeschlossen, welche in der Zeit vom 15.01.05 bis 29.07.05 in die Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie, Angiologie und Pneumologie der Charité Campus Mitte kamen.

Hiervon hatten 29 Patienten ein akutes koronares Syndrom gemäß Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (siehe 1.4). Für die erste Kontrollgruppe wurden 12 nach Alter und Geschlecht gematchte Patienten mit nachgewiesener stabiler KHK ausgewählt. Für die zweite Kontrollgruppe wurden 5 Patienten mit koronarangiographisch ausgeschlossener KHK in die Studie aufgenommen.

Die Studie war zuvor von der Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin Berlin als ethisch unbedenklich beurteilt worden. Die Aufklärung der Probanden erfolgte sowohl in mündlicher als auch in schriftlicher Form im Sinne eines „Informed consent“. Die Zustimmung zur Teilnahme an der Studie wurde schriftlich niedergelegt.

Einschlusskriterien

- Patienten mit ACS, Patienten mit bekannter stabiler KHK für die erste Kontrollgruppe und Patienten mit koronarangiographisch ausgeschlossener KHK für die zweite Kontrollgruppe
- Einwilligungsfähigkeit
- schriftliche bzw. dokumentierte und bezeugte mündliche Einwilligung des Patienten

Ausschlusskriterien

- Niereninsuffizienz (Kreatinin > 2mg/dl)
- Operation innerhalb der letzten 90 Tage
- Tumorleiden
- Erkrankungen des autoimmunen oder rheumatischen Formenkreises
- akute/chronische Infektion (Temperatur > 38,5°C; CRP initial > 5mg/dl)
- Glasgow Coma Scale < 14
- Schwangerschaft, Wochenbett

- Antitumoröse oder immunsuppressive Therapie
- Abhängigkeit von Alkohol oder Drogen

3.3.4 Probenasservierung

Die Bestimmung von Troponin, CRP, CK und CK-MB erfolgte über das Labor der Charité Campus Mitte. Die Serumkonzentrationen von S100A8/A9 wurden mittels kommerziellem ELISA (Bühlmann, Schweiz) im Forschungslabor der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie, Angiologie und Pneumologie der Charité Campus Mitte bestimmt. Hierzu wurde den Patienten zu jedem der Zeitpunkte t_1 - t_6 je 20 ml Blut in Serumröhrchen aus peripherem Venenblut entnommen. Das Blut wurde sofort bei 6° Celsius gekühlt und nach maximal 12 Stunden für 15 Minuten bei 1800 Umdrehungen pro Minute und 20° Celsius zentrifugiert. Das so gewonnene Serum wurde maximal weitere 48 Stunden bei 6° Celsius gekühlt und anschließend ohne Unterbrechung der Kühlkette bei -80° Celsius tief gefroren.

3.4 Statistik

Die graphischen Darstellungen wurden im Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel sowie mit SPSS 11.5 für Windows durchgeführt. Die Berechnungen zur statistischen Signifikanz erfolgten in SAS 9.1 anhand einer nichtparametrischen zweifaktoriellen Analyse für Daten mit Messwiederholung (Brunner, 1999), um Gruppeneffekte, Zeiteffekte und summarische Wechselwirkungen zwischen Gruppe und Zeit aufzudecken. Diese Berechnungen wurden in Rücksprache mit dem Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie der Charité Campus Mitte durchgeführt. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als signifikant gewertet.