

Assoziation des Thrombozytenglykoprotein GP IIIa P1^{A1/A2}
Genpolymorphismus zur koronaren Herzkrankheit, jedoch nicht
zum Myokardinfarkt in Niedrigrisiko-Patienten

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Jörg Humme
aus Dortmund

Gießen 2003

Aus dem Medizinischen Zentrum für Klinische Chemie,
Klinische Immunologie und Humangenetik
Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie
Leiter: Prof. Dr. Dr. Norbert Katz
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Gardemann

Gutachter: PD Dr. Kanse

Tag der Disputation: 22.07.2003

Teile dieser Doktorarbeit wurden in der Zeitschrift Thrombosis and Haemostasis veröffentlicht:

Gardemann A, Humme J, Stricker J, Nguyen QD, Katz N, Philipp M, Tillmanns H, Hehrlein FW, Rau M, Haberbosch W.

Association of the platelet glycoprotein IIIa $PI^{A1/A2}$ gene polymorphism to coronary disease but not to nonfatal myocardial infarction in low risk patients.

Thromb Haemost 1998; 80: 214-7.

Kerstin und meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die ich wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	I
<u>Abbildungen</u>	V
<u>Tabellen</u>	VII
<u>Abkürzungen</u>	IX
1. Einleitung	1
1. 1. Koronare Herzkrankheit und Myokardinfarkt	1
1. 2. Genpolymorphismen und KHK bzw. Myokardinfarkt	2
1. 3. Aufbau und Funktion des Thrombozytenmembran- glykoprotein IIb/IIIa	4
1. 4. Molekularbiologische Grundlagen des GP PI ^{A1/A2} Genpolymorphismus und dessen Auswirkung auf die KHK und den Myokardinfarkt	6
2. Material	9
2. 1. Technische Hilfsmittel	9
2. 1. 1. Geräte	9
2. 1. 2. Kleinmaterial	10
2. 2. Reagenzien	10
2. 3. Enzyme	11
2. 4. Primer	12

3.	Methoden	13
3. 1.	Erfassung der Studienpopulation	13
3. 2.	Definition der koronaren Herzkrankheit (KHK) und des Herzinfarktes	14
3. 3.	Definition von Hoch- und Niedrigrisiko-Gruppen	14
3. 4.	Durchführung der Koronarangiographie	15
3. 5.	Messung der Serumenzyme und Substrate	18
3. 5. 1.	Lipoprotein(a)	18
3. 5. 2.	Apolipoproteine A-I und B	19
3. 5. 3.	Cholesterin	20
3. 5. 4.	Triglyceride	21
3. 5. 5.	Fibrinogen	22
3. 6.	Nachweis des Polymorphismus im GP IIIa Gen	23
3. 6. 1.	DNA-Präparation aus EDTA-Blut	23
3. 6. 2.	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, polymerase chain reaction)	24
3. 6. 2. 1.	Prinzip der PCR	24
3. 6. 2. 2.	Amplifikation des GP IIIa-Segmentes	25
3. 6. 3.	Behandlung des Amplifikates mit Restriktionsenzymen	27
3. 6. 3. 1.	Prinzip der Restriktionsenzyme	27
3. 6. 3. 2.	Restriktionsbehandlung des GP IIIa-Amplifikates mit den Enzymen <i>Msp</i> I und <i>Nci</i> I	27
3. 6. 4.	Elektrophoretische Auftrennung und Darstellung der amplifizierten DNA-Fragmente	29
3. 6. 4. 1.	Prinzip der Gel-Elektrophorese	29
3. 6. 4. 2.	Durchführung der Gel-Elektrophorese	29
3. 7.	Statistik	32

4.	Ergebnisse	33
4. 1.	Charakterisierung der Studienpopulation	33
4. 2.	Verhältnis zwischen koronarer Herzkrankheit und Myokardinfarkt	37
4. 3.	Nachweis etablierter Risikofaktoren der koronaren Herzkrankheit und des Myokardinfarktes	41
4. 4.	Verteilung der Glykoprotein IIIa $PI^{A1/A2}$ Genotypen in der Studienpopulation	44
4. 5.	Etablierte koronare Risikofaktoren in Abhängigkeit von den GP IIIa $PI^{A1/A2}$ Genotypen	45
4. 6.	Beziehung zwischen dem GP IIIa $PI^{A1/A2}$ Genpolymorphismus und der koronaren Herzkrankheit	47
4. 7.	Korrelation zwischen GP IIIa Genotypen und koronarer Herzkrankheit in Niedrig- und Hochrisiko-Gruppen	51
4. 8.	Verhältnis zwischen GP IIIa $PI^{A1/A2}$ Genotyp und Myokardinfarkt	53
4. 9.	Korrelation zwischen GP IIIa $PI^{A1/A2}$ Genotyp und Myokardinfarkt in Niedrig- und Hochrisiko-Gruppen	54
4. 10.	Korrelation zwischen GP IIIa $PI^{A1/A2}$ Genotyp und Herzinfarkt in Abhängigkeit vom Alter beim ersten Herzinfarkt	58

5.	Diskussion	59
5. 1.	Kurzdarstellung der Studienergebnisse	59
5. 2.	Primäre Hämostase unter besonderer Berücksichtigung der Bedeutung der thrombozytären Adhäsionsproteine	60
5. 3.	Zur Bedeutung der Genpolymorphismen thrombozytärer Glykoproteine	61
5. 4.	Funktionelle Bedeutung des $PI^{A1/A2}$ Polymorphismus	66
5. 5.	Darstellung der publizierten Ergebnisse zur potentiellen Assoziation zwischen dem Glykoprotein $PI^{A1/A2}$ Genpolymorphismus und koronarer Herzkrankheit bzw. Myokardinfarkt	68
5. 6.	Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Studie mit publizierten Arbeiten zum Thema des $PI^{A1/A2}$ Polymorphismus	70
6.	Zusammenfassung	75
7.	Literaturverzeichnis	76

Lebenslauf

Danksagung

Abbildungen

Abb. 1:	Schematische Darstellung der Herzkranzgefäße unter der Koronarangiographie	16
Abb. 2:	Reaktionsgleichung zur Bestimmung der Serumkonzentration des Cholesterins	20
Abb. 3:	Reaktionsgleichung zur Bestimmung der Triglyzeride	21
Abb. 4:	Faktoren und Mechanismen der plasmatischen Gerinnungsaktivierung	22
Abb. 5:	Spezifische Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme	27
Abb. 6:	Schematische Darstellung der Restriktionsbehandlung des amplifizierten GP IIIa-DNA-Fragmentes mit den Enzymen <i>Msp</i> I und <i>Nci</i> I	28
Abb. 7:	Schematische Darstellung der Agarose-Gel-Elektrophorese (4,5 % Nu-Sieve Agarose), mit und ohne Spaltung durch die Restriktionsenzyme <i>Msp</i> I und <i>Nci</i> I	30
Abb. 8:	Photographische Darstellung des PCR-Produktes und der mit Restriktionsenzymen behandelten DNA-Fragmente des GP IIIa Gens nach gelelektrophoretischer Auftrennung	31
Abb. 9:	Koronare Herzkrankheit (ja/nein)	33
Abb. 10:	Koronare Herzkrankheit (ja/nein) in Abhängigkeit vom Alter	34

Abb. 11: KHK in Abhängigkeit von der Anzahl der Gefäßstenosierungen und des Alters	35
Abb. 12: Vergleich des durchschnittlichen Lebensalters von Probanden ohne und mit koronarer Herzkrankheit bzw. Herzinfarkt	36
Abb. 13: Beziehung zwischen koronarer Herzkrankheit und Myokardinfarkt	38
Abb. 14: Verhältnis zwischen koronarer Herzkrankheit und Gensini Score	39
Abb. 15: Verhältnis zwischen Gensini Score und Myokardinfarkt	40
Abb. 16: Graphische Darstellung der Verteilung der GP IIIa P1 ^{A1/A2} Genotypen in der Studienpopulation	45
Abb. 17: Graphische Darstellung der durchschnittlichen Gensini Scores der GP IIIa P1 ^{A1/A2} Genotypen in der Gesamtpopulation und bei Patienten ohne und mit koronarer Herzkrankheit	50
Abb. 18: Vergleich der Gensini Scores zwischen den GP IIIa P1 ^{A1/A2} Genotypen in verschiedenen Niedrigrisiko-Gruppen	52

Tabellen

Tabelle 1:	Berechnung des Gensini Score	17
Tabelle 2:	Nukleotidsequenzen der eingesetzten Primer	25
Tabelle 3:	Reaktionsgemisch zur Amplifikation des GP IIIa DNA-Abschnittes	26
Tabelle 4:	Amplifikationsbedingungen der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zum Nachweis des GP IIIa PI ^{A1/A2} Genpolymorphismus	26
Tabelle 5:	Risikofaktoren für die koronare Herzkrankheit bei Kontrollpersonen und Patienten	42
Tabelle 6:	Risikofaktoren für den Myokardinfarkt bei Kontrollpersonen und Patienten	43
Tabelle 7:	Verteilung der GP IIIa PI ^{A1/A2} Genotypen in der Studienpopulation	44
Tabelle 8:	Etablierte Risikofaktoren der KHK bzw. des Myokardinfarkts in Abhängigkeit von den GP IIIa Genotypen	46
Tabelle 9:	Verteilung der Glykoprotein IIIa PI ^{A1/A2} Genotypen in Probanden ohne Gefäßerkrankung und in Patienten mit koronarer Herzkrankheit	48
Tabelle 10:	Verteilung der Gensini Scores zwischen den GP IIIa PI ^{A1/A2} Genotypen in der Gesamtpopulation und bei Patienten mit und ohne koronare Herzkrankheit	49

Tabelle 11:	Verteilung der GP IIIa P1 ^{A1/A2} Genotypen bei Patienten ohne oder mit Herzinfarkt	53
Tabelle 12:	Verteilung der GP IIIa P1 ^{A1/A2} Allele zwischen Probanden ohne und mit Herzinfarkt unter bzw. über 62 Jahren	55
Tabelle 13:	Beziehung zwischen dem GP IIIa P1 ^{A1/A2} Genpolymorphismus und dem Myokardinfarkt in Niedrigrisiko-Gruppen	57
Tabelle 14:	Zusammenhang zwischen dem P1 ^{A1/A2} Genpolymorphismus des Glykoprotein IIIa und dem Alter beim Auftreten des ersten Myokardinfarkts	58
Tabelle 15:	Thrombozytäre Alloantigene	62

Abkürzungen

- A. p. Angina pectoris
- Abb. Abbildung
- ACE Angio I-Converting Enzyme
- Apo A-I Apolipoprotein A-I
- Apo B Apolipoprotein B
- Apo E Apolipoprotein E
- BMI Body-mass-index
- bp Base pair (Basenpaare)
- DNA Desoxyribonukleinsäure
- GE Gefäßerkrankung
- GP Glykoprotein
- GS Gensini Score
- HDL High-density-lipoprotein
- HI Herzinfarkt
- J Jahre
- KHK Koronare Herzkrankheit
- LDL Low-density-lipoprotein
- Lp(a) Lipoprotein(a)
- MI Myokardinfarkt
- min Minute
- PCR Polymerase-chain-reaction
(Polymerase-Kettenreaktion)
- py packed year
- sec Sekunde

1. Einleitung

1. 1. Koronare Herzkrankheit und Myokardinfarkt

In den Industrieländern stellt die koronare Herzkrankheit die häufigste Todesursache dar. Man schätzt, dass 5-10 % der männlichen Bevölkerung an der koronaren Herzkrankheit leiden. Die KHK ist definiert als Einengung bzw. Stenosierung von Herzkranzgefäßen durch arteriosklerotische Gefäßwandschäden mit dadurch verursachter Sauerstoffminderversorgung des Myokards. Manifestationen der koronaren Herzkrankheit sind die Angina pectoris, der Myokardinfarkt, die ischämische Herzmuskelschädigung mit Linksherzinsuffizienz, Herzrhythmusstörungen und der plötzliche Herztod. Als Erstmanifestationen finden sich in 55 % eine Angina pectoris, in 25 % ein Herzinfarkt und in 20 % der plötzliche Herztod. Man kennt heute zahlreiche etablierte Risikofaktoren der KHK. Diese werden in unbeeinflussbare und beeinflussbare Risikofaktoren unterteilt. Zu den erstgenannten gehören das männliche Geschlecht, das Lebensalter und die familiäre Disposition. Den beeinflussbaren Risikofaktoren 1. Ordnung wie Hypertonus, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, metabolisches Syndrom, und Zigarettenrauchen stehen die beeinflussbaren 2. Ordnung gegenüber. Zu diesen gehören Hyperfibrinogenämie, Hyperhomocysteinämie, hohes Lipoprotein(a), Bewegungsmangel und psychosoziale Risikofaktoren wie z. B. negativer Stress und niedriger sozialer Status. Wenn zwei Risikofaktoren 1. Ordnung vorhanden sind, ist das Infarktrisiko im Vergleich zu einer Normalperson um das Vierfache erhöht, bei Vorliegen von drei Risikofaktoren 1. Ordnung besteht ein zehnfaches Risiko.

In Deutschland erleiden ca. 200.000 Menschen pro Jahr, d. h. 330 auf 100.000 Bewohner, einen Herzinfarkt. Das männliche Geschlecht ist dabei zwei- bis dreimal häufiger betroffen als das weibliche Geschlecht. Der Herzinfarkt entsteht meist auf dem Boden der koronaren Herzkrankheit mit Stenose der Koronararterien. Häufig wird der Herzinfarkt durch das Aufbrechen eines arteriosklerotischen Atheroms und die Bildung eines gefäßverschießenden Thrombus eingeleitet.

Mehr als die Hälfte der Todesfälle nach einem Herzinfarkt ereignen sich noch vor der Klinikaufnahme. Mit Einführung der Intensivstationen konnte die Infarktsterblichkeit während des Klinikaufenthaltes von 30 % auf ca. 12 % gesenkt werden. Haupttodesursachen sind heute nicht beherrschbare maligne Herzrhythmusstörungen und die Manifestation einer progredienten Herzinsuffizienz. Ungefähr 20 % der Patienten, die den akuten Herzinfarkt überleben, versterben innerhalb des nächsten Jahres.

1. 2. Genpolymorphismen und KHK bzw. Myokardinfarkt

Durch die großen Fortschritte der Molekularbiologie in den letzten beiden Jahrzehnten und durch das Bestreben, das gesamte menschliche Genom aufzuklären, konnten auch DNA-Sequenzen und Mutationen nachgewiesen werden, die in Verdacht stehen, mit bestimmten Erkrankungen assoziiert zu sein. Die Entwicklung der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) durch den amerikanischen Biochemiker Kary Mullis [84] erleichterte die Identifikation von Veränderungen im menschlichen Genom. Man spricht von einem Genpolymorphismus, wenn ein einzelner varianter Genotyp häufiger als bei 1 % der Population vorkommt.

Die Frage nach der Bedeutung von Genpolymorphismen für die Entstehung der koronaren Herzkrankheit und des Myokardinfarkts stellt die Grundlage dieser Studie dar. Aufgrund bisheriger Erkenntnisse werden mehrere Genpolymorphismen verdächtigt, in ursächlicher Beziehung zur KHK und zum Myokardinfarkt zu stehen. Diese wurden in Kandidaten-Genen von Proteinen aus Stoffwechselprozessen nachgewiesen, die einen Einfluss auf die Inzidenz und Progredienz ischämischer Herzerkrankungen haben. Wichtige Beispiele hierfür sind:

1. *Fettstoffwechsel*: Sequenzwiederholung (TTTTA)_n an Position –1400 und die Punktmutationen G/A an Position –914, C/T an Position –49 und G/A an Position –21 im Apo(a) Gen [9]; Insertion/Deletion Polymorphismus des Apolipoprotein B (Apo B) Signal Peptid Gens [34]; Punktmutation G/A an Position –75 und C/T an Position 83 im Apolipoprotein A-I (Apo A-I) [98]

2. *Renin-Angiotensin-System*: Insertion/Deletion Polymorphismus im Intron 16 des Angiotensin-1-converting-Enzym (ACE) Gen [2; 37]; A1166C Polymorphismus des Angiotensin II Typ 1 Rezeptor Gens [33]
3. *Homocystein-Stoffwechsel*: C677T Genpolymorphismus des 5´-10´-Methylen-tetrahydrofolat-Reduktase Gens [36; 48]
4. *Entzündungsreaktionen*: Nucleotid Substitution in der 5´-Region an Position –174 (G/C), an Position –572 (G/C) und an Position 596 (G/A) im Interleukin-6 Gen [44]; Punktmutationen C/A an Position –863 und G/A an Position –308 im Tumor Nekrose Faktor- α Gen [59]
5. *NO modulierender Stoffwechsel*: G/T Punktmutation an Position 1917 des NO-Synthase Gens [31; 52]; Wiederholungspolymorphismus einer aus 27 Basenpaaren (bp) bestehenden Sequenz im Intron 4 des NO-Synthase Gens [31; 129]
6. *Metalloproteinasen*: C/T Polymorphismus an Position 1562 des Gelatinase B Gens, das die Matrixmetalloproteinase-9 kodiert [126]
7. *Fibrinogen-System*: G/A Punktmutation an Position –455 des β -Fibrinogen Gens [35; 47; 117]; 4G/5G Insertion/Deletion Polymorphismus in der Promotor-Region des Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI-1) Gens [21; 32]
8. *Plasmatische Gerinnung*: G/A Mutation an Position 20210 im Prothrombin (Faktor II) Gen [25; 28; 41]; G1691A Punktmutation im Faktor V Gen [28; 41]
9. *Zelluläre Gerinnung*: C807T Punktmutation im GP Ia Gen [106]; CTG/GTG Mutation im Kodon 125 des CD 31 (PCAM-1) Gen [7; 30]; C₋₅T Kozak Polymorphismus des GP Ib Gens [1; 107]; A/G Polymorphismus an Position 1648 des GP Ia Gens [60]

Insbesondere die Komponenten der Gerinnungs- und Fibrinolyse-Systeme, die eine zentrale Rolle bei der Entstehung der KHK und des Myokardinfarkts spielen [28; 30; 35; 117], werden derzeit durch mehrere Arbeitsgruppen auf genetische Veränderungen untersucht [1; 29; 47; 107].

Im Mittelpunkt der hier vorgelegten Studie steht der sogenannte $PI^{A1/A2}$ Genpolymorphismus des Thrombozytenmembranglykoproteins IIIa.

1. 3. Aufbau und Funktion des Thrombozytenmembranglykoprotein IIb/IIIa

Die Mechanismen der Hämostase und Thrombose erfordern ein enges Zusammenspiel zwischen Thrombozyten, Endothel, plasmatischen Gerinnungsfaktoren und Strukturen der Gefäßwand (extrazelluläre Matrix). Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Zellformen, die durch eine Vielzahl von spezifischen Adhäsionsrezeptoren ermöglicht und reguliert werden, spielen dabei eine wesentliche Rolle.

Normale Funktionen der leuzinreichen Glykoproteine, der Selektine, der Rezeptoren vom Immunoglobulintyp und der Integrine bilden eine unabdingbare Voraussetzung für die Thrombozytenfunktion. Dabei sind Integrine Adhäsionsrezeptoren, die Strukturen des Zytoskeletts mit der extrazellulären Matrix verbinden. Integrine kommen ubiquitär vor und finden sich nahezu auf allen Zellen [45; 93]. Neben der Thrombozytenaggregation und -adhäsion sind Integrine an der Gewebeentwicklung und -differenzierung, am Krebszellwachstum und der Metastasierung beteiligt. Integrine sind nichtkovalent verbundene Heterodimere, die jeweils aus einer α - und β -Untereinheit bestehen. Bisher sind 8 β - und 14 α -Untereinheiten bekannt. Die β -Untereinheit dient der strukturellen Unterteilung, die α -Untereinheit determiniert die Spezifität [113]. Fünf verschiedene Integrine wurden bisher auf Thrombozyten beschrieben, drei der β_1 -Klasse ($\alpha_2\beta_1$ = Kollagenrezeptor, $\alpha_5\beta_1$ = Fibronektinrezeptor, $\alpha_6\beta_1$ = Lamininrezeptor) und zwei der β_3 -Klasse ($\alpha_{IIb}\beta_3$ = Fibrinogenrezeptor, $\alpha_V\beta_3$ = Vitronektinrezeptor). Das Glykoprotein IIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$, GP IIb/IIIa) gehört zu den β_3 -Integrinen und ist Bestandteil der thrombozytären Plasmamembran, des offenen kanalikulären Systems und der α -Granula [40; 45; 68].

GP IIb/IIIa ist ein Fibrinogen-Rezeptor. Diese Eigenschaft ermöglicht die Wechselwirkung der Thrombozyten untereinander. Die zentrale Aufgabe des Fibrinogenrezeptors GP IIb/IIIa ist die Bindung von löslichem Fibrinogen an die aktivierte Thrombozytenoberfläche, dem ersten Schritt der Thrombozytenaggregation (primäre Aggregation). Mit einer durchschnittlichen Oberflächenbesetzung von 60.000 bis 100.000 Rezeptoren pro Thrombozyt ist es mengenmäßig das am

häufigsten vorkommende Membranglykoprotein der Blutplättchen (1-2 % des Gesamtproteingehalts). 70 % der Rezeptoren liegen konstitutiv auf der Oberfläche exprimiert vor, die restlichen 30 % werden erst nach Thrombozytenaktivierung aus den intrazellulären Speichern (offenes kanalikuläres System und α -Granula) an die Oberfläche freigesetzt [94]. Die β_3 -Kette (IIIa) des GPIIb/IIIa Rezeptors besitzt ein Molekulargewicht von 90 kDa; die α_{IIb} -Kette (IIb) ist 145 kDa schwer und besteht aus einer großen („heavy chain“, 125 kDa) und einer kleinen („light chain“, 23 kDa) Untereinheit [96].

Es werden folgende Funktionszustände des GP IIb/IIIa-Komplexes unterschieden: Unter physiologischen Verhältnissen tragen zirkulierende Blutplättchen einen „ruhenden“, nicht aktivierten GP IIb/IIIa-Rezeptor an ihrer Oberfläche (*niedrigaffiner Funktionszustand*) [39; 40; 94]. Im nichtaktivierten niedrigaffinen Zustand kann GP IIb/IIIa nur immobilisiertes nicht aber lösliches, plasmatisches Fibrinogen binden. Eine Aktivierung der Thrombozyten führt zur raschen Konformationsänderung des GP IIb/IIIa-Komplexes und zur Freilegung von hochaffinen Fibrinogenbindungsstellen (*aktivierter hochaffiner Funktionszustand*). Dadurch wird die Bindung von löslichem Fibrinogen an die Thrombozytenoberfläche ermöglicht (*ligandenbesetzter Funktionszustand*) [38].

Fibrinogen besitzt im Wesentlichen zwei Aminosäuresequenzen, über die es mit dem GP IIb/IIIa-Rezeptor in Kontakt treten kann: Die RGD-Sequenz (Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Sequenz) in der α -Kette und die KQAGDV-Sequenz (Lysin-Glutamin-Alanin-Glycin-Asparaginsäure-Valin-Sequenz) am aminoterminalen Ende der γ -Kette des Fibrinogens. Diese Signalsequenzen werden von spezifischen Bindungsregionen innerhalb des GP IIb/IIIa-Moleküls erkannt und vermitteln die Ligandenbindung an den GP IIb/IIIa-Rezeptorkomplex [95]. Die Bindung von Fibrinogen an den aktivierten GP IIb/IIIa-Rezeptor induziert eine weitere Konformationsänderung des Rezeptors mit Freilegung von kryptischen Epitopen (LIBS = ligandeninduzierte Bindungsstellen; ligandenbesetzter Funktionszustand). Die ligandeninduzierte Konformationsänderung des Rezeptors reguliert Mechanismen, welche an der transmembranen Signaltransduktion und der irreversiblen Fibrinogenbindung an GP IIb/IIIa beteiligt sind [94; 96].

Im Bereich des GP IIb/IIIa-Moleküls wurden bisher drei Bindungsstellen für Fibrinogen lokalisiert. Kleine Peptide vom RGD- und KQAGDV-Typ oder synthetische Fibrinogenrezeptorantagonisten, welche die sterischen Eigenschaften der Peptide imitieren, können an den nichtaktivierten GP IIb/IIIa-Rezeptor binden und zur Konformationsänderung führen (intrinsische Aktivität von GP IIb/IIIa-Antagonisten) [38; 39].

1. 4. Molekularbiologische Grundlagen des GP $PI^{A1/A2}$ Genpolymorphismus und dessen Auswirkung auf die KHK und den Myokardinfarkt

Das PI^A oder Zw Alloantigen-System (neuere Nomenklatur: human platelet antigen = HPA-1) wurde zum ersten Mal 1959 bei einer 51 Jahre alten Patientin beschrieben, die 5 Tage nach einer intraoperativ erhaltenen Bluttransfusion, eine schwere Thrombozytopenie entwickelte [121]. Kunicki und Aster [65] lokalisierten das PI^A (Zw) Epitop auf dem GP IIIa [65]. Dieses Alloantigen-System ist für eine Reihe klinisch relevanter Erkrankungen verantwortlich wie Neonatale alloimmune Thrombozytopenie (NATP), nach Thrombozytentransfusion auftretende Purpura (PTP) und die Zerstörung transfundierter Thrombozyten [6; 64].

Zwar ist die Vielgestaltigkeit von zellulären Oberflächenstrukturen, auf der solche Alloantigen-Systeme beruhen, seit ca. 50 Jahren bekannt [6; 64; 65; 121], aber erst in den letzten beiden Jahrzehnten wurden die molekularbiologischen Grundlagen erforscht, die diese Vielgestaltigkeit verursachen. 1985 fand man heraus, dass sich das PI^A Antigen auf einer 17 kDa schweren Untereinheit des GP IIIa befindet [88]. Den Genpolymorphismus, der dieses Alloantigen-System hervorruft, klärten 1989 Newman et al. [87] auf.

Die gesamte Grösse des auf dem Chromosom 17 lokalisierten GP IIIa-Gens [135] beträgt ca. 40 kb [135]. Das Glykoprotein leitet sich von 14 Exons ab [87; 135]. Menschen, die an Position 1565 des Exon 2 das Nukleotid Thymin besitzen, sind Träger des PI^{A1} Allels, Menschen die an dieser Position das Nukleotid Cytosin haben, sind Träger des PI^{A2} Allels [87]. Dieser Genpolymorphismus hat

Auswirkungen auf die Aminosäurenstruktur des GP IIIa: Personen, die Träger des PI^{A1} Allels sind, haben an Position 33 im GP IIIa-Molekül die Aminosäure Leucin, Träger des PI^{A2} Allels besitzen an dieser Stelle dagegen die Aminosäure Prolin [87]. Daraus folgt, dass Personen mit der Aminosäure Leucin in ihrem GP IIIa das PI^{A1} (HPA-1a) Antigen auf den Thrombozyten exprimieren und Personen mit der Aminosäure Prolin an Position 33 im Glykoprotein IIIa das Antigen PI^{A2} (HPA-1b) [87; 132].

Man kann diesen Genpolymorphismus als „diallelisches System“ bezeichnen, denn es gibt nur zwei Allel-Varianten und damit nur drei mögliche Genotypen ($GP PI^{A1/A1}$, $GP PI^{A1/A2}$, $GP PI^{A2/A2}$). Der Austausch eines einzigen Basenpaares (bp) in den kodierenden Genen (Punktmutation, SNP = Single Nucleotide Polymorphism) ist in vielen Fällen für die Strukturpolymorphismen der thrombozytären Membranglykoproteine verantwortlich [83; 118; 119].

Die Erforschung des PI^A Alloantigen-Systems und der damit verbundenen Verbesserung in der Diagnostik und Therapie der oben genannten Erkrankungen (NATP, PTP) stand bis Mitte der neunziger Jahre im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses [87; 132; 135]. Man erkannte aber nun die immer größer werdende Bedeutung der verschiedensten Genpolymorphismen bei der Entstehung der koronaren Herzkrankheit und des Myokardinfarkts [9; 21; 31; 33; 34; 48; 59; 107; 126]. Nurden [89] war 1995 einer der Ersten, der die Frage stellte, ob der Polymorphismus des Glykoprotein IIIa, bedingt durch ein verändertes Bindungsverhalten dieses thrombozytären Rezeptors, einen eigenständigen Risikofaktor für die koronare Herzkrankheit und den Myokardinfarkt darstellen könnte. Es folgte dann 1996 die Studie von Weiss et al. [131], die den Ausgangspunkt für alle weiteren Arbeiten zu diesem Thema darstellt.

Weiss et al. [131] untersuchten in einer Fall-Kontroll-Studie mit 139 Probanden, ob der beschriebene $PI^{A1/A2}$ Genpolymorphismus über ein verändertes Bindungsverhalten der Thrombozyten mit einem erhöhten KHK- und Myokardinfarktrisiko assoziiert sein könnte. Weiss et al. [131] beobachteten, dass vor allem jüngere PI^{A2} Allel Träger ein erhöhtes Herzinfarktrisiko aufwiesen.

Ungeachtet der niedrigen Frequenz des PI^{A2} Allels von etwa 1-2 %, wurde die Beziehung dieses Genpolymorphismus zur KHK [15; 22; 51; 115] und zum Myokardinfarkt [14; 15; 73; 91; 99; 102] - mit Ausnahme der Studien von Ridker et al. und Hermann et al. [51; 99] - in den nachfolgenden Studien in kleinen Studienkollektiven von 100-500 Patienten untersucht. Mit Ausnahme von Carter et al. [15] konnte in keiner Studie eine Assoziation des PI^{A2} Allels zur KHK- [22; 51; 115] bzw. zum Myokardinfarktrisiko [14; 51; 73; 91; 99; 102] festgestellt werden.

Es blieb unklar, ob diese negativen Ergebnisse auf eine tatsächlich fehlende Assoziation oder auf den eingeschränkten statistischen Aussagewert solch kleiner Studienkollektive zurückzuführen waren. Außerdem konnten in diesen kleinen Populationen keine Niedrig- oder Hochrisikogruppen analysiert werden. Daher war es das Ziel der hier vorgelegten Studie, die Bedeutung des $PI^{A1/A2}$ Genpolymorphismus des Thrombozytenmembranglykoprotein IIIa für das KHK- und das Myokardinfarktrisiko sowie für den KHK-Schweregrad in einer grossen Population zu untersuchen, deren Koronarstatus angiographisch bestimmt worden war.

2. Material

2. 1. Technische Hilfsmittel

2. 1. 1. Geräte

- Autoklav (Melag), Fa. Kalensee, Gießen
- BM/Hitachi System 717, Fa. Boehringer, Mannheim
- Elektrophorese-Kammern (Agagel Mini+Maxi), Fa. Biometra, Göttingen
- Grobwaage, Fa. Sartorius, Göttingen
- Feinwaage, Fa. Mettler-Toledo, Gießen
- Kamera, Fa. Polaroid, Offenbach
- Mikrowelle, Fa. Bosch, München
- Netzgerät, Fa. Shandon, Frankfurt a. M.
- Pipette, 0,5-10 μ l (Gilson), Fa. Abimed, Langenfeld
- Pipette, 10-100 μ l (Gilson), Fa. Abimed, Langenfeld
- Pipette, 100-1000 μ l (Gilson), Fa. Abimed, Langenfeld
- Thermocycler (Crocodile), Fa. Appligene, Heidelberg
- UV-Tisch (DNA-Transilluminator), Fa. Renner, Darmstadt
- pH-Meter CG 840, Fa. Schott, Hofheim a. Taunus
- Vortex Schüttler IKA-Vibro-Fix VF2, Fa. IKA, Staufen
- Zentrifuge (Biofuge 13), Fa. Heraeus, Osterode
- Behring-Nephelometer, Fa. Behringwerke, Marburg/Lahn
- KC 40, Fa. Amelung, Karlsruhe
- Wasserbad, Fa. Julabo, Seelbach

2. 1. 2. Kleinmaterial

- Mikroreaktionsgefäße (Ultra-Tubes) 0,65 ml, Fa. Roth, Karlsruhe
- Mikroreaktionsgefäße (Ultra-Tubes) 1,7 ml, Fa. Roth, Karlsruhe
- Pipettenspitzen weiß, Fa. Sarstedt, Nümbrecht
- Pipettenspitzen gelb, Fa. Sarstedt, Nümbrecht
- Pipettenspitzen blau, Fa. Sarstedt, Nümbrecht
- Parafilm, Fa. American Can, Greenwich, USA
- Polaroidfilm, Typ 667 Professional, Fa. Sigma, Deisenhofen

2. 2. Reagenzien

- Paraffin-Öl, Fa. Sigma, Deisenhofen
- Agarose Gel, Fa. Pharmacia, Freiburg/Breisgau
- Gelatine, Fa. Merck, Darmstadt
- Aqua destillata, Fa. Braun, Melsungen
- Lysis-Puffer-K :
 - Gelatine, Fa. Merck, Darmstadt
 - KCl, Fa. Merck, Darmstadt
 - MgCl₂, Fa. Merck, Darmstadt
 - Tris-HCl, Fa. USB, Bad Homburg
 - Tween 20, Fa. Sigma, Deisenhofen
- TE-Puffer :
 - EDTA, Fa. Merck, Darmstadt
 - Tris-HCl, Fa. USB, Bad Homburg
- TAE-50-fach-Puffer :
 - EDTA, Fa. Merck, Darmstadt
 - Tris-HCl, Fa. USB, Bad Homburg
 - (Gebrauchslösung: 1-fach Puffer)

- PCR-10-fach Puffer : Gelatine, Fa. Merck, Darmstadt
 KCl, Fa. Merck, Darmstadt
 MgCl₂, Fa. Merck, Darmstadt
 Tris-HCl, Fa. USB, Bad Homburg
 (Gebrauchslösung: 1-fach Puffer)

- 100 bp DNA Ladder, Fa. Pharmacia, Freiburg/Breisgau
- Ethidiumbromid, Fa. Sigma, Deisenhofen
- Bromphenolblau, Fa. Sigma, Deisenhofen
- Desoxynucleotide (dNTPs), Fa. Pharmacia, Freiburg/Breisgau
- Apolipoprotein-Kontroll-Serum CHD (human), Fa. Behringwerke, Marburg/Lahn
- Cholesterin-Reagenz, Fa. Boehringer, Mannheim
- Triglycerid-Reaktionsgemisch, Fa. Boehringer, Mannheim
- N Antiserum gegen Human Apolipoprotein A-I, Fa. Behringwerke, Marburg/Lahn
- N Antiserum gegen Human Apolipoprotein B, Fa. Behringwerke, Marburg/Lahn
- N Apolipoprotein-Standard-Serum (human), Fa. Behringwerke, Marburg/Lahn
- N Latex Lp(a) Reagenz, Fa. Behringwerke, Marburg/Lahn
- N Lp(a) Kontrolle/Standard SY (human), Fa. Behringwerke, Marburg/Lahn
- Pipes-Puffer, Fa. Boehringer, Mannheim

2. 3. Enzyme

- Taq-Polymerase, Fa. Pharmacia, Freiburg/Breisgau
- *Nci* I, Fa. New England Biolabs, Frankfurt a. M.
- *Msp* I, Fa. New England Biolabs, Frankfurt a. M.

2. 4. Primer

- GP IIIa-Gen sense Primer, Fa. Roth, Karlsruhe
- GP IIIa-Gen antisense Primer, Fa. Roth, Karlsruhe

3. Methoden

3. 1. Erfassung der Studienpopulation

Die Population dieser Studie setzte sich aus 2252 männlichen Probanden zusammen, die sich zur koronarangiographischen Diagnostik in die Klinik für Kardiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen oder in die Kerckhoff-Klinik, Bad Nauheim, begeben hatten.

Alle Probanden gaben ihr Einverständnis für die Teilnahme an der Studie, die sich über einen Beobachtungszeitraum von Mai 1994 bis Juni 1997 erstreckte. Zum Zeitpunkt der stationären Aufnahme wurden alle Patienten über Herzinfarkte, Angina pectoris, Nikotinabusus, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Größe und Gewicht, sowie über die Vormedikation befragt. Bei der Befragung nach abgelaufenen Herzinfarkten interessierte nicht nur die Anzahl und Lokalisation des Herzinfarktes, sondern auch das Lebensalter der Patienten beim Auftreten des ersten Herzinfarktes. Die persönlichen Angaben der Probanden wurden anhand bereits vorliegender Untersuchungen (EKG, Echokardiographien, Szintigraphien, Enzymbestimmungen und Arztbriefen) objektiviert. Angina pectoris wurde in stabile und instabile unterteilt. Bei der Raucheranamnese interessierte sowohl die Menge als auch die Dauer des Zigarettenkonsums. Die Angaben wurden in „Pack-Years“ umgerechnet (1 py = 20 Zigaretten/Tag über ein Jahr).

Die Angaben zur arteriellen Hypertonie wurden als binäre Variable definiert. Eine arterielle Hypertonie lag vor, wenn diese anamnestisch objektiviert werden konnte, oder wenn bei zwei aufeinander folgenden Untersuchungen der diastolische Wert über 95 mm Hg lag. Mit Ausnahme von 18 Patienten waren alle Diabetiker (n = 405) an einem nicht insulinpflichtigen Diabetes mellitus (NIDDM) erkrankt. Größe (in Meter) und Gewicht (in kg) der Patienten wurden zum Body-mass-index (BMI = kg/m²) umgerechnet.

3. 2. Definition der koronaren Herzkrankheit (KHK) und des Herzinfarktes (HI)

Herzerkrankungen durch Koronarinsuffizienz gehören zu den häufigsten Todesursachen in den industriellen Ländern. Ursache sind arteriosklerotische Auflagerungen in den Koronargefäßen infolge exogener Noxen (z. B. Rauchen, Überernährung) aber auch konstitutioneller Risiken (z. B. Störungen in der Gerinnung, Hyperlipidämien).

Infolge der Stenosen kommt es zu einer Hypoxie des Myokards, die starke Schmerzen verursacht (Angina pectoris). Diese kann vor allem auch bei erhöhtem myokardialen Sauerstoffverbrauch durch Stress, bei körperlicher oder seelischer Belastung auftreten. Ist eine Koronararterie durch thrombotische Auflagerungen auf den arteriosklerotischen Plaques vollkommen verschlossen, so kommt es zu einer ischämisch bedingten Myokardnekrose (Herzinfarkt), entweder die gesamte Wanddicke (transmural) oder den subendokardialen Bereich (nicht transmural = „non-Q-wave-Infarkt“) betreffend.

Die Patienten sind vor allem dann vital gefährdet, wenn das Reizleitungssystem im infarzierten Bereich liegt und es zum Kammerflimmern kommt (Sekundenherztod). Aber auch alle anderen Formen des Herztillstandes, ein kardiogener Schock infolge myokardialen Pumpversagens, die Ruptur eines Herzwandaneurysmas oder der Abriss eines Papillarmuskels können den Patienten vital gefährden.

3. 3. Definition von Hoch- und Niedrigrisiko-Gruppen

Risikofaktoren sind Faktoren die mit einem gehäuften Auftreten einer KHK einhergehen. Es hat sich gezeigt, dass dabei sowohl die Anzahl als auch die Ausprägung der Risikofaktoren eine große Rolle spielen. Diese werden in unbeeinflussbare und beeinflussbare Risikofaktoren unterteilt. Zu den erstgenannten gehören das männliche Geschlecht, das Lebensalter und die familiäre Disposition.

Den beeinflussbaren Risikofaktoren 1. Ordnung, wie Hypertonus, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, metabolisches Syndrom, und Zigarettenrauchen, stehen die beeinflussbaren 2. Ordnung gegenüber. Zu diesen gehören Hyperfibrinogenämie, Hyperhomocysteinämie, hohes Lipoprotein(a), Bewegungsmangel und psychosoziale Risikofaktoren: Negativer Stress, niedriger sozialer Status u. a..

Durch das Fehlen der etablierten Risikofaktoren für die KHK, konnte die Studienpopulation in verschiedene Niedrigrisiko-Gruppen eingeteilt werden. Diese wurden durch Unterschreiten der Mittelwerte der kontinuierlichen Parameter bzw. durch das Fehlen der Risikofaktoren ermittelt. Folgende Niedrigrisiko-Gruppen wurden formuliert: Zigarettenkonsum < 5 py, kein Hypertonus, kein Diabetes mellitus, BMI < 26,9 kg/m², Apo A-I > 1,43 mg/dl, Apo B < 1,25 mg/dl, Lp(a) < 10 mg/dl, Triglyzeride < 154 mg/dl, Cholesterin < 209 mg/dl und Fibrinogen < 3,47 mg/dl. Durch Kombination der genannten Parameter ergaben sich weitere Niedrigrisiko-Gruppen: Kein Hypertonus und kein Diabetes, BMI < 26,9 kg/m² und Apo A-I > 1,43 mg/dl, Apo A-I/Apo B > 1,12 und Triglyzeride < 154 mg/dl und Cholesterin < 209 mg/dl. Die entsprechenden Hochrisikogruppen wurden durch das Überschreiten der Mittelwerte bzw. durch das Vorhandensein eines oder mehrerer Risikofaktoren definiert. Diese einzelnen Populationen wurden hinsichtlich einer Assoziation zwischen dem GP P1^{A1/A2} Genpolymorphismus und der KHK bzw. dem Myokardinfarkt geprüft.

3. 4. Durchführung der Koronarangiographie

Die koronare Herzkrankheit wurde zum einen über den durch die Koronarangiographie bestimmten Gefäßstatus der Patienten und zum anderen über den Gensini Score [42; 43] definiert. Koronargefäße ab einem Stenosierungsgrad von $\geq 50\%$ wurden als erkrankt definiert. Je nach Lokalisation der Stenose wurde die koronare Herzkrankheit in eine 0-, 1-, 2-, 3- Gefäßerkrankung eingeteilt.

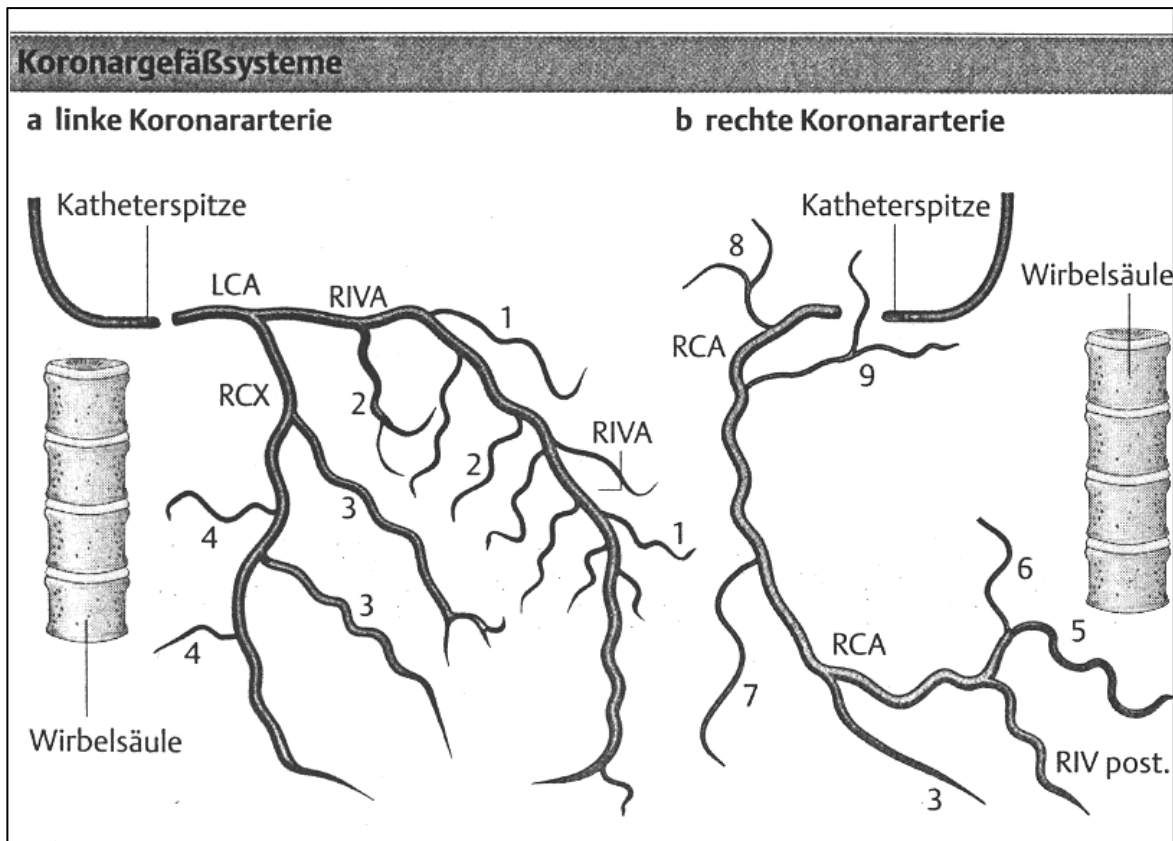


Abb. 1: Schematische Darstellung der Herzkranzgefäße unter der Koronarangiographie (aus [110])

Abkürzungen: LCA = Stamm der linken Koronararterie; RIVA = Ramus interventricularis anterior; RCX = Ramus circumflexus; RCA = Stamm der rechten Koronararterie; RIV post = Ramus interventricularis posterior; 1 = diagonale Äste; 2 = septale Äste; 3 = Ramus marginalis; 4 = atriale Äste; 5 = Ramus posterolateralis; 6 = AV-Knotenarterie; 7 = Ramus ventricularis; 8 = Sinusknotenarterie; 9 = Conus-Pulmonalis-Ast.

Eine weitere Einteilung wurde mittels des Gensini Scores (GS) getroffen, der eine genaue Graduierung der Gefäßerkrankung hinsichtlich der Lokalisation und des Schweregrades der Stenose erlaubt [42; 43]. Dieser wird folgendermaßen berechnet: Je nach Grad der Stenose wird ein Punktwert zwischen 1 und 32 veranschlagt, der anschließend - in Abhängigkeit von dem betroffenen Segment - mit einem Faktor von 0,5, 1, 2,5 oder 5 multipliziert wird. Eine z. B. 75 % Stenose der LAD wird mit einem GS von $4 \times 2,5 = 10$ beziffert (Tabelle 1).

Tabelle 1: Berechnung des Gensini Score

Stenosierungsgrad %	Punktwert
25	1
50	2
75	4
90	8
99	16
100	32

Stenose Lokalisation	Multiplikationsfaktor
LCA	5
LAD	2,5
RCX	1
RCA	1
Weitere Äste	0,5

Abkürzungen: LCA = linke Koronararterie; LAD = Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie; RCX = Ramus circumflexus der linken Koronararterie; RCA = rechte Koronararterie

Der Koronarstatus aller 2252 männlichen Patienten wurde anhand der in der Abteilung für Kardiologie der Justus-Liebig-Universität und der Kerckhoff-Klinik durchgeführten Koronarangiographie bestimmt. Durch die gleichzeitig durchgeführte Ventrikulographie mit Angaben über die Ejektionsfraktion konnten noch Aussagen über den linksventrikulären Funktionszustand des Herzmuskels gemacht werden. Die Darstellung der Herzkranzgefäße wurde durch selektive Kontrastmittelinjektion in die rechte und linke Koronararterie zum Nachweis der morphologischen Veränderung mittels der Judkin-Technik durchgeführt: Unter Lokalanästhesie wurde die rechte

Arteria femoralis ca. 1-2 cm transkutan punktiert. Ein Katheter wurde mittels Seldinger Technik in die Femoralarterie eingebracht, nachdem der Bulbus aortae passiert wurde, konnte der Katheter unter Drehung in den Koronarostien platziert werden.

Die Ventrikulographie wurde mit einem Pigtail- oder Oedman-Katheter durchgeführt, der ein breites Lumen und eine seitliche Öffnung hat. Die Katheter wurden unter Durchleuchtungs-, Druck- und EKG-Kontrolle nacheinander eingebracht.

Gleichzeitig mit der Injektion von Kontrastmittel wurden Röntgenfilmaufnahmen in mehreren Ebenen mit einer 35 mm Filmkamera gemacht. Jede Koronarangiographie wurde in rechtsanterioren (RAO) und linksanterioren (LAO) Projektionen, sowie in axialen und hemiaxialen Ebenen aufgenommen.

3. 5. Messungen der Serumenzyme und Substrate

Von allen in die Studie aufgenommenen Patienten wurden vor der koronarangiographischen Untersuchung jeweils eine EDTA-Blutprobe, eine Gerinnungs- und eine Serumprobe abgenommen. Die EDTA-Blutprobe wurde zur Bestimmung des Blutbildes und zur Analyse des Glykoprotein IIIa $PI^{A1/A2}$ Genpolymorphismus genutzt. Aus der Gerinnungsprobe wurde neben den üblichen Gerinnungsparametern wie PTT, TPZ und TZ zusätzlich die Fibrinogenkonzentration bestimmt. Aus der Serumprobe wurden die Konzentrationen von Lipoprotein(a), Apolipoprotein A-I, Apolipoprotein B, Cholesterin und Triglycerid bestimmt.

3. 5. 1. Lipoprotein(a)

Das Lipoprotein(a) besteht aus zwei verschiedenen Komponenten: dem Low Density Lipoprotein (LDL) und einem Glykoprotein, dem Apolipoprotein (a) (Apo(a)), die durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Apo(a) hat eine hohe Strukturhomologie zu Plasminogen. Dadurch kann es die Wirkung von Plasminogen kompetitiv behindern und möglicherweise atherogene Effekte auslösen. Die individuelle Konzentration von Lp(a) im Serum ist weitgehend genetisch bedingt.

Die Variationsbreite in einer Population ist relativ groß. Ab einer Serumkonzentration von etwa 25 mg/dl Lp(a) ist das atherogene Risiko erhöht, besonders bei Personen mit zusätzlich erhöhtem LDL. Das Prinzip der quantitativen Bestimmung von Lp(a) im Serum mittels Behring-Nephelometer beruht auf der Agglutination von Lp(a)-haltigen Proben bei Mischungen mit Antikörpern gegen Human Lp(a) beladene Polystyrol-Partikel. Aus patentrechtlichen Gründen können die Konzentrationen der Reaktionspartner zur Bestimmung des Lp(a) nicht angegeben werden.

3. 5. 2. Apolipoproteine A-I und B

Apolipoprotein A-I stellt die Hauptproteinkomponente des HDL (high density lipoprotein) dar. Der Anteil von Apo A-I am Gesamtprotein des HDL beträgt ca. 65 %. Apo A-I aktiviert die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase, die die Veresterung von Cholesterin katalysiert. Das so veresterte Cholesterin kann zur Leber transportiert, katabolisiert und ausgeschieden werden. Bei Personen mit arteriosklerotischen Gefäßveränderungen liegen häufig erniedrigte Apo A-I Konzentrationen vor. Auch bei normalen Apo B Konzentrationen kann ein erniedrigter Apo A-I Spiegel ein Risikofaktor für Arteriosklerose sein.

Apolipoprotein B ist die Hauptproteinkomponente des LDL (low density lipoprotein) mit ca. 95 % Anteil am Gesamtprotein des LDL. Apo B ist für die Reaktion mit LDL-Rezeptoren in der Leber und an Zellwänden notwendig und somit am Transport von Cholesterin aus der Leber in die Gefäßzelle beteiligt. Erhöhte Apo B-Konzentrationen kommen häufig bei arteriosklerotischen Gefäßveränderungen vor und stellen einen Risikofaktor für Arteriosklerose dar.

Das Reaktionsprinzip der quantitativen Messungen der Apolipoprotein A-I- und B-Spiegel beruhen auf einer immunochemischen Reaktion mit spezifischen Antikörpern, bei der Immunkomplexe gebildet werden, an denen eingestrahktes Licht gestreut wird. Die Intensität des Streulichtes ist abhängig von der Konzentration des jeweiligen Apolipoproteins der Probe.

Die Auswertung erfolgte durch Vergleich mit einem Standard bekannter Konzentrationen. Aus patentrechtlichen Gründen können die Konzentrationen der Reaktionspartner zur Bestimmung des Apo A-I und des Apo B nicht angegeben werden.

3. 5. 3. Cholesterin

Cholesterin wird im Körper ubiquitär synthetisiert und ist ein für die Zellmembranen essentieller Bestandteil und Baustein von Lipoproteinen sowie ein Vorläufer für die Synthese der Steroidhormone und der Gallensäuren. Der Hauptteil des Cholesterins wird in der LDL-Fraktion, der Rest in der HDL- und VLDL-Fraktion und nur wenig in den Chylomikronen transportiert. Heute ist es allgemein akzeptiert, dass die Hypercholesterinämie einen der wichtigsten Risikofaktoren für die koronare Herzkrankheit darstellt.

Die Serumkonzentration von Cholesterin wurde am BM/Hitachi 717 der Firma Boehringer gemessen. Dazu wurden 3 µl Probenvolumen mit 250 µl Cholesterin-Reagenz (Pipes-Puffer) versetzt und nach unten stehender Reaktionsgleichung bei einer Wellenlänge von 700 nm gemessen.

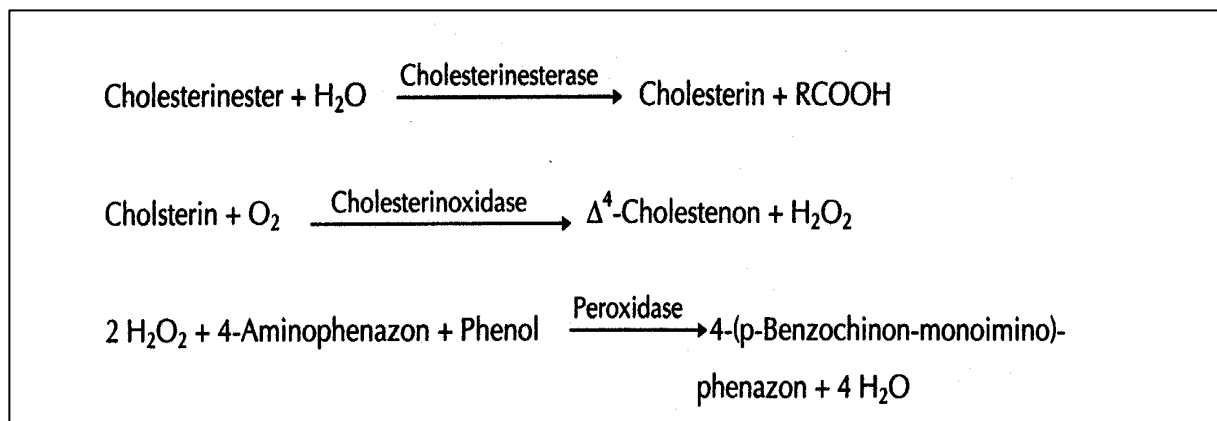


Abb. 2: Reaktionsgleichungen zur Bestimmung der Serumkonzentration des Cholesterins.

3. 5. 4. Triglyceride

Die Triglyceride sind Ester des Glycerins mit 3 Fettsäureresten, wobei im menschlichen Depotfett vor allem die geradzahligen, unverzweigten Monocarbonsäuren mit 18 oder 16 Kohlenstoffatomen mit oder ohne Doppelbindungen vorkommen. Wichtige Vertreter sind u. a. die Palmitinsäure (C_{16:0}), die Stearinsäure (C_{18:0}), die Ölsäure (C_{18:1}), die Linolsäure (C_{18:2}) und die Linolensäure (C_{18:3}). Neuere Erkenntnisse über die Bedeutung der Triglyceride als unabhängigen Risikofaktor für koronare Herzkrankheit haben gezeigt, dass die Kombination von erhöhtem LDL-Cholesterin und erhöhten Triglyceriden zu einem erhöhten KHK-Risiko führen.

Die Messung der Triglycerid-Serumkonzentration wurde ebenfalls am BM/Hitachi 717 der Firma Boehringer durchgeführt. Der Test beruht auf der enzymatischen Spaltung der Triglyceride mit nachfolgender Bestimmung des entstandenen freien Glycerins (Farbreaktion). Dazu wurden 3 µl Probevolumen und 300 µl Reaktionsgemisch (Tris-Puffer, Magnesiumsulfat, EDTA, Natriumcholat, Kaliumhexacyanoferrat (II), 4-Aminophenazon, Lipase, Fettalkoholpolyglykoläther, Glycerinphosphatoxidase, Glycerokinase, Peroxidase) verwendet und nach untenstehender Reaktionsgleichung bei 700 nm gemessen.

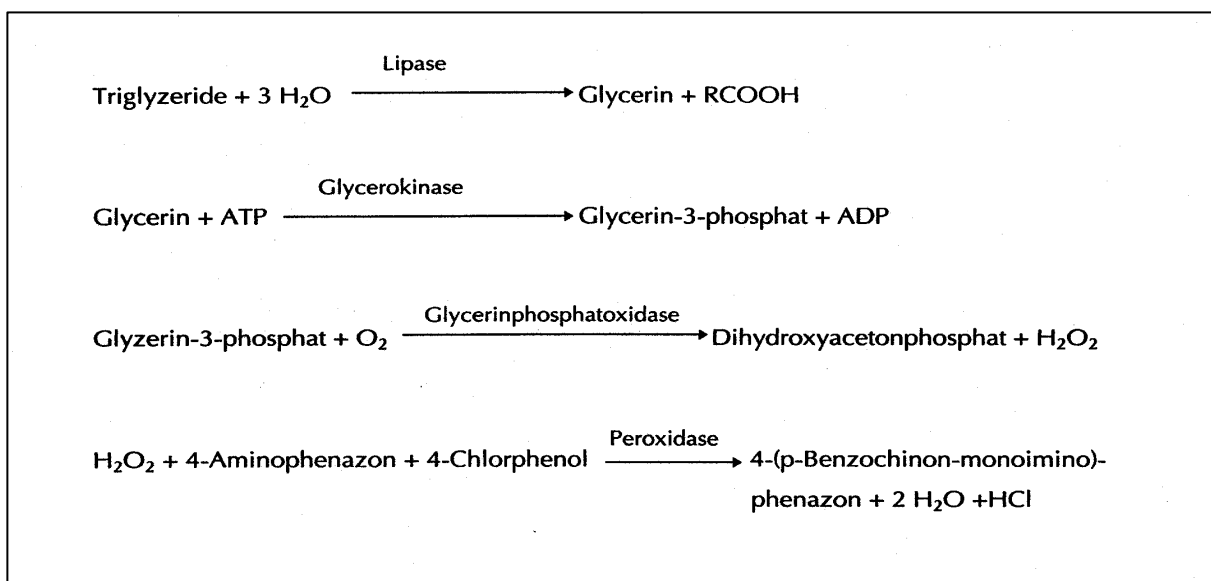


Abb. 3: Reaktionsgleichungen zur Bestimmung der Triglyceride.

3. 5. 5. Fibrinogen

Das in der Leber gebildete Fibrinogen ist das Substrat der plasmatischen Gerinnung. Nach Aktivierung der Gerinnungskaskade (Abb. 4) und der Thrombin katalysierten Abspaltung der Fibrinopeptide A und B von Fibrinogen erfolgt die Polymerisation zum Fibrin. Die anschließende Faktor XIII-katalysierte Quervernetzung des Fibrinpolymerisats bewirkt die Ausbildung eines quervernetzten Fibringerinnsels, das wesentlich zur Blutstillung durch Verschluss des Gefäßes beiträgt.

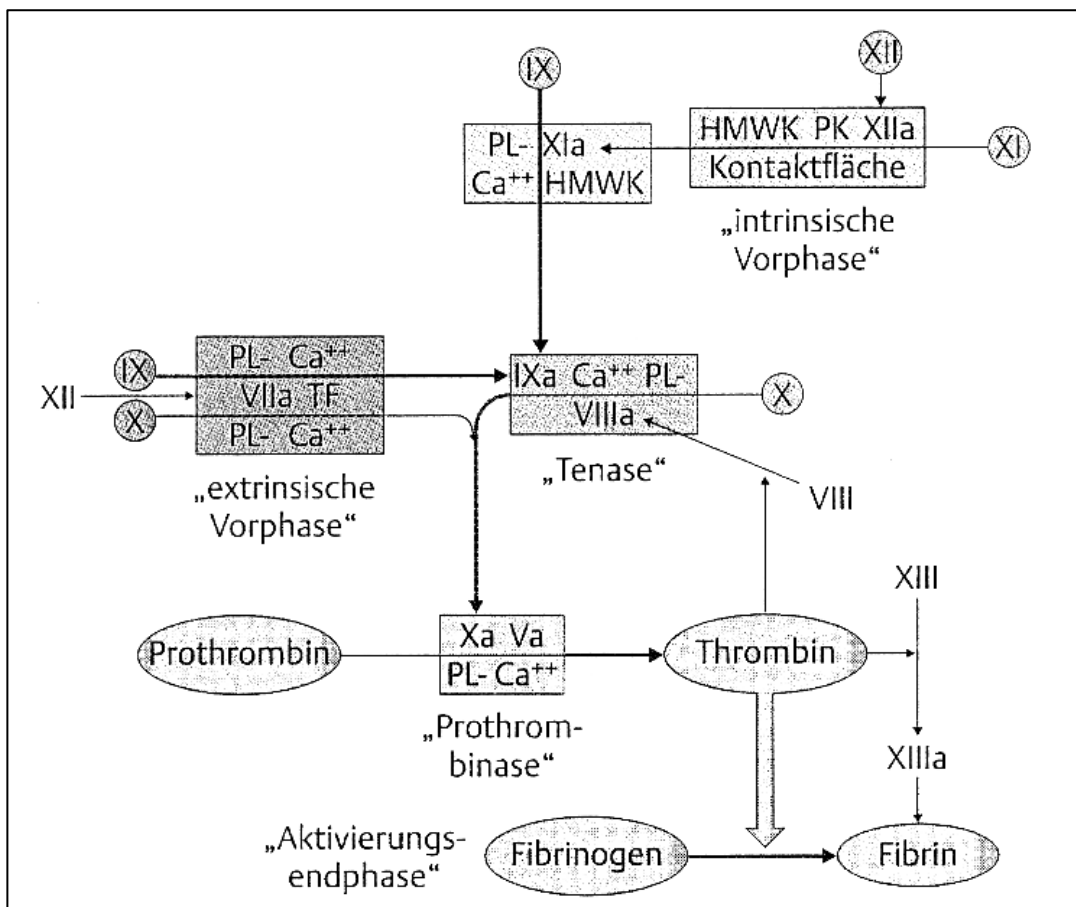


Abb. 4: Faktoren und Mechanismen der plasmatischen Gerinnungsaktivierung (aus [120]).

Abkürzungen: TF = Tissue factor, „Gewebefaktor“ ; HMWK = hochmolekulares Kininogen;
Pk = Präkallikrein ; PL = Phospholipid .

Das Fibrinogen wurde nach der Methode von Clauss [16] am KC 40 der Firma Amelung bestimmt. Diese Fibrinogen-Messung ist eine Variante der Thrombinzeit-Bestimmung. Citratplasma wird so weit verdünnt, dass die Fibrinogenkonzentration 0,1-0,5 g/l beträgt. In diesem Bereich korreliert die Fibrinogenkonzentration mit der gemessenen Gerinnungszeit. Zur Durchführung wurde das verdünnte Citratplasma mit einer hohen Thrombinkonzentration versetzt und die Gerinnungszeit in Sekunden gemessen. Unter definierten Bedingungen ist die Fibrinogenkonzentration proportional zur Bildungsgeschwindigkeit eines Gerinnsels. Wird zur Verzögerung der Gerinnselbildung ein Fibrinogen-Aggregationshemmer zum Reaktionsgemisch zugesetzt, kann auch mit unverdünnten Patientenplasmen gemessen werden (modifizierte Clauss-Methode [16]).

3. 6. Nachweis des Polymorphismus im GP IIIa Gen

Der $PI^{A1/A2}$ Polymorphismus im Glykoprotein III Gen ist durch den Austausch eines T gegen ein C an Position 1565 im Exon 2 charakterisiert [87]. Nach Amplifikation der relevanten DNA-Region und Restriktionsbehandlung mit den Enzymen *Msp* I und *Nci* I kann das PI^{A1} Allel von dem PI^{A2} Allel unterschieden werden [87; 118]. Der Nachweis des Polymorphismus beinhaltet somit 4 Schritte:

1. Isolation der DNA
2. Polymerase-Kettenreaktion
3. Restriktionsbehandlung des Amplifikats
4. Visualisierung des Amplifikats mittels der Agarose-Gel-Elektrophorese.

3. 6. 1. DNA-Präparation aus EDTA-Blut

Zur DNA-Extraktion wurden 100 µl EDTA-Blut und 500 µl TE-Puffer (10 mM Tris HCl pH 8,0; 1 mM EDTA) in ein Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß gegeben und gerüttelt. Dann wurden die Proben für 10 sec bei 13000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 500 µl TE-Puffer resuspendiert und gerüttelt.

Nach erneuter Zentrifugation für 10 sec bei 13000 x g wurde der entstandene Überstand verworfen und das Pellet in 100 µl Lysis-Puffer-K (100 mM Tris-HCl pH 8,3; 500 mM KCl; 15 mM MgCl₂; 0,1 % Gelatine; 5 % Tween 20) gelöst und gerüttelt. Es wurden 10 µl Proteinase K (10 mg/ml) zugegeben, durchmischt, leicht zentrifugiert und dann für 45 min bei 56°C inkubiert. Zur Inaktivierung der Proteinase K wurden die Proben noch für 10 min bei 95°C inkubiert und danach direkt auf Eis gestellt [56].

3. 6. 2. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, polymerase chain reaction)

3. 6. 2. 1. Prinzip der PCR

Der Erfinder der PCR ist Kary B. Mullis, der als erster erkannte, dass für die Neusynthese der DNA nur eine kurze Anknüpfungsstelle von 15 bis 20 Basenpaaren nötig ist. Bei Untersuchungen zum Nachweis des Sichelzellanämie-Gens wurde die PCR erstmals beschrieben. Im Prinzip beruht die PCR auf der spezifischen Vervielfältigung (Amplifizierung) von DNA-Fragmenten bestimmter Länge, ohne Verwendung von Restriktionsenzymen, Vektoren und Wirtszellen. Zwischen Oligonukleotid-Paaren (Primer), die in Strang und Gegenstrang komplementär zum 3'-Ende der zu amplifizierenden Region sind, kann das gewünschte DNA-Fragment mittels einer DNA-Polymerase und Desoxynukleotiden synthetisiert werden. Die Amplifikation der DNA verläuft in einem dreistufigen Temperaturzyklus. Der DNA-Doppelstrang wird zunächst durch Erhitzen in Einzelstränge zerlegt (Denaturierung). Durch anschließende Abkühlung auf einen geeigneten Temperaturbereich erfolgt die Primeranlagerung (Annealing) an die komplementären Sequenzen der Ziel-DNA.

Von diesen ausgehend werden nun jeweils in 5`- 3`- Richtung die komplementären DNA-Stränge neu synthetisiert (DNA-Synthese/Extension). Es entstehen zunächst DNA-Stränge nicht definierter Länge. Ab dem zweiten Zyklus treten solche definierter Länge auf, die sich in jedem weiteren Zyklus exponentiell vervielfältigen. Die Länge der PCR Produkte wird durch die Distanz der 5`-Enden beider Primer bestimmt. Nimmt zu Anfang die Zahl der Amplifikate exponentiell zu, tritt nach verminderter Aktivität der Polymerase und Akkumulation von PCR-Produkten ein sogenannter Plateau-Effekt auf. Das amplifizierte Produkt wird in einer Agarose-Gel-Elektrophorese mittels Ethidiumbromid als DNA-Bande sichtbar gemacht.

3. 6. 2. 2. Amplifikation des GP IIIa -Segmentes

Die PCR wurde durchgeführt mit 25 pmol eines jeden Primers in einem Volumen von 50 µl, das zusätzlich je 250 µmol/l eines jeden Desoxynukleosidtriphosphats (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 1 U Taq Polymerase, 1,5 mmol/l MgCl₂, 50 mmol KCL, 10 mmol Tris-HCl (pH 8,3) und 0,01 mg/ml Gelatine enthielt (Tabelle 3). Der Primer bestand aus dem sense Oligonucleotid Primer (5`) TGG ACT TCT CTT TGG GCT CCT GAC TTA C (3`) und dem antisense Oligonukleotid Primer (5`) CGA TGG ATT CTG GGG CAC AGT TAT C (3`) (Tabelle 2). Die extrahierte DNA wurde nach initialer Denaturierung bei 93°C für 3 min in einem DNA-Thermocycler in jeweils 35 Zyklen amplifiziert (Denaturierung: 1 min bei 94°C; Annealing: 1 min bei 58°C; Extension: 1 min bei 72°C) (Tabelle 4).

Tabelle 2: Nukleotidsequenzen der eingesetzten Primer

sense Oligo Primer	(5`) TGG ACT TCT CTT TGG GCT CCT GAC TTA C (3`)
antisense Oligo Primer	(5`) CGA TGG ATT CTG GGG CAC AGT TAT C (3`)

Tabelle 3: Reaktionsgemisch zur Amplifikation des GP IIIa DNA-Abschnittes

Reagenzien	Endkonzentration
sense-oligo-primer	25 pmol
anti-sense-oligo-primer	25 pmol
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	4 x 250 µmol/l
Taq-Polymerase	1 U
PCR-Puffer	10 mmol/l Tris HCl pH 8,4 50 mmol/l KCl 1,5 mmol/l MgCl ₂ 0,01 mg/ml Gelatine
Proben	100 ng aus DNA Präparation
negative Kontrolle	destilliertes autoklaviertes Wasser

Tabelle 4: Amplifikationsbedingungen der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zum Nachweis des GP IIIa PI^{A1/A2} Genpolymorphismus

Initiale Denaturierung bei 93°C für 3 min			
Zyklen	Temperatur	Zeit	Vorgang
35	94°C	1 min	Denaturierung
35	58°C	1 min	Annealing
35	72°C	1 min	Extinsion

3. 6. 3. Behandlung des Amplifikates mit Restriktionsenzymen

3. 6. 3. 1. Prinzip der Restriktionsenzyme

Für den Nachweis von Genpolymorphismen können Restriktionsenzyme eingesetzt werden, die das PCR-Amplifikat an spezifischen Stellen schneiden (Erkennungssequenzen). Beispielsweise schneidet das Restriktionsenzym *EcoR* I (Escheria coli Restriktionsenzym I) jede DNA überall dort, wo die Sequenz GAATTC vorkommt. Das entstandene DNA-Fragment endet mit einem einsträngigen Abschnitt AATT (Abb. 5).

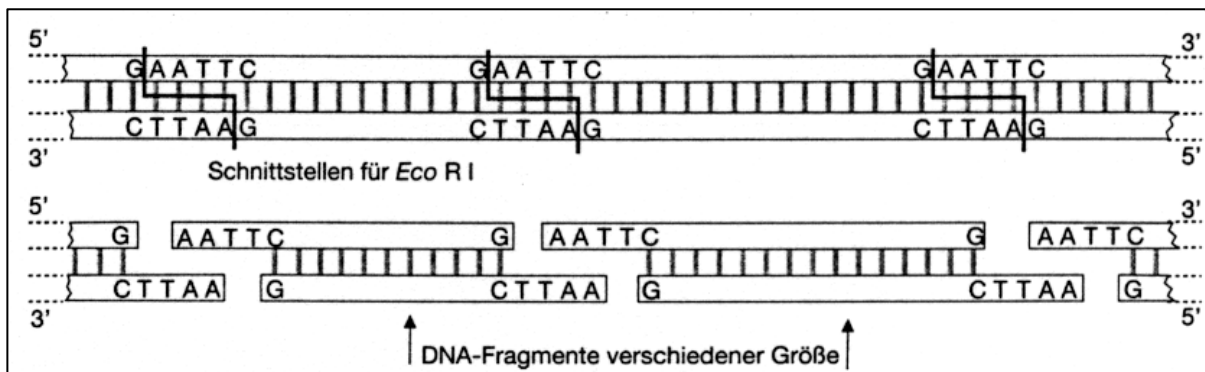


Abb. 5: Spezifische Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme (aus [92]).

3. 6. 3. 2. Restriktionsbehandlung des GP IIIa-Amplifikates mit den Enzymen *Msp* I und *Nci* I

Das amplifizierte DNA-Produkt zum Nachweis des GP IIIa $PI^{A1/A2}$ Genpolymorphismus hat eine Länge von 266 Basenpaaren (bp) [131]. Das Amplifikat wurde mit dem Restriktionsenzym *Msp* I geschnitten. Zusätzlich wurde eine Restriktionsbehandlung mit dem Enzym *Nci* I durchgeführt, um eine mögliche Fehlbestimmung der Genotypen nach alleiniger Behandlung mit *Msp* I, wie dies in einigen Arbeiten beschrieben wurde [72; 115; 118; 131], zu vermeiden.

Das Restriktionsenzym *Msp* I erkennt die Sequenz CCGG und das Restriktionsenzym *Nci* I die Sequenz CCGGG. Die entstandenen DNA-Fragmente enden dann nach Spaltung durch *Msp* I mit den Abschnitten CC bzw. GG und bei Trennung durch *Nci* I mit CC bzw. GGG [118].

Die amplifizierte DNA wurde aliquotiert und anschließend mit *Msp* I (2 U bei 37°C über Nacht), oder *Nci* I (2 U bei 37°C über Nacht) behandelt. Dadurch kam es je nach Allel-Kombination zu verschiedenen, spezifischen Bandenmustern. Nur wenn beide Restriktionsbehandlungen unabhängig voneinander diese typischen Bandenmuster aufwiesen, wurde der jeweilige Genotyp ($PI^{A1/A1}$; $PI^{A1/A2}$; $PI^{A2/A2}$) bestimmt (Abb. 6).

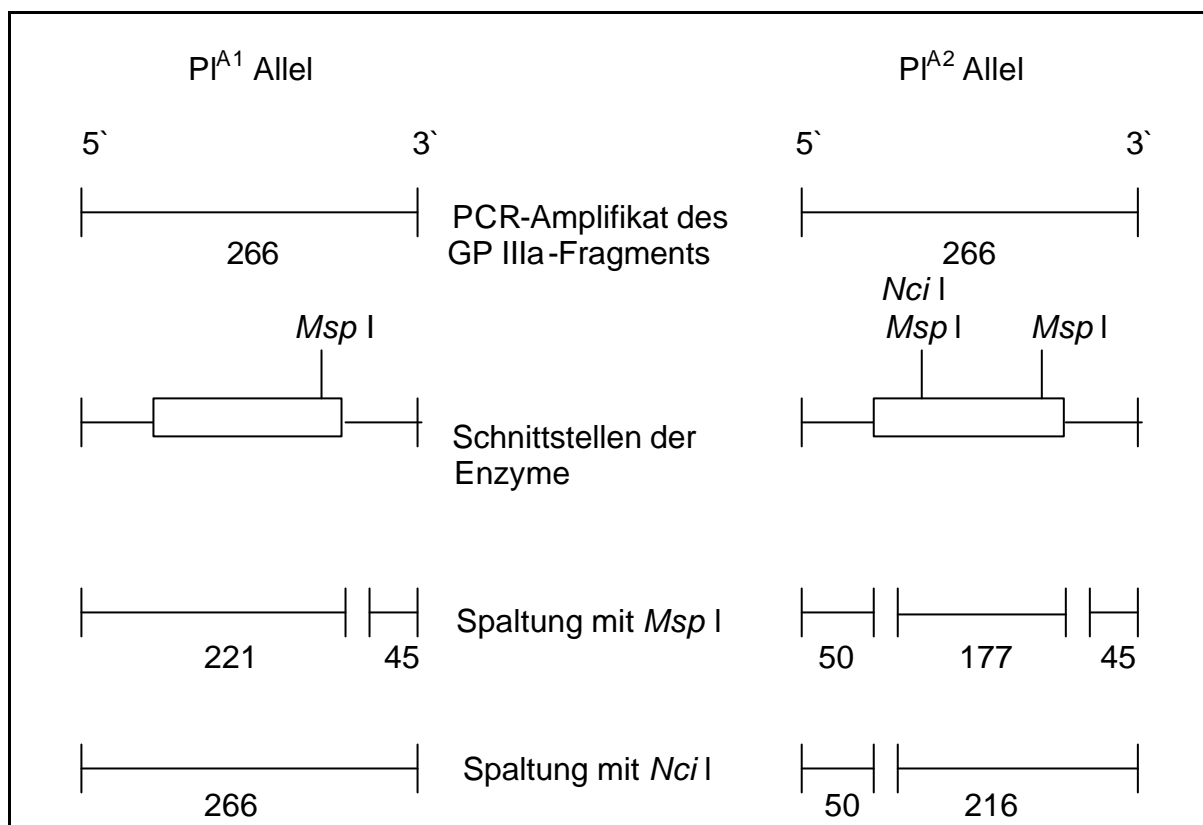


Abb. 6: Schematische Darstellung der Restriktionsbehandlung des amplifizierten GP IIIa-DNA-Fragmentes mit den Enzymen *Msp* I und *Nci* I (aus [131])

Die Abbildung stellt die Restriktionsbehandlung des Exon 2 aus dem Glykoprotein IIIa-Gen durch die Enzyme *Msp* I und *Nci* I dar. In Abhängigkeit von den Allelen PI^{A1} und PI^{A2} ergaben sich unterschiedlich große Fragmente. Die Größen dieser Fragmente sind unter den horizontalen Strichen angegeben (in Basenpaaren)

3. 6. 4. Elektrophoretische Auftrennung und Darstellung der amplifizierten DNA-Fragmente

3. 6. 4. 1. Prinzip der Gel-Elektrophorese

Bei der Gel-Elektrophorese werden verschiedene Substanzgemische im elektrischen Feld (Gleichstrom) getrennt: DNA-Fragmente wandern im elektrischen Feld aufgrund ihrer negativen geladenen Phosphatgruppen zur Anode. Dabei hängt ihre Wanderungsgeschwindigkeit von der Größe der zu trennenden DNA-Moleküle, der Form der Moleküle, der angelegten Spannung, sowie der jeweiligen Porengröße des Gels ab. Kleinere Moleküle wandern dabei im elektrischen Feld schneller als größere DNA-Fragmente.

3. 6. 4. 2. Durchführung der Gel-Elektrophorese

Das amplifizierte DNA-Produkt wurde in einer Gel-Elektrophorese mit 4,5 % NuSieve Agarose mittels Ethidiumbromid als diskrete Bande sichtbar gemacht. Dazu wurden 0,6 g Agarose in 30 ml TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, pH 8,4; 1 mM EDTA) durch Aufkochen in der Mikrowelle vollständig gelöst und nach Abkühlung auf Zimmertemperatur in die Gelkammer gegossen. Das Probenvolumen von jeweils 5 µl wurde mit 1 µl Farbmix (0,6 % Bromphenolblau; 1 mM EDTA; 50% Glycerol) gemischt und davon jeweils 5 µl in jede Geltasche pipettiert. Als Laufpuffer wurde ein TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat; pH 8,4; 1 mM EDTA) benutzt; als Molekulargewichtsmarker diente ein „100 bp Ladder“ von Pharmacia (1:4 Verdünnung mit H₂O), der in einer von den Proben getrennten Spur aufgetragen wurde. Die Elektrophorese erfolgte über 80 min bei 100 V. Das Gel wurde anschließend in Ethidiumbromid (2 µg/ml) für 10 min gefärbt und dann in TAE-Puffer für 10 min entfärbt. Die photographische Dokumentation erfolgte mit einem Polaroidfilm Typ 667 Professional (Blende: 11; Belichtungszeit: 1 sec) (Abb. 7 und 8).

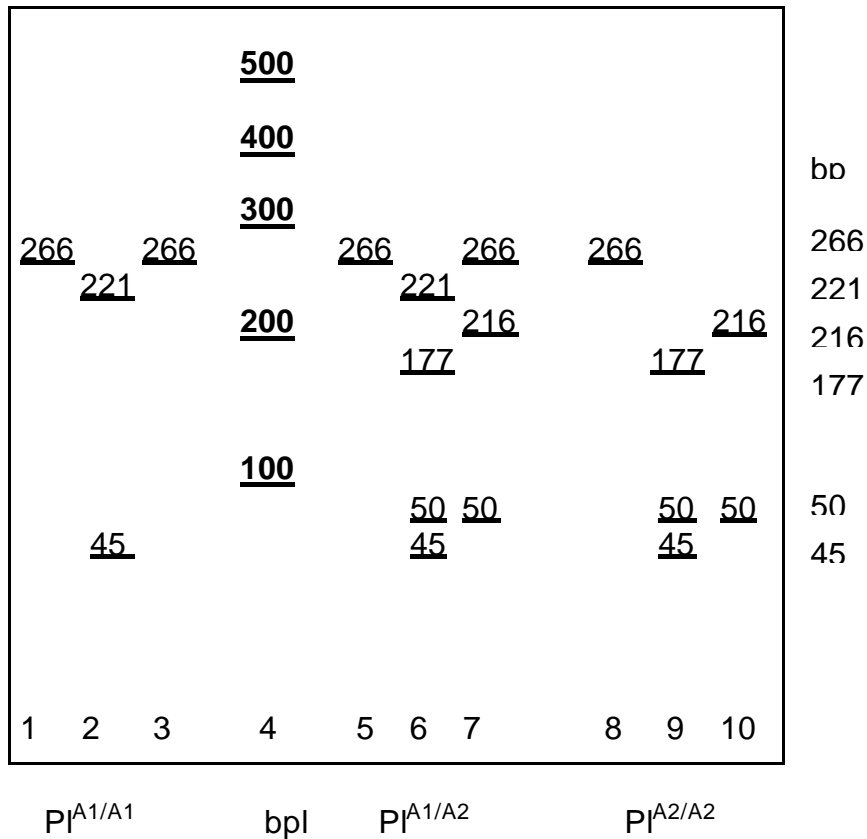


Abb. 7: Schematische Darstellung der Agarose-Gel-Elektrophorese (4,5 % Nu-Sieve Agarose), mit und ohne Spaltung durch die Restriktionsenzyme *Msp* I und *Nci* I

Linie 1, 2, 3 zeigen die Allel-Kombination PI^{A1/A1}, die Linien 5, 6, 7 die Kombination PI^{A1/A2} und die Linien 8, 9, 10 die Kombination PI^{A2/A2}, auf Linie 4 ist die sog. Basenpaarleiter (bpl) dargestellt. Die Linien 1, 5, 8 zeigen unverdaute PCR-Produkte. Linien 2, 6, 9 geben die Längen der Fragmente nach Restriktionsbehandlung durch *Msp* I an. Die Linien 3, 7, 10 zeigen das Ergebnis nach Auftrennung durch das Restriktionsenzym *Nci* I. Die Grösse der einzelnen Fragmente ist jeweils über den dick markierten Strichen angegeben.

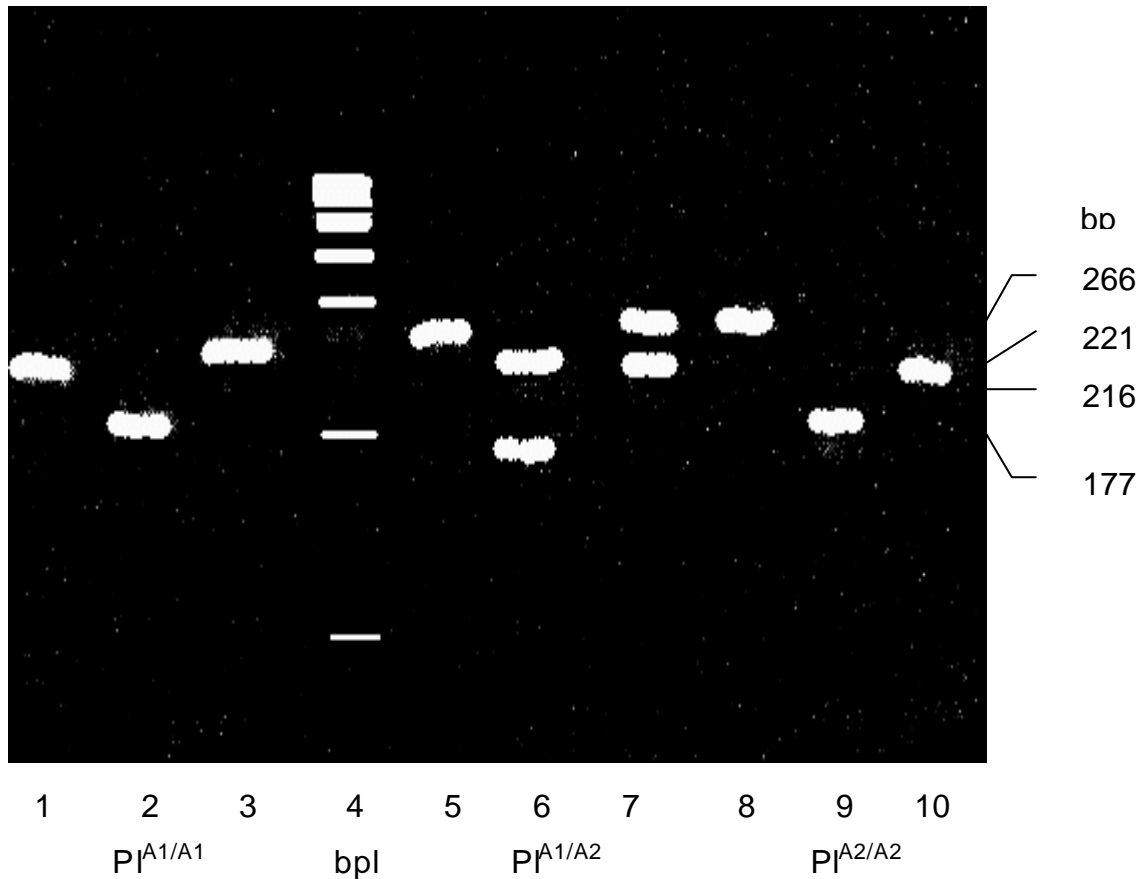


Abb. 8: Photographische Darstellung des PCR-Produktes und der mit Restriktionsenzymen behandelten DNA-Fragmente des GP IIIa Gens nach gelelektrophoretischer Auftrennung

Linie 1, 2, 3 zeigen die Allel-Kombination $PI^{A1/A1}$, die Linien 5, 6, 7 die Kombination $PI^{A1/A2}$ und die Linien 8, 9, 10 die Kombination $PI^{A2/A2}$, auf Linie 4 ist sog. Basenpaarleiter (bpl) dargestellt. Die Banden 1, 5, 8 zeigen das PCR-Produkt. Banden 2, 6, 9 geben die Längen der Fragmente nach Restriktionsbehandlung mit *Msp* I an. Die Banden 3, 7, 10 zeigen das Ergebnis nach Auftrennung durch das Restriktionsenzym *Nci* I.

3. 7. Statistik

Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe von SPSS für Windows (Version 7.52) durchgeführt.

Die Verteilung von kontinuierlichen Variablen wurde mit den Kolmogorov-Smirnov Goodness of Fit Test analysiert. Etablierte Risikofaktoren der KHK und des MI wurden mit der multiplen Regressionsanalyse (Schweregrad der KHK, Gensini Score) oder mit der multiplen logistischen Regression (An/Abwesenheit von KHK, MI) identifiziert. Der χ^2 -Test wurde genutzt, um die Übereinstimmung der Genotypverteilung mit dem Hardy-Weinberg Gleichgewicht zu überprüfen und zu entscheiden, ob es einen signifikanten Unterschied in dem Auftreten der Genotypenfrequenzen zwischen Patienten und Kontrollpersonen gab. Die Beziehung des GP IIIa PIA1/A2 Polymorphismus zum Schweregrad der koronaren Herzkrankheit (KHK, Gensini Score) wurde mittels multivariater Analyse geprüft. Dabei wurden koronare Risikofaktoren, die eine signifikante Assoziation zur KHK zeigten, in die Berechnung mit einbezogen. Die Beziehung des Glykoprotein IIIa PIA1/A2 Genpolymorphismus zum Risiko der KHK und des MI wurde mit Hilfe der multiplen logistischen Regression unter Berücksichtigung der etablierten Risikofaktoren bestimmt. Sog. Odds ratios wurden zur Einschätzung des relativen Risikos des PIA2 Allels zum KHK-Risiko oder MI-Risiko berechnet. Für jede Odds ratio wurde ein zweiseitiger p-Wert und ein 95 %iges Konfidenzintervall unter Berücksichtigung der koronaren Risikofaktoren bestimmt. Ein zweiseitiger p-Wert kleiner als 0,05 wurde als signifikanter Unterschied definiert.

4. Ergebnisse

4. 1. Charakterisierung der Studienpopulation

Die Population der dieser Arbeit zugrunde liegenden Studie setzte sich aus Patienten zusammen, die in der Klinik für Kardiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen oder in der Kerckhoff-Klinik Bad Nauheim stationär aufgenommen worden waren. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich von Mai 1994 bis Juni 1997.

Der $PI^{A1/A2}$ Genpolymorphismus des Glykoproteins IIIa wurde von 2252 männlichen Patienten analysiert, die alle koronarangiographisch untersucht worden waren. Es konnte unterschieden werden zwischen Patienten mit koronarer Herzkrankheit ($n = 1742$) und Patienten ohne KHK ($n = 510$) (Abb. 9).

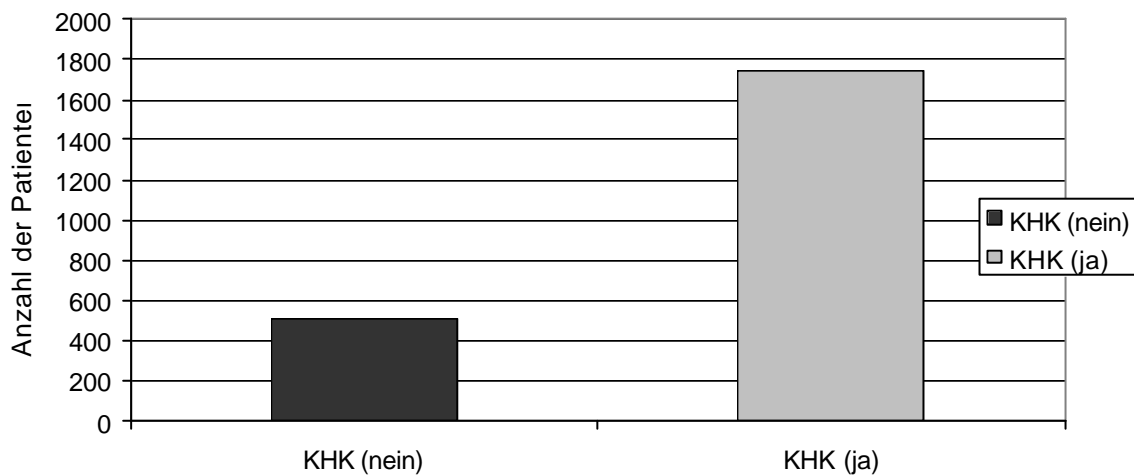


Abb. 9: Koronare Herzkrankheit (ja/nein)

Das Patientenkollektiv bildete 2252 männlichen Patienten. Alle Probanden wurden entweder in der Klinik für Kardiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen oder in der Kerckhoff Klinik Bad Nauheim koronarangiographisch untersucht. Eine Koronargefäßstenosierung $\geq 50\%$ wurde als erkrankt definiert. Abkürzungen: KHK, koronare Herzkrankheit.

Weiter wurden die Patienten in Abhängigkeit von Ihrem Alter in 7 verschiedene Alterskategorien unterteilt (Abb. 10).

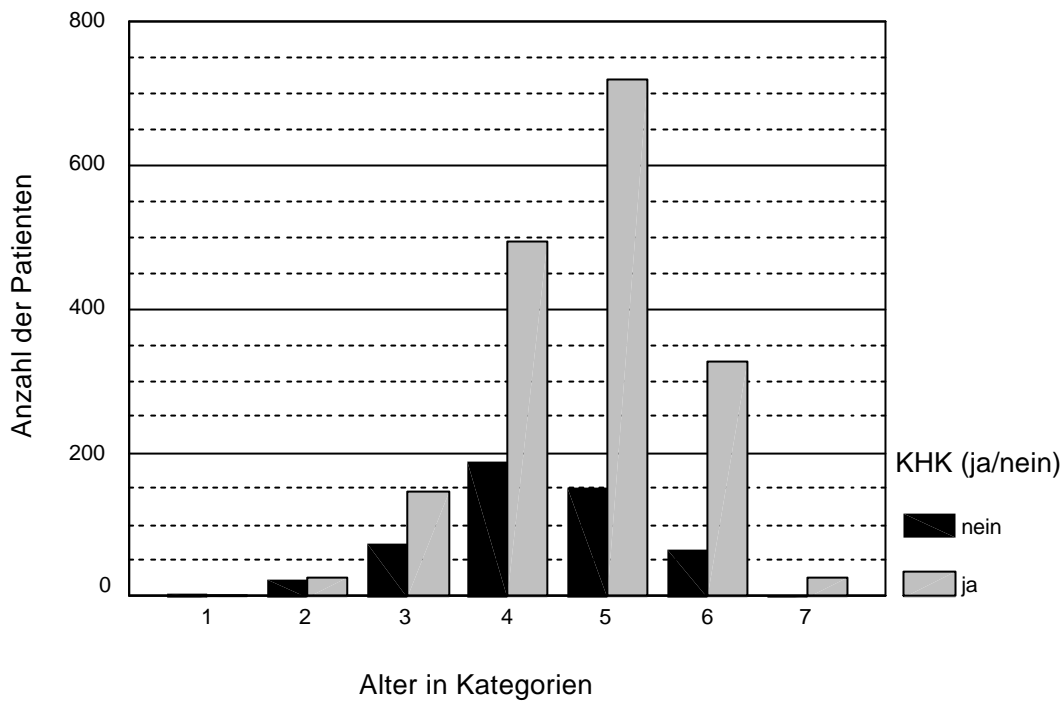


Abb. 10: Koronare Herzkrankheit (ja/nein) in Abhängigkeit vom Alter

Das Patientenkollektiv setzte sich aus 2252 männlichen Patienten zusammen. Alle Probanden wurden entweder in der Klinik für Kardiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen oder in der Kerckhoff Klinik Bad Nauheim koronarangiographisch untersucht. Im Diagramm wurde das Alter der Probanden in 7 Zehnjahreskategorien eingeteilt (Kategorie 1 = 21-30 Jahre, 2 = 31-40 Jahre, 3 = 41-50 Jahre, 4 = 51-60 Jahre, 5 = 61-70 Jahre, 6 = 71-80 Jahre, 7 = 81-90 Jahre). Eine Koronargefäßstenosierung $\geq 50\%$ wurde als erkrankt definiert. Patienten ohne Stenose oder mit einem Stenosegrad $< 50\%$ wurden zur Kontrollgruppe zusammengefasst. Abkürzungen: KHK, koronare Herzkrankheit.

Da alle Patienten koronarangiographiert wurden, konnte die Gesamtpopulation in vier Gruppen aufgeteilt werden. Gruppe I: 510 Patienten ohne Gefäßerkrankung (d. h. Koronarstenosen $< 50\%$), Gruppe II: 452 Patienten mit Eingefäßerkrankung, Gruppe III: 487 Patienten mit Zweigefäßerkrankung und Gruppe IV: 803 Patienten mit Dreigefäßerkrankung (Abb. 11).

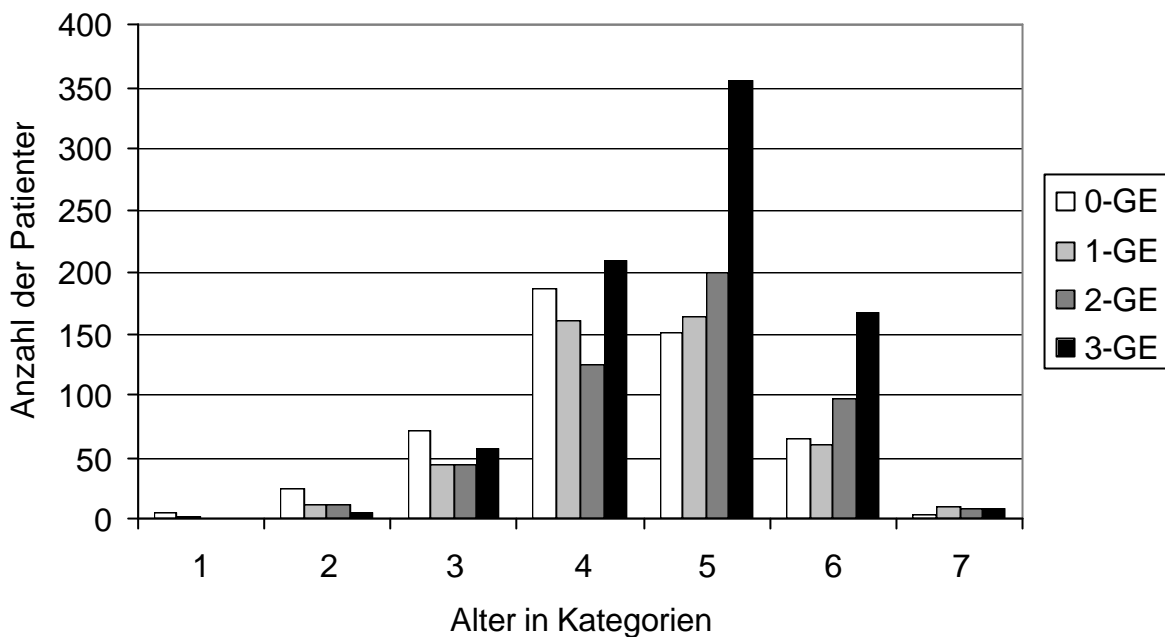


Abb. 11: KHK in Abhängigkeit von der Anzahl der Gefäßstenosierungen und des Alters

Das Patientenkollektiv setzte sich aus 2252 männlichen Patienten zusammen. Jeder wurde in den Kliniken für Kardiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen oder in der Kerckhoff Klinik Bad Nauheim koronarangiographisch untersucht. Die Patienten wurden in sieben Altersklassen unterteilt (Kategorie 1 = 21-30 Jahre, 2 = 31-40 Jahre, 3 = 41-50 Jahre, 4 = 51-60 Jahre, 5 = 61-70 Jahre, 6 = 71-80 Jahre, 7 = 81-90 Jahre). Koronargefäßstenosierung $\geq 50\%$ wurde als erkrankt definiert. Patienten mit einem Stenosegrad $< 50\%$ dienten als Kontrollgruppe. Abkürzungen: GE, Gefäßerkrankung.

Die Studienpopulation konnte zudem eingeteilt werden in eine Gruppe von Patienten, die mindestens einen Myokardinfarkt erlitten hatten ($n = 1061$) und eine Kontrollgruppe ohne Myokardinfarkt ($n = 1191$).

Das Durchschnittsalter der gesamten Population betrug $61,7 \pm 9,7$ Jahre (Mittelwert \pm Standardabweichung). Probanden ohne KHK (Koronargefäßstenosierung $< 50\%$) waren durchschnittlich $58,5 \pm 10,6$ Jahre alt ($n = 510$), Patienten mit Eingefäßerkrankung $61,2 \pm 9,7$ Jahre alt ($n = 452$), Patienten mit Zweigefäßerkrankung $62,5 \pm 9,7$ Jahre alt ($n = 487$) und Patienten mit Dreigefäßerkrankung $63,6 \pm 8,5$ Jahre alt ($n = 803$).

Das Durchschnittsalter der Patienten die mindestens einen Myokardinfarkt erlitten hatten betrug $62,2 \pm 9,5$ Jahre ($n = 1061$), während das der Probanden ohne Myokardinfarkt bei $61,3 \pm 9,9$ Jahren ($n = 1191$) lag (Abb. 12).

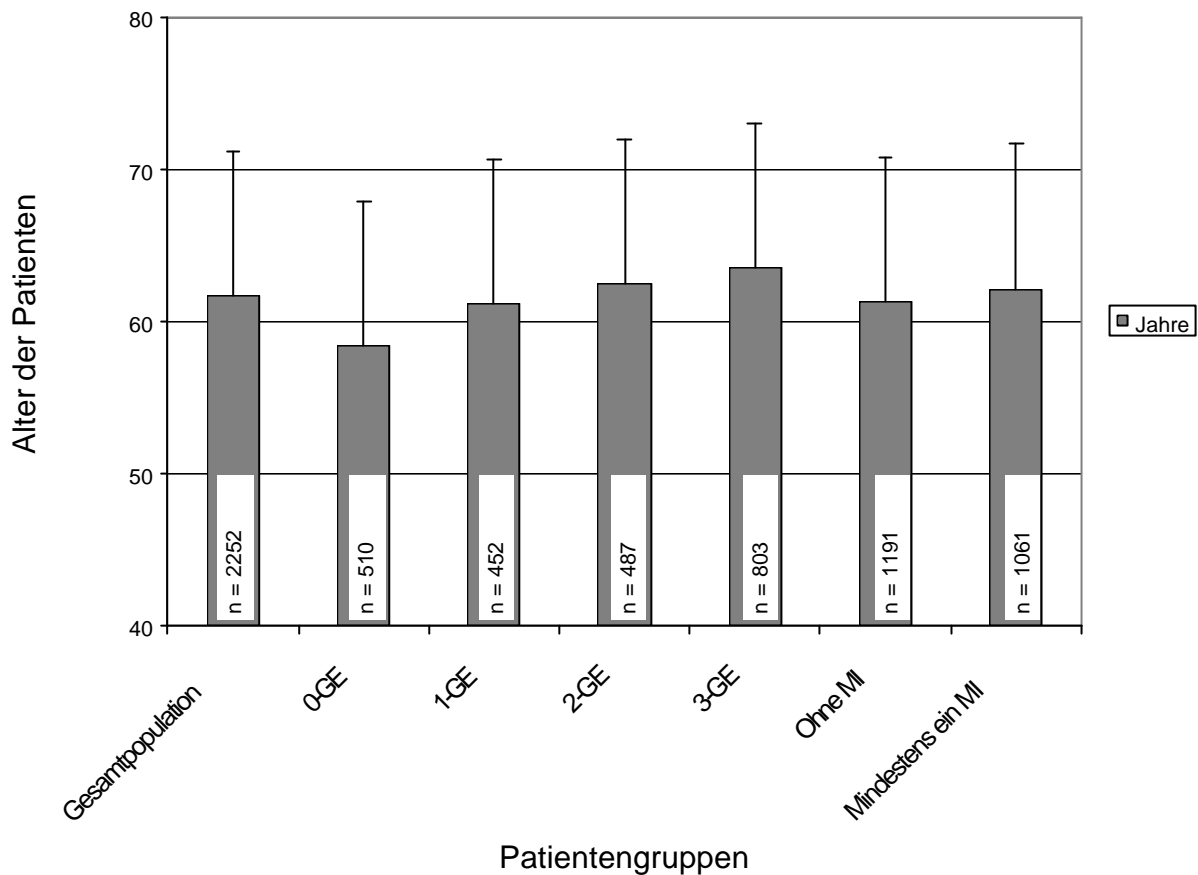


Abb. 12: Vergleich des durchschnittlichen Lebensalters von Probanden ohne und mit koronarer Herzerkrankung bzw. Herzinfarkt

Die Studienpopulation umfasste 2252 männliche Patienten, die in die Kliniken für Kardiologie der Justus-Liebig-Universität Giessen oder in der Kerckhoff Klinik Bad Nauheim stationär zur koronarangiographischen Diagnostik aufgenommen wurden. Die koronare Herzkrankheit wurde durch eine Stenosierung der Herzkranzgefäße $\geq 50\%$ definiert (0-3 Gefäßerkrankung). Die Diagnose des Herzinfarktes erfolgte nach WHO-Kriterien. Es konnte daher unterschieden werden zwischen Personen ohne Myokardinfarkt und Patienten mit mindestens einem Myokardinfarkt. Die Anzahl der Patienten in den jeweiligen Untergruppen ist in den Säulen der Abbildung angegeben. Das Durchschnittsalter der Patienten wurde als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Abkürzungen: GE, Gefäßerkrankung; MI, Myokardinfarkt; n, Anzahl der Patienten.

Es lässt sich also zusammenfassend sagen, dass an dieser Studie teilnehmende Patienten mit Koronargefäßstenosierungen $\geq 50\%$ (Durchschnittsalter $62,4 \pm 9,3$ Jahre) signifikant älter waren als Patienten, die keine arteriosklerotische Herzkranzgefäßveränderungen aufwiesen (Durchschnittsalter $58,5 \pm 10,6$ Jahre; $2p < 0,0001$). Ebenso war das Durchschnittsalter der Patienten mit Myokardinfarkt signifikant älter als das von Patienten ohne Myokardinfarkt ($62,2 \pm 9,5$ vs. $61,3 \pm 9,9$ Jahre) ($2p < 0,001$).

4. 2. Verhältnis zwischen koronarer Herzkrankheit und Myokardinfarkt

Der allgemein anerkannte Zusammenhang zwischen koronarer Herzkrankheit und Myokardinfarkt ließ sich auch in dieser Studienpopulation von 2252 männlichen Patienten deutlich nachweisen ($2p < 0,0001$). Alle 2252 Patienten wurden koronarangiographiert. Koronargefäße ab einem Stenosegrad $\geq 50\%$ wurden als erkrankt definiert und, je nach Lokalisation der Stenose, in Ein- oder Mehrgefäßerkrankung eingeteilt. Alle Patienten wurden zum Zeitpunkt der stationären Aufnahme über Herzinfarkte befragt und diese Angaben wurden anhand bereits vorliegender Krankenunterlagen objektiviert. Von den 1061 Patienten mit mindestens einem Herzinfarkt wiesen 92% ($n = 978$) eine 1- ($n = 214$), 2- ($n = 277$) oder 3-Gefäßerkrankung ($n = 487$) auf gegenüber lediglich 8% ($n = 83$), die keine Gefäßstenose von $\geq 50\%$ hatten (Abb. 13).

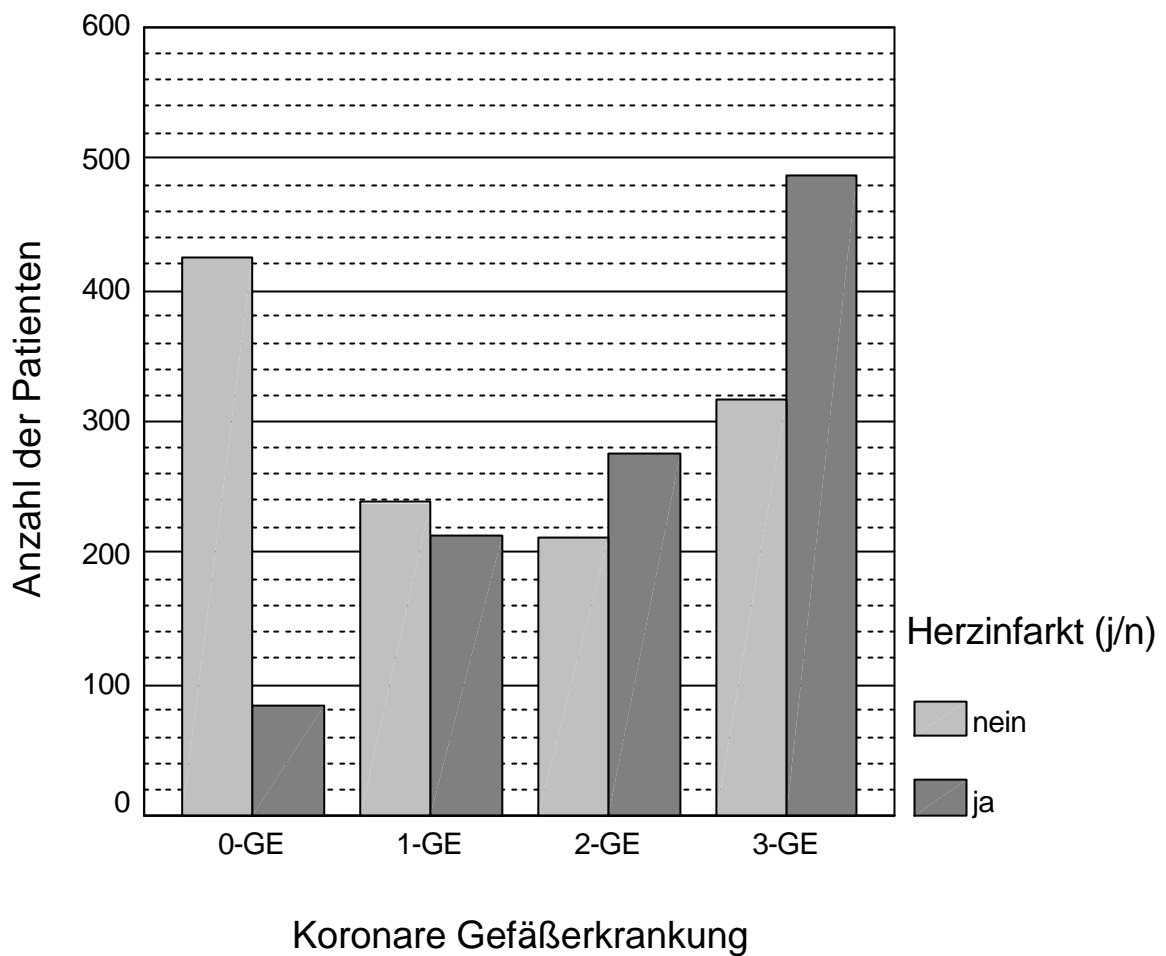
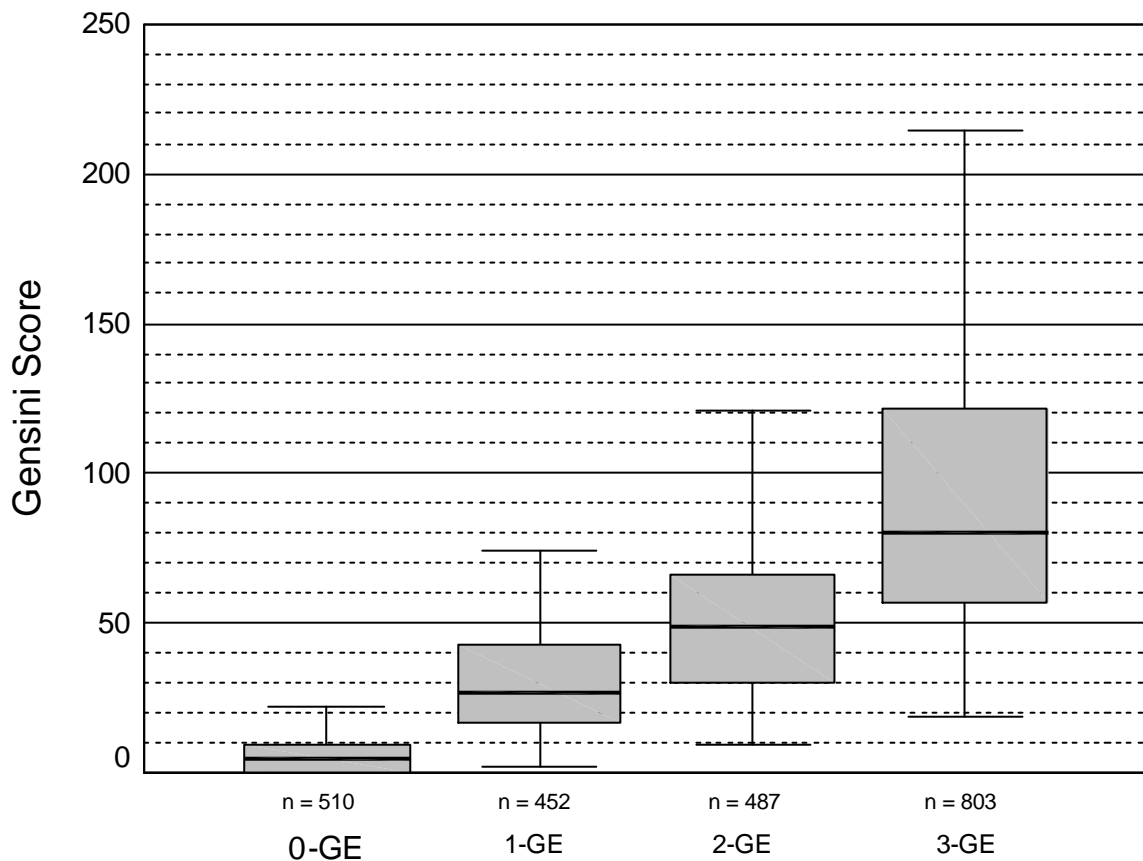


Abb. 13: Beziehung zwischen koronarer Herzkrankheit und Myokardinfarkt

Die Studienpopulation setzte sich aus 2252 Patienten zusammen, die zur koronarangiographischen Diagnostik stationär aufgenommen wurden. Koronargefäße ab einem Stenosierungsgrad $\geq 50\%$ wurden als erkrankt definiert und je nach Lokalisation der Stenosen in Ein- oder Mehrgefäßerkrankungen eingeteilt. Die Diagnose des Herzinfarktes erfolgte nach WHO-Kriterien. Abkürzungen: 0-GE, Patienten ohne Gefäßstenosierung $\geq 50\%$; 1-GE, Patienten mit Eingefäßerkrankung; 2-GE, Patienten mit Zweigefäßerkrankung; 3-GE, Patienten mit Dreigefäßerkrankungen.

Eine genauere Einteilung der koronaren Herzkrankheit hinsichtlich des Ausmaßes der KHK erfolgte durch Berechnung des Gensini Scores (GS). Die Studienpopulation wurde wiederum in Patienten mit Ein- oder Mehrgefäßerkrankung eingeteilt.

Die KHK wurde mit Hilfe des Gensini Score nach Ausmaß und Lokalisation der Koronarstenosierung definiert [42; 43]. Der Gensini Score wurde wie unter 3. 3. beschrieben berechnet. Dieser erstreckte sich in der vorliegenden Studienpopulation von 0 bis 214, der Mittelwert lag bei $52,1 \pm 47,4$ (Abb. 14). Von jedem Stenierungsgrad wurde der Median und die dazu gehörenden 25- und 75 % Perzentile angegeben.



Koronare Gefäßerkrankung

Abb. 14: Verhältnis zwischen koronarer Herzkrankheit und Gensini Score

Der Gensini Score als Parameter zur genauen Einteilung der koronaren Herzkrankheit lag in der vorliegenden Studienpopulation zwischen 0 und 214. Es wurde unterschieden zwischen 0-, 1-, 2- oder 3-Gefäßerkrankung. Der Median in den jeweiligen Gruppen wurde durch einen dicken schwarzen Strich gekennzeichnet. Die 25- und 75 % Perzentile bilden den unteren und oberen Rand des grauen Kasten und die 0- und 100 % Perzentile sind als obere und untere Striche angegeben. Ausreißer und Extremwerte wurden nicht berücksichtigt. Abkürzungen: 0GE, Patienten ohne Gefäßstenosierung ≥ 50 %; 1-GE, Patienten mit Eingefäßerkrankung; 2-GE, Patienten mit Zweigefäßerkrankung; 3GE, Patienten mit Dreigefäßerkrankung; n = Anzahl der Patienten.

Ebenfalls zeigte der Gensini Score einen signifikanten Zusammenhang zum Auftreten eines Myokardinfarktes ($2p < 0,0001$). Während der Gensini Score bei Patienten ohne Myokardinfarkt ($n = 1191$) im Durchschnitt bei $37,8 \pm 41,2$ lag (Median: 24,2), wurde bei Patienten mit mindestens einem Myokardinfarkt ($n = 1061$) ein Gensini Score von $68,1 \pm 48,8$ errechnet (Median: 58,4) (Abb. 15).

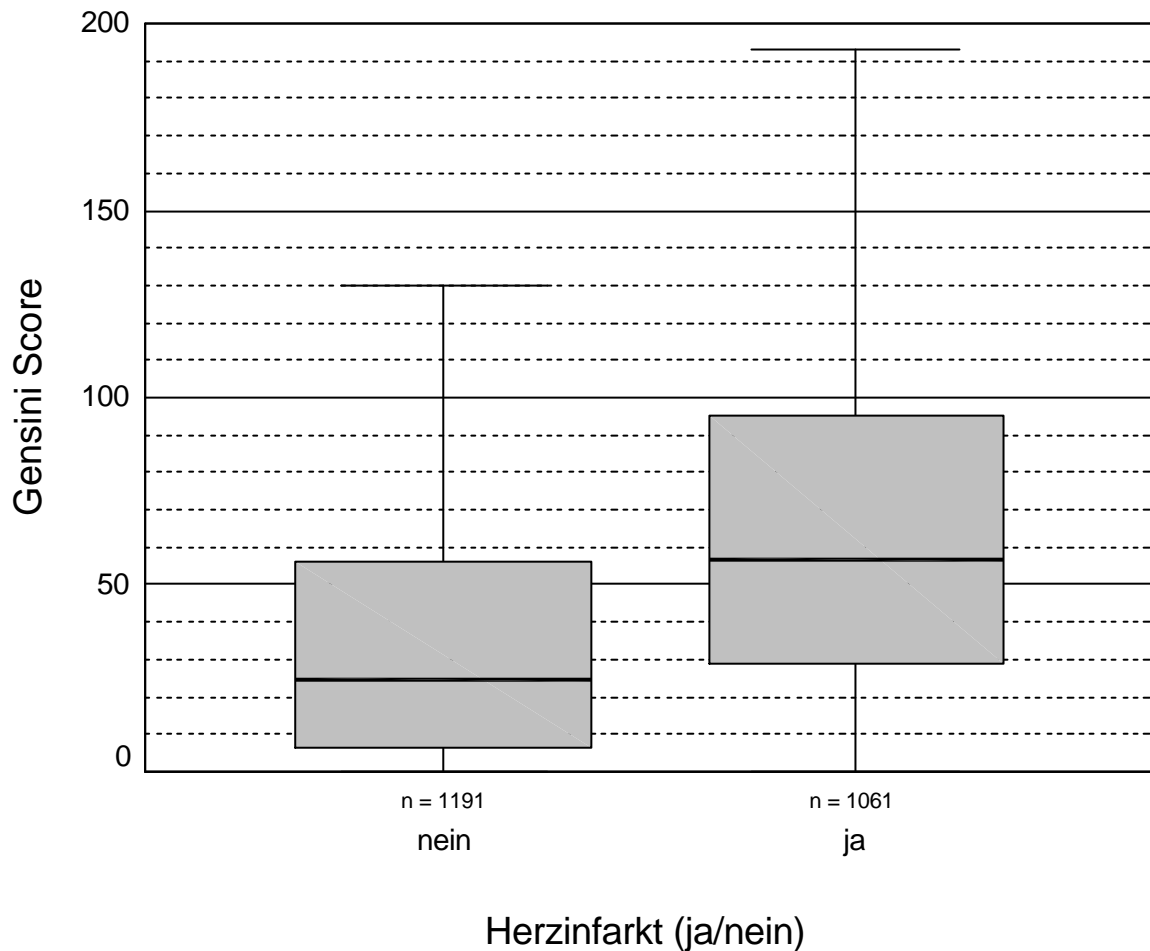


Abb. 15: Verhältnis zwischen Gensini Score und Myokardinfarkt

Die Studienpopulation konnte unterteilt werden in Probanden ohne Myokardinfarkt ($n = 1191$) und in Patienten mit mindestens einem Herzinfarkt ($n = 1061$). Der Median des Gensini Scores in beiden Gruppen wurde als dicke Linie dargestellt. Die 25- und 75 % Perzentile bilden den unteren und oberen Rand des grauen Kastens und die 0- und 100 % Perzentile sind als obere und untere Striche angegeben. Ausreißer und Extremwerte wurden nicht berücksichtigt. Abkürzungen: n, Anzahl der Probanden.

4. 3. Nachweis etablierter Risikofaktoren der koronaren Herzkrankheit und des Myokardinfarktes

In der vorliegenden Studienpopulation (n = 2252) wurde untersucht, in wieweit nicht nur das Alter, sondern andere Parameter wie Body-mass-index (kg/m^2), Rauchen, Diabetes mellitus, Bluthochdruck, Cholesterin, Triglyceride, Apo B, Apo AI, Lp(a) und Fibrinogen als Risikofaktoren der koronaren Herzkrankheit und des Myokardinfarktes identifiziert werden konnten.

Im Vergleich zu den Kontrollpersonen ohne Gefäßstenosierungen ($\geq 50\%$; Kontrollgruppe; n = 510) und KHK-Patienten mit Ein- oder Mehrgefäßerkrankungen (Patienten; n = 1742) errechnete sich für das Alter ($2p < 0,0001$), den Diabetes mellitus in % ($2p < 0,0001$), die Hypertonie in % ($2p < 0,0001$), die behandelte Hypercholesterinämie in % ($2p < 0,0001$), den Apo B-Spiegel ($2p < 0,0001$), den Apo A-I-Spiegel ($2p < 0,0001$), und den Lp(a)-Spiegel ($2p < 0,02$) signifikante Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollgruppe (Tabelle 5).

Im Vergleich zwischen Kontrollpersonen ohne Herzinfarkt (Kontrollgruppe; n = 1191) und Patienten mit mindestens einem Herzinfarkt (Patienten; n = 1061) zeigten sich ebenfalls signifikante Unterschiede für das Alter ($2p < 0,002$), die behandelte Hypercholesterinämie in % ($2p < 0,0005$), den Apo B ($2p < 0,0002$) und den Apo A-I-Spiegel ($2p < 0,0001$). Zusätzlich zeigten sich noch erhöhte Mittelwerte für das Rauchen ($2p < 0,0001$) und für das Fibrinogen ($2p < 0,05$). Dagegen ergaben sich in Bezug auf den Diabetes mellitus, die Hypertonie und den Lp(a)-Spiegel keine signifikanten Unterschiede zwischen den Herzinfarktpatienten und den Kontrollpersonen (Tabelle 6).

Tabelle 5: Risikofaktoren für die koronare Herzkrankheit bei Kontrollpersonen und Patienten

Risikofaktor	Koronare Herzkrankheit		
	<i>Kontrollgruppe (n = 510)</i>	<i>Patienten (n = 1742)</i>	2 p
Alter (Jahre)	58,5 ± 10,6	62,7 ± 9,2	< 0,0001
BMI (kg x m ⁻²)	26,9 ± 3,6	26,9 ± 3,3	n. s.
Rauchen (Pack-Years)	19,1 ± 24	22,9 ± 25	n. s.
Diabetes mellitus in %	12	20	< 0,0001
Hypertonie in %	54	65	< 0,0001
Behandelte Hypercholesterinämie in %	6	16	< 0,0001
Cholesterin (mg x dL ⁻²)	205 ± 44	211 ± 43	n. s.
Triglyceride (mg x dL ⁻²)	143 ± 89	157 ± 92	n. s.
Apo B (g x L ⁻¹)	1,21 ± 0,32	1,30 ± 0,35	< 0,0001
Apo A-I (g x L ⁻¹)	1,47 ± 0,31	1,41 ± 0,29	< 0,0001
Lp(a) (mg x dL ⁻¹)	22 ± 31	30 ± 39	< 0,02
Fibrinogen (g x L ⁻¹)	3,37 ± 1,64	3,50 ± 1,04	n. s.

Alle 2252 Patienten wurden zum Zeitpunkt der stationären Aufnahme über Medikation, Nikotinabusus, Hypertonie und Diabetes mellitus befragt. Hypertonie und Diabetes mellitus wurden jeweils als binäre Variable definiert und nicht in weitere Untergruppen unterteilt. Mit Ausnahme von 18 Patienten handelte es sich bei allen Diabetes mellitus Erkrankungen um den Typ II (n = 405). Menge und Dauer des Zigarettenkonsums wurde als „Pack-Years“ (1 py = 20 Zigaretten/Tag über 1 Jahr) angegeben. Größe und Gewicht der Patienten wurden zum Body-mass-index (kg/m²) umgerechnet. Triglyceride, Cholesterin, Apolipoprotein B (Apo B), Apolipoprotein A-I (Apo A-I), Lipoprotein(a) (LP(a)) und Fibrinogen wurden durch die herkömmlichen Methoden der Klinischen Chemie bestimmt (siehe Methoden). Alle Werte wurden als Mittelwerte ± Standardabweichung oder in Prozent angegeben. Die Beziehung der Risikofaktoren zur KHK wurde durch die multiple logistische Regression berechnet. Abkürzungen: Apo A-I, Apolipoprotein A-I; Apo B, Apolipoprotein B; BMI, Body-mass-index; Lp(a), Lipoprotein(a); n. s., nicht signifikant; n, Anzahl der Patienten.

Tabelle 6: Risikofaktoren für den Myokardinfarkt bei Kontrollpersonen und Patienten

	Myokardinfarkt		
Risikofaktor	Kontrollgruppe (n = 1191)	Patienten (n = 1061)	2 p
Alter (Jahre)	61,3 ± 9,9	62,2 ± 9,5	< 0,002
BMI (kg x m ⁻²)	26,9 ± 3,4	26,9 ± 3,3	n. s.
Rauchen (Pack-Years)	19,9 ± 24,4	24,6 ± 26	< 0,0001
Diabetes mellitus in %	17	19	n. s.
Hypertonie in %	63	61	n. s.
Behandelte Hypercholesterinämie in %	9	18	< 0,0005
Cholesterin (mg x dL ⁻²)	210 ± 43	209 ± 44	n. s.
Triglyceride (mg x dL ⁻²)	152 ± 95	155 ± 88	n. s.
Apo B (g x L ⁻¹)	1,26 ± 0,34	1,29 ± 0,35	< 0,0002
Apo A-I (g x L ⁻¹)	1,45 ± 0,29	1,40 ± 0,29	< 0,0001
Lp(a) (mg x dL ⁻¹)	27,3 ± 37	29,2 ± 36	n. s.
Fibrinogen (g x L ⁻¹)	3,40 ± 1,31	3,56 ± 1,07	< 0,05

Alle 2252 Patienten wurden zum Zeitpunkt der stationären Aufnahme über Medikation, Nikotinabusus, Hypertonie und Diabetes mellitus befragt. Hypertonie und Diabetes mellitus wurden jeweils als binäre Variable definiert und nicht in weitere Untergruppen unterteilt. Mit Ausnahme von 18 Patienten handelte es sich bei allen Diabetes mellitus Erkrankungen um den Typ II (n = 405). Menge und Dauer des Zigarettenkonsums wurde als „Pack-Years“ (1 py = 20 Zigaretten/Tag über 1 Jahr) angegeben. Größe und Gewicht der Patienten wurden zum Body-mass-index (kg/m²) umgerechnet. Triglyceride, Cholesterin, Apolipoprotein B (Apo B), Apolipoprotein A-I (Apo A-I), Lipoprotein(a) (Lp(a)) und Fibrinogen wurden durch die herkömmlichen Methoden der Klinischen Chemie bestimmt (siehe Methoden). Alle Werte wurden als Mittelwerte ± Standardabweichung oder in Prozent angegeben. Die Beziehung der Risikofaktoren zum MI wurde durch die multiple logistische Regression berechnet. Abkürzungen: Apo A-I, Apolipoprotein A-I; Apo B, Apolipoprotein B; BMI, Body-mass-index; Lp(a), Lipoprotein(a); n. s., nicht signifikant; n, Anzahl der Patienten.

4. 4. Verteilung der Glykoprotein IIIa $PI^{A1/A2}$ Genotypen in der Studienpopulation

Der Genpolymorphismus des Glykoprotein IIIa unterscheidet drei verschiedene Genotypen ($PI^{A1/A1}$; $PI^{A1/A2}$; $PI^{A2/A2}$). In der vorliegenden Studienpopulation verteilten sich diese drei Genotypen zu 73,1 % (n = 1646) auf den $PI^{A1/A1}$ Genotyp, zu 24,8 % (n = 559) auf den $PI^{A1/A2}$ Genotyp und zu 2,1 % (n = 47) auf den $PI^{A2/A2}$ Genotyp (Tabelle 7 und Abb. 16).

Tabelle 7: Verteilung der GP IIIa $PI^{A1/A2}$ Genotypen in der Studienpopulation

	Glykoprotein IIIa $PI^{A1/A2}$ Genotyp		
	$PI^{A1/A1}$	$PI^{A1/A2}$	$PI^{A2/A2}$
Nachweis PCR	73,1 % (n = 1646)	24,8 % (n = 559)	2,1 % (n = 47)

Die GP IIIa Genotypen wurden mittels PCR analysiert. Nach Behandlung des PCR-Produktes mit den Restriktionsenzymen erfolgte die Trennung der DNA-Fragmente durch die Gel-Elektrophorese (siehe Methodenteil). Der GP IIIa $PI^{A1/A2}$ -Genpolymorphismus ist durch eine Punktmutation im Exon 2 an Position 1565 (Austausch eines T in ein C) charakterisiert. Er unterteilt sich in die drei verschiedenen Genotypen: $PI^{A1/A1}$; $PI^{A1/A2}$; $PI^{A2/A2}$. Abkürzungen: n, Anzahl der Patienten.

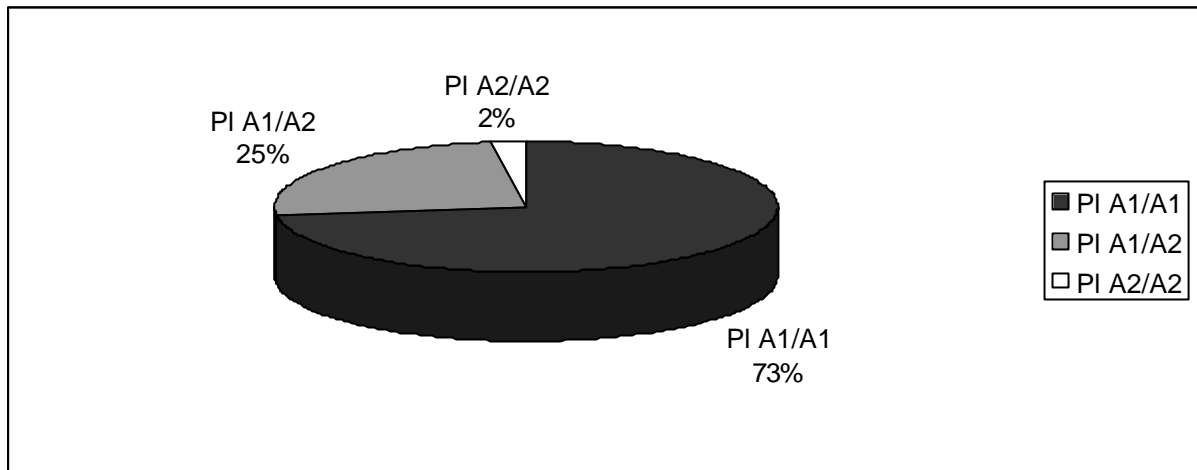


Abb. 16: Graphische Darstellung der Verteilung der GP IIIa PI^{A1/A2} Genotypen in der Studienpopulation

Die GP IIIa Genotypen wurden mittels PCR analysiert. Nach Behandlung des PCR-Produktes mit den Restriktionsenzymen erfolgte die Trennung der DNA-Fragmente durch die Gel-Elektrophorese (siehe Methodenteil). Der GP IIIa PI^{A1/A2} Genpolymorphismus ist durch eine Punktmutation im Exon 2 an Position 1565 (Austausch eines T in ein C) charakterisiert. Er unterteilt sich in die drei verschiedenen Genotypen: PI^{A1/A1}; PI^{A1/A2}; PI^{A2/A2}. Die Prozentangaben aus Tabelle 7 wurden auf ganze Zahlen gerundet.

4. 5. Etablierte koronare Risikofaktoren in Abhängigkeit von den GP IIIa PI^{A1/A2} Genotypen

Die Studienpopulation von 2252 männlichen Patienten wurde auf die Verteilung der etablierten Risikofaktoren der koronaren Herzkrankheit bzw. des Myokardinfarktes (Alter, Cholesterin, Triglyceride, Apo B, Apo A-I, Lp(a), Fibrinogen, Hypertonie, Bodymass-index und Zigarettenkonsum) zwischen den Gruppen der drei verschiedenen GP IIIa PI^{A1/A2} Genotypen untersucht. Nahezu signifikante Unterschiede ergaben sich beim Alter ($2p = 0,058$) (Tabelle 8). Dagegen wiesen die drei GP IIIa PI^{A1/A2} Genotypen keine unterschiedlichen Werte in Bezug auf alle anderen Parameter auf (Tabelle 8).

Tabelle 8: Etablierte Risikofaktoren der KHK bzw. des Myokardinfarkts in Abhängigkeit von den GP IIIa Genotypen

	GP IIIa $PI^{A1/A2}$ Genotyp			
	$PI^{A1/A1}$ (n = 1646)	$PI^{A1/A2}$ (n = 559)	$PI^{A2/A2}$ (n = 47)	2 p
Alter (Jahre)	61,4 ± 9,9	62,5 ± 9,5	63,0 ± 7,3	0,058
Cholesterin (mg/dl)	210 ± 43	208 ± 44	221 ± 41	0,183
Triglyceride (mg/dl)	155 ± 93	150 ± 84	166 ± 123	0,387
Apo A-I (g/l)	1,43 ± 0,30	1,41 ± 0,28	1,40 ± 0,28	0,311
Apo B (g/l)	1,28 ± 0,34	1,26 ± 0,35	1,34 ± 0,30	0,172
Lp(a) (mg/dl)	28 ± 37	27 ± 38	35 ± 43	0,380
Fibrinogen (g/l)	3,46 ± 1,03	3,55 ± 1,64	3,08 ± 0,58	0,423
Diabetes mellitus in %	18	19	21	0,442
Hypertonie in %	61	65	60	0,307
BMI (kg/m ²)	26,9 ± 3,4	26,8 ± 3,2	26,6 ± 3,6	0,506
Nikotinabusus (py)	21 ± 27	21 ± 26	21 ± 26	0,590

Von 2252 Patienten wurden Angaben über Alter, Nikotinabusus und Hypertonie zum Zeitpunkt der stationären Aufnahme anamnestisch erhoben. Menge und Dauer des Zigarettenkonsums wurden als „Pack-Years“ angegeben (1 py = 20 Zigaretten/Tag über ein Jahr). Größe und Gewicht wurden zum Body-mass-index (kg/m²) umgerechnet. Die Serumkonzentrationen von Cholesterin, Triglyceride, Apo A-I, Apo B, Lp(a) und Fibrinogen (in mg/dl bzw. in g/l) wurden gemessen (siehe Methoden).

Alle kontinuierlichen Parameter wurden als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben. Hypertonie wurde als binäre Variable definiert und als relative Häufigkeit der Patienten in % angegeben. Die GP IIIa Genotypen wurden mittels PCR analysiert. Nach Behandlung des PCR-Produktes mit den Restriktionsenzymen erfolgte die Trennung der DNA-Fragmente durch die Gel-Elektrophorese (siehe Methodenteil). Abkürzungen: Apo A-I, Apolipoprotein A-I; Apo B, Apolipoprotein B; Lp(a), Lipoprotein(a); py, Pack-Years; n, Anzahl der Patienten.

Gleiche Analysen wurden in den KHK-Untergruppen (1- bis 3-Gefäßerkrankung), des Myokardinfarkts (Patientengruppe ohne und mit Herzinfarkt) und in der Kontrollgruppe (Patienten mit Gefäßstenosen < 50 %) durchgeführt. In jeder der genannten Untergruppen wurden nahezu identische Durchschnittswerte beobachtet (Ergebnisse nicht dargestellt).

4. 6. Beziehung zwischen dem GP IIIa $PI^{A1/A2}$ Genpolymorphismus und der koronaren Herzkrankheit

In der gesamten Studienpopulation von 2252 männlichen Patienten wurden die PI^{A1} - und PI^{A2} -Allelfrequenzen zwischen Personen mit 0-Gefäßerkrankungen (n = 510) und Patienten mit 1- (n = 452), 2- (n = 487) und 3-Gefäßerkrankung (n = 803) verglichen.

Die koronare Herzkrankheit wurde zum einen über den Gefäßstatus der Probanden ab einem Stenosegrad der Herzkranzgefäße $\geq 50\%$ und zum anderen über den Gensini Score definiert. Es zeigte sich, dass der GP IIIa $PI^{A1/A2}$ Genpolymorphismus weder mit dem KHK-Risiko (Ein-, Zwei-, oder Dreigefäßerkrankung) ($2p = 0,15$), noch mit dem KHK-Schweregrad, definiert nach der Anzahl der erkrankten Gefäße, assoziiert ($2p = 0,14$) war (Tabelle 9).

Tabelle 9: Verteilung der Glykoprotein IIIa $PI^{A1/A2}$ Genotypen in Probanden ohne Gefäßerkrankung und in Patienten mit koronarer Herzkrankheit

	Glykoprotein IIIa $PI^{A1/A2}$ Genotypen			
Kontrolle/Patiente <i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i> ($PI^{A1}PI^{A1}$)	<i>n</i> ($PI^{A1}PI^{A2}$)	<i>n</i> ($PI^{A2}PI^{A2}$)
KHK				
0-GE	510	386 (0,757)	112 (0,220)	12 (0,023)
1-GE	452	340 (0,752)	104 (0,230)	8 (0,018)
2-GE	487	364 (0,747)	119 (0,244)	4 (0,008)
3-GE	803	556 (0,692)	224 (0,279)	23 (0,029)

		$PI^{A1/A2}$ Allele	
Kontrolle/Patienten	<i>n</i>	PI^{A1} (95% KI)	PI^{A2} (95% KI)
KHK			
0-GE	510	0,87 (0,85-0,89)	0,13 (0,11-0,15)
1-GE	452	0,87 (0,85-0,89)	0,13 (0,11-0,15)
2-GE	487	0,87 (0,85-0,89)	0,13 (0,11-0,15)
3-GE	803	0,83 (0,81-0,85)	0,17 (0,15-0,19)

Die koronare Herzkrankheit wurde über den durch die Koronarangiographie bestimmten Gefäßstatus definiert. Es konnten Patientengruppen ohne Gefäßerkrankung, d. h. Koronargefäßstenosierungen < 50 % und Patientengruppen mit Ein-, Zwei-, oder Dreifäßerkrankung unterschieden werden. Zum Nachweis des Genpolymorphismus siehe Methoden. Die Konfidenzintervalle sind in Klammern angegeben. Abkürzungen: 1-GE, Eingefäßerkrankung; 2-GE, Zweifäßerkrankung; 3-GE, Dreifäßerkrankung; KI, Konfidenzintervall; n, Anzahl der Patienten.

Auch bei Definition der koronaren Herzkrankheit anhand des Gensini Scores konnte keine Assoziation zwischen dem $PI^{A1/A2}$ Genpolymorphismus und dem KHK-Schweregrad gefunden werden ($2p = 0,077$).

In der Gesamtpopulation errechnete sich für den $PI^{A1/A1}$ Genotyp ein Durchschnittswert des Gensini Score von $51 \pm 0,9$ ($n = 1646$; Mittelwert \pm Standardabweichung), für den $PI^{A1/A2}$ Genotyp von $66,5 \pm 2$ ($n = 559$) und für den $PI^{A2/A2}$ Genotyp von $52,1 \pm 8,9$ ($n = 47$). Darüber hinaus konnte auch in den Untergruppen der KHK nahezu gleiche Durchschnittswerte des Gensini Score bei den GP IIIa Genotypen beobachtet werden (Tabelle 10) (Abb. 17).

Tabelle 10: Vergleich der Gensini Scores zwischen den GP IIIa $PI^{A1/A2}$ Genotypen in der Gesamtpopulation und bei Patienten mit und ohne koronare Herzkrankheit

	Gensini Score		
	$PI^{A1/A1}$ (n)	$PI^{A1/A2}$ (n)	$PI^{A2/A2}$ (n)
Gesamt-population	$51 \pm 0,9$ (1646)	$66,5 \pm 2$ (559)	$52,1 \pm 8,9$ (47)
0-GE	6 ± 8 (386)	7 ± 13 (112)	5 ± 3 (12)
1-GE	32 ± 24 (340)	$31,5 \pm 26,5$ (104)	$21,0 \pm 14$ (8)
2-GE	55 ± 33 (364)	$54,5 \pm 33,5$ (119)	41 ± 20 (4)
3-GE	90 ± 44 (556)	94 ± 52 (224)	89 ± 56 (23)

Der Gensini Score wurde nach Lokalisation und Schweregrad der Koronarstenosen - wie im Methodenteil beschrieben - berechnet und als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Koronargefäße ab einem Stenosegrad $\geq 50\%$ wurden für die Bestimmung des Gefäßstatus (0- bis 3-Gefäßerkrankung) als erkrankt definiert. Die Gesamtpopulation umfasste 2252 männliche koronarangiographierte Patienten. Die GP IIIa Genotypen wurden mittels PCR analysiert. Nach Behandlung des PCR-Produktes mit den Restriktionsenzymen erfolgte die Trennung der DNA-Fragmente durch die Gel-Elektrophorese (siehe Methodenteil). Es konnten drei verschiedene GP IIIa-Genotypen unterschieden werden ($PI^{A1/A1}$; $PI^{A1/A2}$; $PI^{A2/A2}$). Abkürzungen: GE, Gefäßerkrankung; n, Anzahl der Patienten.

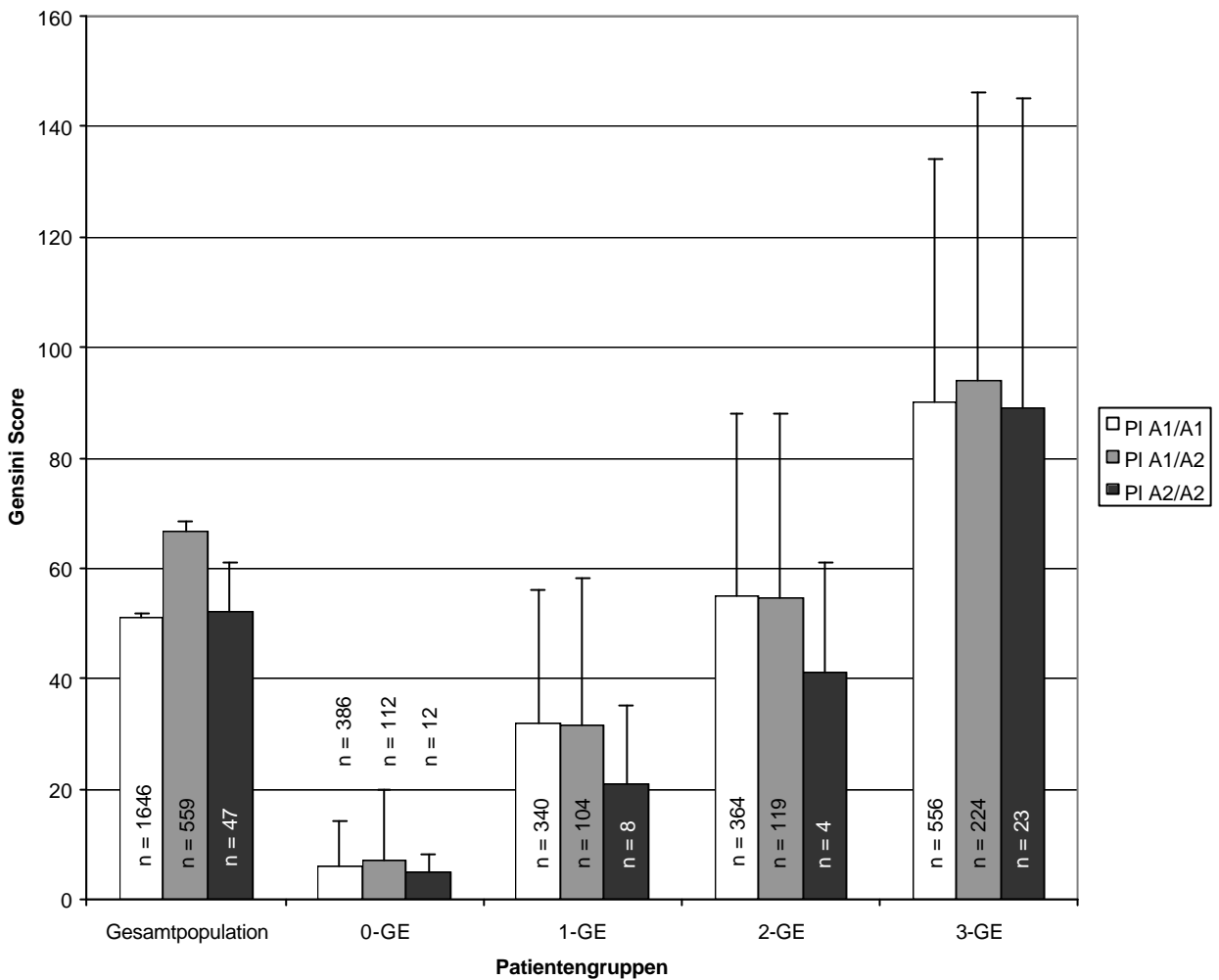


Abb. 17: Graphische Darstellung der durchschnittlichen Gensini Scores der GP IIIa PI^{A1/A2} Genotypen in der Gesamtpopulation und bei Patienten ohne und mit koronarer Herzkrankheit

Der Gensini Score wurde nach Lokalisation und Schweregrad der Koronarstenosen -wie im Methodenteil beschrieben- berechnet und als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Die Anzahl der Patienten in den jeweiligen Gruppen wurde in bzw. über den Säulen angegeben. Koronargefäße ab einem Stenosegrad $\geq 50\%$ wurden für die Bestimmung des Gefäßstatus (0- bis 3-Gefäßerkrankung) als erkrankt definiert. Die Assoziation zwischen dem GP IIIa Genotyp und dem Gensini Score in der Gesamtpopulation und in den Untergruppen der koronaren Herzkrankheit (0- bis 3-Gefäßerkrankung) wurde mit der multiplen Regression überprüft. Abkürzungen: GE, Gefäßerkrankung; n, Anzahl der Patienten.

4. 7. Korrelation zwischen GP IIIa Genotypen und koronarer Herzkrankheit in Niedrig- und Hochrisiko-Gruppen

In der vorliegenden Studie wurden sog. Niedrigrisiko- und Hochrisiko-Gruppen definiert (siehe Methoden), die also in Bezug auf etablierte Risikofaktoren der koronaren Herzerkrankheit ein geringeres oder höheres Erkrankungsrisiko aufwiesen.

Diese Kollektive wurden auf eine mögliche Assoziation zwischen dem GP IIIa $PI^{A1/A2}$ Genpolymorphismus und der koronaren Herzkrankheit untersucht. Nach Ausschluss von Patienten mit einem hohen BMI ($> 26,9 \text{ kg/m}^2$, Mittelwert der Gesamtpopulation) konnte eine Assoziation zwischen dem Gensini Score und dem GP IIIa $PI^{A1/A2}$ Genpolymorphismus festgestellt werden ($2p < 0,05$). Dabei wiesen $PI^{A2/A2}$ Homozygote die höchsten, und Träger des $PI^{A1/A1}$ Genotyp die niedrigsten Gensini Scores auf (Abb. 18). Ebenfalls bei Patienten mit einem hohen Apo A-I Wert ($> 1,43 \text{ g/l}$, Mittelwert der Gesamtpopulation) konnten gleichartige Unterschiede festgestellt werden ($2p < 0,02$) (Abb. 18). Unterschiede in Bezug auf den Gensini Score wurden ebenfalls beobachtet, wenn beide Kriterien - niedriger BMI und hoher Apo A-I Spiegel - zur Definition einer Niedrigrisiko-Gruppe zugrunde gelegt wurden ($2p < 0,02$) (Abb. 18).

In anderen Niedrigrisiko-Gruppen und auch in sämtlichen Hochrisiko-Gruppen hatten Träger des $PI^{A1/A2}$ oder $PI^{A2/A2}$ Genotyps kein erhöhtes Risiko gegenüber GP IIIa $PI^{A1/A1}$ Homozygoten (Ergebnisse nicht dargestellt).

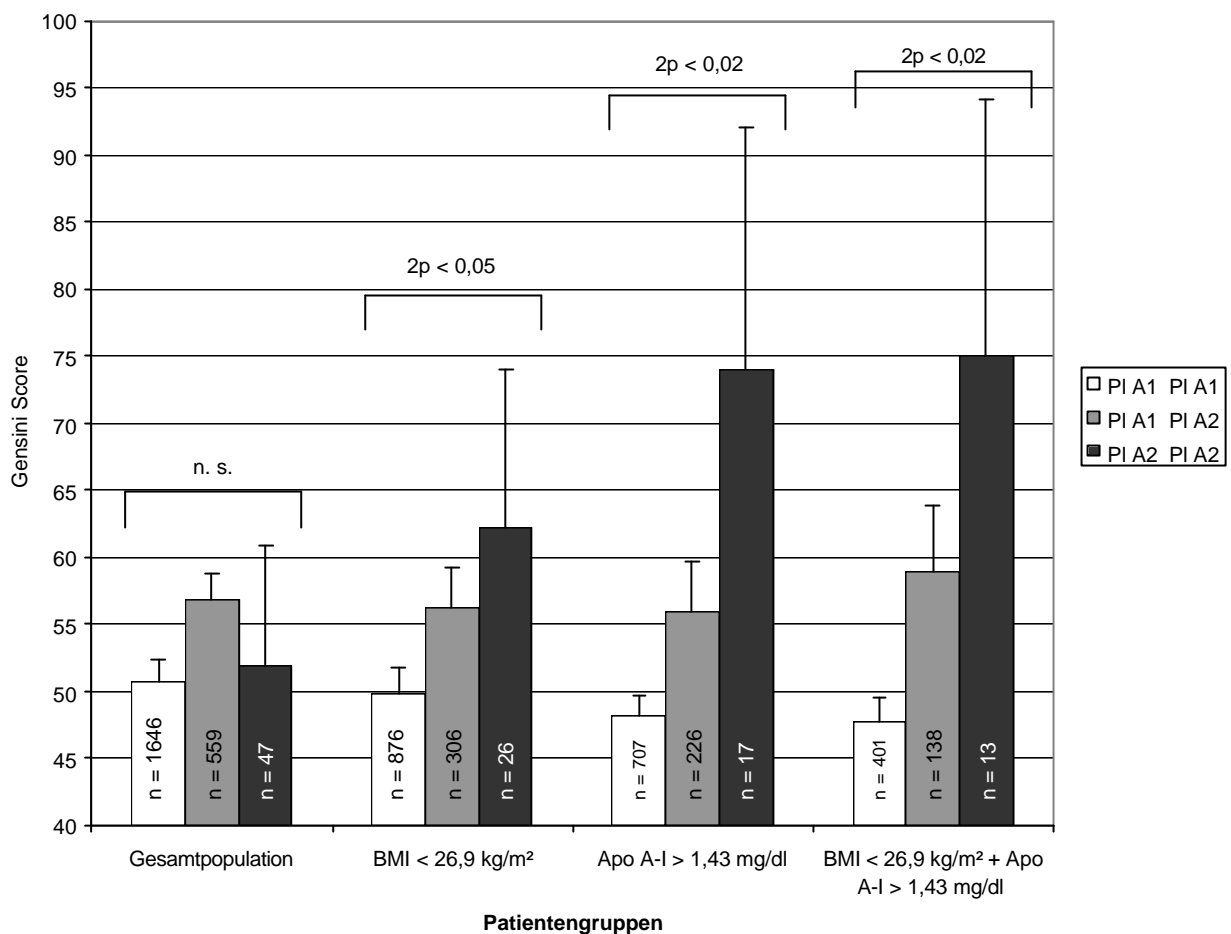


Abb. 18: Vergleich der Gensini Scores zwischen den GP IIIa PI^{A1/A2} Genotypen in verschiedenen Niedrigrisiko-Gruppen

Die Niedrigrisiko-Gruppen wurden über einen niedrigen BMI und/oder über einen hohen Apo A-I Wert definiert. Dabei wurde für beide Parameter jeweils der Mittelwert der Gesamtpopulation zugrunde gelegt. Die Gensini Scores sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mit der multiplen Regression unter Berücksichtigung der etablierten KHK Risikofaktoren. Die Anzahl der Probanden ist in den Säulen angegeben. Abkürzungen: BMI, Body-mass-index; Apo A-I, Apolipoprotein A-I; n, Anzahl der Patienten

4. 8. Verhältnis zwischen GP IIIa $PI^{A1/A2}$ Genotyp und Myokardinfarkt

In der Gesamtpopulation konnte kein Unterschied der GP IIIa $PI^{A1/A2}$ Genotyphäufigkeiten zwischen Personen ohne Herzinfarkt (n = 1191) und mit Herzinfarkt (n = 1061) beobachtet werden. Die relativen Häufigkeiten der drei GP IIIa $PI^{A1/A2}$ Genotypen waren in diesen beiden Gruppen jeweils nahezu identisch verteilt (Tabelle 11).

Tabelle 11: Verteilung der GP IIIa $PI^{A1/A2}$ Genotypen bei Patienten ohne oder mit Herzinfarkt

		Glykoprotein IIIa $PI^{A1/A2}$ Genotypen		
Kontrolle/Patienten	n	n ($PI^{A1}PI^{A1}$)	n ($PI^{A1}PI^{A2}$)	n ($PI^{A2}PI^{A2}$)
Anzahl der Myokardinfarkte				
Kein MI	1191	863 (0,725)	297 (0,249)	31 (0,026)
1-3 MI	1061	783 (0,738)	262 (0,247)	16 (0,015)

		$PI^{A1/A2}$ Allele	
Kontrolle/Patienten	n	PI^{A1} (95% KI)	PI^{A2} (95% KI)
Anzahl der Myokardinfarkte			
Kein MI	1191	0,85 (0,83-0,86)	0,15 (0,14-0,17)
1-3 MI	1061	0,86 (0,85-0,88)	0,14 (0,12-0,15)

Die Studienpopulation konnte in 2 Gruppen bestehend aus Probanden ohne Herzinfarkt (MI = 0, n = 1191) und in Herzinfarktpatienten (MI = 1-3, n = 1061) eingeteilt werden. Die Konfidenzintervalle wurden in Klammern angegeben. Abkürzungen: Kein MI, Personen ohne Myokardinfarkt; 1-3 MI, Patienten mit einem bis zu drei Myokardinfarkten; KI, Konfidenzintervall; n, Anzahl der Patienten.

Man kann also schlussfolgernd sagen, dass das PI^{A2} Allel bei Patienten mit Herzinfarkt nicht häufiger auftrat als bei Patienten ohne Herzinfarkt.

4. 9. Korrelation zwischen GP IIIa $PI^{A1/A2}$ Genotyp und Myokardinfarkt in Niedrig- und Hochrisiko-Gruppen

In Analogie zur KHK als klinische Manifestation wurde die Gesamtpopulation auch für die Assoziationsanalysen zum Herzinfarkt in Niedrig- und Hochrisiko-Gruppen unterteilt.

So wurde zum Beispiel untersucht, ob in Abhängigkeit vom Alter der Patienten eine Assoziation zwischen dem $PI^{A1/A2}$ Genpolymorphismus des GP IIIa Gens und dem Myokardinfarkttrisiko bestand. Bei einem Durchschnittsalter der Patienten von 62,2 Jahren wurde das Probandenkollektiv in Patienten, die jünger ($n = 1069$) bzw. älter als 62 Jahre ($n = 1183$) waren, aufgeteilt.

Sowohl in der Gruppe der jüngeren als auch der älteren Patienten konnte keine Assoziation zwischen dem GP IIIa $PI^{A1/A2}$ Genotypus und dem Myokardinfarkttrisiko nachgewiesen werden. Im Vergleich zwischen Probanden ohne Herzinfarkt zu Patienten mit Herzinfarkt konnten in beiden Altersgruppen annähernd identische PI^{A2} Allelfrequenzen festgestellt werden (Tabelle 12).

Tabelle 12: Verteilung der GP IIIa P^{A1/A2} Allele zwischen Probanden ohne und mit Herzinfarkt unter bzw. über 62 Jahren

Alter ³ 62 Jahre		P^{A2} Allel		Gesamt	Signifikanz 2p	
		Nein	Ja			
Herzinfarkt (Ja/Nein)	Nein	Anzahl Erwartete Anzahl	428 436,5	181 172,5	609 609,0	0,273
	Ja	Anzahl Erwartete Anzahl	420 411,5	154 162,5		
Gesamt		Anzahl Erwartete Anzahl	848 848,0	335 335,0	1183 1183,0	

Alter < 62 Jahre		P^{A2} Allel		Gesamt	Signifikanz 2p	
		Nein	Ja			
Herzinfarkt (Ja/Nein)	Nein	Anzahl Erwartete Anzahl	435 434,5	147 147,5	582 582,0	0,944
	Ja	Anzahl Erwartete Anzahl	363 363,5	124 123,5		
Gesamt		Anzahl Erwartete Anzahl	798 798,0	271 271,0	1069 1069,0	

Bei einem Durchschnittsalter von 62,2 Jahren wurde das Studienkollektiv in Patienten aufgeteilt, die jünger bzw. älter als 62 Jahre waren. Die Infarktgruppe setzte sich aus Patienten zusammen, die mindestens einen Herzinfarkt erlitten hatten. Die Kontrollgruppe erfasste alle koronarangiographierten Probanden ohne Myokardinfarkt.

Zusätzlich wurde der Zusammenhang zwischen dem $PI^{A1/A2}$ Genpolymorphismus und dem Myokardinfarkt-Risiko bei Patienten untersucht, die hinsichtlich weiterer etablierter Risikofaktoren ein geringeres oder höheres Risiko für ischämische Herzerkrankungen aufwiesen.

Die Definition erfolgte allgemein mittels Median bzw. Mittelwert für kontinuierliche Werte und Zu- bzw. Abwesenheit für binäre Variable (Zigarettenkonsum < 5 py, keine arterielle Hypertonie, kein Diabetes mellitus, BMI < 26,9 kg/m², Apo B < 1,25 g/l, Apo A-I > 1,43 mg/dl, Lp(a) < 10 mg/dl, Triglyceride < 154 mg/dl, Cholesterin < 209 mg/dl und Fibrinogen < 3,47 mg/dl).

Es konnten keine Niedrigrisiko-Gruppe identifiziert werden, bei denen ein statistischer Zusammenhang zwischen den GP IIIa $PI^{A1/A2}$ Genotypen und Myokardinfarkt-Risiko festgestellt wurde. Auch wenn man die Niedrigrisiko-Gruppen über die Kombination mehrerer protektiver Faktoren definierte, konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Tabelle 13).

Gleichartige Beobachtungen wurden auch bei allen Hochrisikogruppen gemacht (Ergebnisse nicht dargestellt).

Tabelle 13: Beziehung zwischen dem GP IIIa PI^{A1/A2} Genpolymorphismus und dem Myokardinfarkt in Niedrigrisiko-Gruppen

<i>Niedrigrisiko-Gruppen</i>	<i>Signifikanz</i>	<i>n</i>
Zigarettenkonsum < 5 py	0,457	1051
Kein Hypertonus	0,666	849
Kein Diabetes mellitus	0,877	1843
Keine Hypertonie und kein Diabetes mellitus	0,372	740
BMI < 26,9 kg/m ²	0,692	1208
Apo A-I > 1,43 mg/dl	0,829	977
BMI < 26,9 kg/m ² und Apo A-I > 1,43 mg/dl	0,728	960
Apo B < 1,25 mg/dl	0,215	1040
Apo A-I/Apo B > 1,12	0,578	1050
Lp(a) < 10 mg/dl	0,652	904
Triglyzeride < 154 mg/dl	0,673	1282
Cholesterin < 209 mg/dl	0,875	1064
Triglyzeride < 154 mg/dl und Cholesterin < 209 mg/dl	0,611	766
Fibrinogen < 3,47 mg/dl	0,376	1198

In der vorliegenden Studienpopulation von 2252 männlichen Probanden wurden verschiedene Niedrigrisiko-Gruppen definiert, die in Bezug auf klassische Risikofaktoren und protektive Faktoren ischämischer Herzerkrankungen ein geringeres Herzinfarktisiko aufwiesen (siehe Methodenteil). Die Angaben über Zigarettenkonsum, Hypertonus und Diabetes mellitus wurden durch Befragung der Patienten erhoben. Größe und Gewicht der Patienten wurden zum Body-mass-index (kg/m²) umgerechnet. Menge und Dauer des Zigarettenkonsums wurden als „Pack-Year“ (1 py = 20 Zigaretten/Tag über ein Jahr) angegeben. Die statistische Analyse erfolgte mit der multiplen logistischen Regression. Abkürzungen: Apo A-I, Apolipoprotein A-I; Apo B, Apolipoprotein B; BMI, Body-mass-index; Lp(a), Lipoprotein(a); py, pack year; n, Anzahl der Patienten.

4. 10. Korrelation zwischen GP IIIa $PI^{A1/A2}$ Genotyp und Herzinfarkt in Abhängigkeit vom Alter beim ersten Herzinfarkt

In der Gruppe der Patienten mit mindestens einem Herzinfarkt lag das Alter beim ersten Herzinfarkt zwischen 22 und 86 Jahren bei einem Durchschnittsalter von $62,2 \pm 9,5$ Jahren. Es wurde daher im Folgenden untersucht, ob Patienten mit einem $PI^{A2/A2}$ Genotyp zu einem früheren Zeitpunkt einen Herzinfarkt erlitten hatten, als Patienten mit dem $PI^{A1/A1}$ oder $PI^{A1/A2}$ Genotyp. Es konnte für den $PI^{A1/A1}$ Genotyp ein Durchschnittsalter von $56,61 \pm 10,13$ ($n = 722$), für den $PI^{A1/A2}$ Heterozygoten von $56,74 \pm 10,45$ ($n = 251$) und für den $PI^{A2/A2}$ Homozygoten ein Durchschnittsalter von $60,00 \pm 9,63$ Jahren ($n = 16$) berechnet werden ($2p = 0,421$).

Gleichartige Ergebnisse zeigten sich auch, wenn man die Studienpopulation in Niedrig- und Hochrisiko-Gruppen unterteilte und in diesen das Auftreten des ersten Herzinfarkts in Abhängigkeit vom Alter untersuchte (Ergebnisse nicht dargestellt). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass PI^{A2} Allelträger nicht zu einem früheren Lebenszeitpunkt einen Herzinfarkt erlitten als PI^{A1} Allelträger (Tabelle 14).

Tabelle 14: Zusammenhang zwischen dem $PI^{A1/A2}$ Genpolymorphismus des Glykoprotein IIIa und dem Alter beim Auftreten des ersten Myokardinfarkts

GP IIIa	n	Mittelwert	Standard-abweichung	Signifikanz (2p)
$PI^{A1/A1}$	722	56,61	10,13	0,421
$PI^{A1/A2}$	251	56,74	10,45	
$PI^{A2/A2}$	16	60,00	9,63	
Insgesamt	989	56,70	10,21	

Es wurde untersucht, ob es eine Abhängigkeit zwischen dem Alter beim Auftreten des ersten Myokardinfarkts und dem $PI^{A1/A2}$ Genpolymorphismus des Glykoprotein IIIa gab. Abkürzungen: n, Anzahl der Patienten.

5. Diskussion

5. 1. Kurzdarstellung der Studienergebnisse

Die Studienpopulation von 2252 männlichen Patienten, die aus der Klinik für Kardiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen und aus der Kerckhoff Klinik Bad Nauheim rekrutiert und deren Koronarstatus mit Hilfe der Koronarangiographie bestimmt worden war, wurde auf eine mögliche Assoziation des $PI^{A1/A2}$ Genpolymorphismus im Thrombozytenmembranglykoprotein Glykoprotein (GP) IIIa zum Risiko und Schweregrad der koronaren Herzkrankheit und zum Risiko des Myokardinfarkts untersucht.

Es konnten nahezu alle etablierten Risikofaktoren und protektive Faktoren ischämischer Herzerkrankungen identifiziert und eine ausgeprägte Assoziation zwischen dem Risiko und Schweregrad der koronaren Herzkrankheit und dem Myokardinfarkt-Risiko nachgewiesen werden. In der Gesamtpopulation konnte keine Assoziation des GP IIIa $PI^{A1/A2}$ Genpolymorphismus zu Risiko und Schweregrad der koronaren Herzkrankheit und zum Myokardinfarkt-Risiko nachgewiesen werden.

Dagegen konnten mehrere Niedrigrisiko-Gruppen identifiziert werden, in denen eine Assoziation zwischen dem PI^{A2} Allel des GP IIIa Genpolymorphismus und dem Schweregrad der koronaren Herzkrankheit, definiert nach Gensini, festgestellt werden konnte (BMI < 26,9 kg/m²; Apo A-I > 1,43g/l; BMI < 26,9 kg/m² und Apo A-I > 1,43 g/l; jeweils Mittelwerte).

Eine Assoziation des GP IIIa Genpolymorphismus zum Risiko des Myokardinfarkts wurde hingegen weder in der Gesamtpopulation, noch in den verschiedensten Niedrig- oder Hochrisiko-Gruppen beobachtet.

5. 2. Primäre Hämostase unter besonderer Berücksichtigung der Bedeutung der thrombozytären Adhäsionsproteine

Die Bildung eines Gefäßwandthrombus, welcher zur Blutstillung führt, wird Hämostase genannt. Die Hämostase wird nach dem zeitlichen Ablauf in verschiedene Stadien unterteilt, primäre Hämostase, sekundäre Hämostase und Fibrinolyse. Während der primären Hämostase adhären Thrombozyten an Strukturen im Bereich der Gefäßwandläsion (Adhäsion) und bilden durch Interaktion mit weiteren Thrombozyten (Aggregation) den primären hämostatischen Thrombus. Unter physiologischen Bedingungen adhären Thrombozyten nicht an eine intakte Gefäßwand. Sie interagieren erst mit Endothelzellen, wenn Plättchen aktivierende Substanzen von Endothelzellen freigesetzt werden bzw. aus subendothelialen Schichten in das Gefäßlumen dringen.

Die Adhäsion von Thrombozyten an subendotheliale Strukturen wird durch Adhäsionsproteine (Liganden) vermittelt. Diese Liganden interagieren mit spezifischen Membranrezeptoren, von denen die Integrine die wichtigsten sind [133]. Weitere Gruppen der thrombozytären Adhäsionsrezeptoren sind die leuzinreichen Glykoproteine, die Selektine und die Rezeptoren vom Immunglobulintyp.

Integrine sind Membranrezeptoren, die Liganden auf der Oberfläche von Zellen mit dem Zytoskelett im Inneren der Zellen verbinden. Integrinrezeptoren stellen Heterodimere von Glykoproteinen (GP) dar und werden sowohl auf Blutzellen als auch auf Endothelzellen gefunden. Thrombozyten adhären an subendotheliale Strukturen über Adhäsivproteine, wie z. B. den von Willebrand-Faktor; Rezeptor für den von Willebrand-Faktor ist der GP Ib/IX-Komplex [133]. Fibrinogen, Fibronectin und Vitronectin sind weitere Adhäsivproteine, die über Rezeptoren an Thrombozyten binden. Kollagen bindet an Thrombozyten über GP IV und den GP Ia/IIa-Komplex [20]. Nach Adhäsion an das Subendothel sezernieren Thrombozyten Inhaltsstoffe, z. B. ADP, ATP, Serotonin, β -Thromboglobulin, Plättchenfaktor 4, Fibrinogen und hochmolekulares Kininogen, die morphologische und funktionelle Veränderungen im Blutplättchen induzieren und die Aktivierung genannt werden [49].

Während der Formveränderung kommt es zur Ausbildung von Pseudopodien, welche die effektive Abdichtung der Gefäßwandläsion begünstigt. Weiterhin kommt es erst nach Aktivierung der Thrombozyten im Bereich des Glykoprotein IIb/IIIa-Komplexes zur Freilegung von Bindungsstellen für Fibrinogen. Zentrales Ereignis der Thrombozytenaggregation ist somit die Bindung von Fibrinogen an das Glykoprotein IIb/IIIa [20; 49]. Die initiale Bindung von Fibrinogen an das Glykoprotein IIb/IIIa ist noch ein reversibler Vorgang und wird primäre Aggregation genannt. Im Zeitverlauf erfolgt in der Phase der sekundären Aggregation durch Ausschüttung von Inhaltsstoffen (Thromboxan A₂, Arachidonsäure, ADP) aus den Granula der Thrombozyten eine irreversible Stabilisierung der Fibrinogenbindung an den GP IIb/IIIa-Komplex. Die besondere Struktur des Fibrinogenmoleküls, das aus einer im Zentrum gelegenen Domäne und zwei nach aussen gewandten Domänen besteht, prädestiniert es für eine Brückenbildung zwischen zwei Zellen [49; 133]. An der Brückenbildung zwischen den Thrombozyten sind zu einem geringeren Ausmaß auch die Adhäsionsproteine von Willebrand-Faktor, Fibrinogen und Vitronectin beteiligt.

Dieser initial gebildete primär hämostatische Thrombus stillt vorübergehend die Blutung, ist jedoch instabil und löst sich schnell von der Gefäßwandläsion ab. Nach Aktivierung der Gerinnungskaskade wird Thrombin durch proteolytische Spaltung aus Prothrombin gebildet. Thrombin wiederum führt durch Degradation von Fibrinogen zur Bildung von Fibrin, welches durch Polymerisation zur Verfestigung des Plättchenaggregates führt (sekundärer hämostatischer Thrombus).

5. 3. Zur Bedeutung der Genpolymorphismen thrombozytärer Glykoproteine

Thrombozyten weisen membranständige Glykoproteine auf, welche die Interaktionen von Blutplättchen untereinander, die Wechselwirkungen mit der subendothelialen Matrix und mit plasmatischen Gerinnungsfaktoren, sowie die Interaktionen mit Endothelzellen oder Leukozyten vermitteln. Thrombozytäre Glykoproteine sind sehr vielgestaltig. Der Grund für diese Polymorphismen liegt häufig in dem Austausch

eines einzigen Basenpaares für das betroffene Glykoprotein codierende Gen, SNP = Single Nucleotide Polymorphism [108; 119] (Tabelle15).

Tabelle 15 : Thrombozytäre Alloantigene

Antigen	Synonym	Glykoprotein Lokalisation	Nukleotid Substitution	Aminosäure Substitution
HPA-1a HPA-1b	PI ^{A1} ; Zw ^a PI ^{A2} ; Zw ^b	GP IIIa	T ₁₉₆ C ₁₉₆	Leu ₃₃ Pro ₃₃
HPA-2a HPA-2b	Ko ^b Ko ^a ; Sib ^a	GP Iba	C ₅₂₄ T ₅₂₄	Thr ₁₄₅ Met ₁₄₅
HPA-3a HPA-3b	Bak ^a ; Lek ^a Bak ^b	GP IIb	T ₂₆₂₂ G ₂₆₂₂	Ile ₈₄₃ Ser ₈₄₃
HPA-4a HPA-4b	Yuk ^b ; Pen ^a Yuk ^a ; Pen ^b	GP IIIa	G ₅₂₆ A ₅₂₆	Arg ₁₄₃ Gln ₁₄₃
HPA-5a HPA-5b	Br ^b ; Zav ^b Br ^a ; Zav ^a ; Hc ^a	GP Ia	G ₁₆₄₈ A ₁₆₄₈	Glu ₅₀₅ Lys ₅₀₅
HPA-6a HPA-6b	Ca ^b ; Tu ^b Ca ^a ; Tu ^a	GP IIIa	A ₁₅₆₄ G ₁₅₆₄	Gln ₄₈₉ Arg ₄₈₉
HPA-7a HPA-7b	Mo ^b Mo ^a	GP IIIa	G ₁₃₁₇ C ₁₃₁₇	Ala ₄₀₇ Pro ₄₀₇
HPA-8a HPA-8b	Sr ^b Sr ^a	GP IIIa	T ₂₀₀₄ C ₂₀₀₄	Cys ₆₃₆ Arg ₆₃₆
HPA-9a HPA-9b	Max ^b Max ^a	GP IIb	A ₂₆₀₃ G ₂₆₀₃	Met ₈₃₇ Val ₈₃₇
HPA-10a HPA-10b	La ^b La ^a	GP IIIa	A ₂₈₁ G ₂₈₁	Gln ₆₂ Arg ₆₂
HPA-11a HPA-11b	Gro ^b Gro ^a	GP IIIa	A ₁₉₉₆ G ₁₉₉₆	His ₆₃₃ Arg ₆₃₃
HPA-12a HPA-12b	Iy ^a Iy ^b	GP Ibβ	A ₁₄₁ G ₁₄₁	Glu ₁₅ Gly ₁₅
HPA-13a HPA-13b	Sit ^b Sit ^a	GP Ia	T ₂₅₃₁ C ₂₅₃₁	Met ₇₉₉ Thr ₇₉₉

Abkürzungen: HPA, human platelet alloantigen; GP, Glykoprotein; A, Adenin; C, Cytosin; G, Guanin; T, Thymidin; Leu, Leucin; Pro, Prolin; Thr, Threonin; Met, Methionin; Ile, Isoleucin; Ser, Serin; Arg, Arginin; Ala, Alanin; Gln, Glutamin; Glu, Glutaminsäure; Lys, Lysin; Cys, Cystein; Val, Valin; His, Histidin.

Die uneinheitliche Nomenklatur der Alloantigen-Systeme ist geschichtlich bedingt [58; 104]. So wurden zuerst die Alloantigene der Thrombozyten bei ihrer Entdeckung nach dem Patienten (z. B. Ko, Br, Zw) benannt, von dem man das Alloantiseraum gewann, mit dem man das jeweilige Alloantigen nachweisen konnte [104]. Als es im Laufe der Zeit zu mehreren Namen für ein und dasselbe Antigen kam, wurde die neue HPA (= human platelet alloantigen) Nomenklatur geschaffen. Die Nummerierung der Alloantigene erfolgte chronologisch nach ihrer Beschreibung [105; 124]. Obwohl die neue Nomenklatur allgemein akzeptiert wird, werden auch noch weiterhin die Synonyma verwendet.

Das $\alpha 2\beta 1$ -Integrin, als GP Ia/Ia-Komplex bekannt, ist einer der Rezeptoren für Kollagen. Infolgedessen sind kongenitale oder erworbene Defekte dieses Rezeptors, genauso wie Autoantikörper gegen GP Ia/Ia, verantwortlich für eine erhöhte Blutungsneigung, charakterisiert durch eine beeinträchtigte Reaktion auf Kollagen [61; 97; 106]. Vier Allele des GP Ia ($\alpha 2$ Integrin) wurden beschrieben, die mit einer unterschiedlichen Expression des Rezeptors einhergehen [89; 108]. So führt das Allel 1 (807T/1648G/2531C) zu einer vermehrten Expression, die Allele 2 (807C/1648G/2531C) und 3 (807C/1648A/2531C) dagegen zu einer verminderten Expression des Rezeptors. Das sehr selten vorkommende Allel 4 (807C/1648G/2531T) führt zu keiner veränderten Expression des Rezeptors. Die Polymorphismen $A_{1648}G$ (Lys₅₀₅Glu) und $C_{2531}T$ (Thr₇₉₉Met) sind verantwortlich für die Br^a/Br^b (HPA-5) und Si^a (HPA-13bw) Alloantigene [89; 108]. Die Auswirkung des $C_{807}T$ Polymorphismus auf die koronare Herzkrankheit ist in vielen Studien untersucht worden [106; 108]. Auch hier sind die Ergebnisse zum Teil sehr widersprüchlich [106; 108]. Kroll et al [60] konnten eine Assoziation des Br^a/Br^b (HPA-5) Polymorphismus zur KHK bei Patienten aus Niedrigrisiko-Gruppen feststellen.

Der Glykoprotein Ib/V/IX-Komplex bildet den Adhäsionsrezeptor für den von-Willebrand-Faktor und spielt eine zentrale Rolle in der primären Hämostase. GP Ib/V/IX besteht aus vier Untereinheiten. GP Iba und Ib β sind kovalent über Disulfidbrücken miteinander verbunden. Jeweils ein GP Ib-Molekül bindet nicht kovalent ein GP IX-Molekül.

GP V ist die zentrale Einheit des Rezeptorkomplexes, um die je zwei GP Ib- und GP IX Proteine nicht kovalent miteinander verbunden sind [101]. Drei Polymorphismen des GP Iba sind von Interesse, da sie in Verdacht stehen, das Risiko für thrombotische Ereignisse zu erhöhen. Der erste Polymorphismus Thr₁₄₅Met ist verantwortlich für die Formation des Ko-Epitops (HPA-2) [62]. Dieser Polymorphismus ist verbunden mit einem „variable number of tandem repeats“ (VNTR) Polymorphismus in der Bindungsregion des GP Iba. Bei dieser genetischen Variante wird eine aus 13 Aminosäuren bestehende Sequenz einmal (VNTR D), zweimal (VNTR C), dreimal (VNTR B) oder viermal (VNTR A) dupliziert [70; 82]. Einige Autoren fanden einen Zusammenhang zwischen den Varianten VNTR A oder B und der Anwesenheit und dem Schweregrad der KHK [46; 85; 86], andere sahen diese Assoziation nicht [53]. In vitro Studien zeigten, dass die längeren Varianten des GP Iba (VNTR A und B) mit einer verminderten Stabilität zwischen dem Rezeptor und von-Willebrand-Faktor unter arteriellen Strömungsbedingungen einhergeht [69; 74]. Der dritte Polymorphismus dieses Glykoproteins ist der sogenannte C₅T Kozak Polymorphismus. Es konnte gezeigt werden, dass das C₅ Allel mit einer erhöhten Rezeptordichte einhergeht, eine Auswirkung auf die KHK konnte aber nicht nachgewiesen werden [18; 19; 27]. Bedeutsam sind auch Genpolymorphismen von zwei weiteren Typen der Thrombozytenmembranglykoproteinen. Zum einen handelt es sich um den Fc Rezeptor, Fc γ R11a, der auf menschlichen Thrombozyten exprimiert wird und der in den zwei Isoformen His₁₃₁ und Arg₁₃₁ vorkommt. Dieser Polymorphismus ist auf der einen Seite mitverantwortlich für die Heparin induzierte Thrombozytopenie (HIT) [15; 12; 130], auf der anderen Seite soll die Arg₁₃₁ Isoform an der Entstehung thrombotischer Ereignisse beteiligt sein [12; 23; 123]. Der andere Rezeptor ist das P-Selektin. Vier Polymorphismen (Ser₂₉₀Asn, Asn₅₆₂Asp, Leu₅₉₉Val und Thr₇₁₅Pro) führen zu einem Austausch in der Aminosäuresequenz dieses Rezeptors. Herman et al. [50] fanden ein vermindertes Vorkommen der Pro₇₁₅ Variante bei Patienten mit Myokardinfarkt.

Neben dem in dieser Studie behandelten Polymorphismus des Glykoprotein IIIa PI^{A1/A2} (HPA-1), gibt es noch weitere Polymorphismen, die das β_3 Gen betreffen. So wurde eine zusätzliche T zu G Austausch auf dem Kodon 40 gefunden, der ein Aminosäureaustausch von Leucin zu Arginin im GP IIIa zur Folge hat.

Dieser Polymorphismus ist mit dem P1^{A2} Allel (HPA-1b) [125] gekoppelt, es wurde für ihn jedoch keine klinische Relevanz beschrieben [89; 125]. Das HPA-4 (Pen oder Yuk) System resultiert aus einem Austausch von Arginin an Position 143 (HPA-4a, Pen^a) in Glutamin (HPA-4b, Pen^b) im GP IIIa [127]. Diesem Polymorphismus kommt eine besondere klinische Bedeutung aufgrund seiner Nähe zu der RGD-Bindungsregion zu. Antikörper gegen Pen^a hemmen die ADP induzierte Thrombozytenaggregation. Drei weitere Polymorphismen des GP IIIa wurden beschrieben. Der HPA-6 (CA oder Tu; siehe Tabelle 15) ist an der Neonatalen alloimmunen Thrombozytopenie (NATP) beteiligt und beruht auf dem Austausch von Arginin an Position 489 (HPA-6a) in Glutamin (HPA-6b) [128]. Das HPA-7 (Mo) Alloantigen-System beinhaltet eine Transformation von Prolin an Position 407 (HPA-7a) zu Alanin (HPA-7b) [63]. Schließlich wurde das HPA-8 (Sr) System beschrieben, das zum ersten Mal bei Patienten mit NATP entdeckt wurde. Hierbei haben Träger des HPA-8a Allel an Position 636 Arginin und Träger des HPA-8b Allel Cytosin als Aminosäure im GP IIIa [103]. Der Polymorphismus des α_{IIb} Gen ist für das HPA-3 (Bak^a/Bak^b) System verantwortlich. Es kommt zum Austausch an Position 843 der Aminosäure Isoleucin (HPA-3a, Bak^a) zu Serin (HPA-3b, Bak^b) im GP IIb [71]. Auch dieser Polymorphismus kann zur Bildung von Alloantikörpern führen. Dies führt zu Thrombozytopenien bei Feten und Neugeborenen von zuvor immunisierten Schwangeren und kann bei immunisierten Patienten während einer Thrombozytentransfusion zu febrilen Transfusionsreaktionen führen, verbunden mit einem unzureichenden Thrombozytenanstieg. Klinische Studien konnten aber keinen Zusammenhang zwischen dem HPA-3 Polymorphismus und der koronaren Herzkrankheit und dem Myokardinfarkt feststellen [66; 71].

In den letzten Jahren gab es eine Vielzahl an Arbeiten, die sich mit den Polymorphismen der Membranglykoproteine der Thrombozyten beschäftigten [61; 89; 104; 105; 108]. Die Erwartungshaltung der Wissenschaftler war und ist groß, was die Auswirkung dieser Polymorphismen auf die koronare Herzkrankheit, auf den Myokardinfarkt, auf den Fettstoffwechsel, auf die Fibrinogenkonzentration, auf erworbene und angeborene Thrombozytopenien, auf Thrombozytentransfusionsreaktionen usw. angeht.

Doch die Heterogenität der verschiedenen Populationen und der unterschiedliche Aufbau der Studien erlauben nur begrenzte Aussagen über die verschiedenen Genvariationen.

5. 4. Funktionelle Bedeutung des $PI^{A1/A2}$ Polymorphismus

Das Glykoprotein IIb/IIIa (GP IIb/IIIa oder $\alpha_{IIb}\beta_3$) ist das am meisten vorkommende Membranglykoprotein der Thrombozyten. Es fungiert in seinem aktivierten Zustand als Rezeptor für Fibrinogen, von-Willebrand Faktor, Fibronectin und Vitronectin [39; 94]. Das PI^A Alloantigen-System (ältere Bezeichnung Zw Alloantigen) wurde zum ersten Mal 1959 bei einer Patientin beschrieben, die eine Vollbluttransfusion erhielt und fünf Tage später eine schwere Thrombozytopenie entwickelte [121]. Kunicki und Aster [65] waren die Ersten, die das Epitop auf dem Glykoprotein IIIa Rezeptor lokalisierten. Man bezeichnet es daher auch als HPA-1 (human platelet antigen). Es wurden daraufhin große Anstrengungen unternommen, die Strukturen dieses Alloantigen-Systems, aber auch weitere, zu erforschen. Diese Anstrengungen führten schließlich zu der Erkenntnis, dass sich das PI^A Antigen auf einer 17 kDa großen Untereinheit des GP IIIa befindet [88]. Kurz darauf wurde die genomische Basis für diesen GP IIIa Polymorphismus identifiziert, die durch die Substitution von T für C an Position 1565 im Exon des kodierenden Gens charakterisiert ist, was zum Austausch der Aminosäure Prolin anstelle von Leucin an Position 33 des GP IIIa Proteins führt [87]. Es war nun möglich die Genotypisierung von Blutspendern, schwangeren Müttern und Feten vorzunehmen [10; 75; 114].

Als nun weitere Polymorphismen der Glykoproteine entschlüsselt wurden und die Bedeutung anderer Polymorphismen, wie z. B. von löslichen Gerinnungsfaktoren [35; 89] oder Membranglykoproteinen der Endothelzellen [134], bei der Entstehung der koronaren Herzkrankheit erkannt wurde, war es 1995 Nurden [89], der als einer der Ersten die Frage stellte, ob die Polymorphismen der thrombozytären Glykoproteine eigenständige Risikofaktoren bzw. Risikoindikatoren für kardiovaskuläre Erkrankungen darstellen würden.

Weiss et al. beobachteten 1996 als erste einen statistischen Zusammenhang zwischen dem Auftreten des PI^{A2} Allels und Myokardinfarktrisiko [131]. Diese Assoziation war bei Probanden unter 60 Jahren besonders ausgeprägt. Sie untersuchten 68 herzgesunde Probanden und 71 männliche und weibliche Patienten, die einen Herzinfarkt erlitten hatten.

Es folgten mehrere Arbeiten, die sich mit diesem Thema auseinandersetzen. Diese unterschieden sich jedoch in ihrem Studiendesign [13; 14; 15; 22; 51; 73; 91; 99; 102; 115]. Die jeweiligen Ergebnisse wiesen eine erhebliche Diskrepanz zur Arbeit von Weiss et al. [131] auf [13; 14; 15; 22; 51; 73; 91; 99; 102; 115]. Erhebliche Aufmerksamkeit wurde zudem der Frage gewidmet, ob dem GP $PI^{A1/A2}$ Polymorphismus eine funktionelle Bedeutung zukommt [17; 26; 54; 55; 67; 76; 78; 111; 112; 122]. So fanden Lasne et al. [67] eine geringere Ansprechbarkeit der Thrombozyten von PI^{A2} Allel Trägern auf TRAP (Thrombin Rezeptor aktivierendes Peptid). Dagegen fanden Feng et al. [26] eine erhöhte Ansprechbarkeit der Thrombozyten von PI^{A2} Allel Trägern auf die ADP induzierte Aggregation. Auch eine neuere Arbeit von Vijayan et al. [122] weist ähnliche Ergebnisse auf. Sie konnten zeigen, dass der $PI^{A1/A2}$ Polymorphismus die $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptor vermittelten Funktionen wie Adhäsion, Spreizung der Thrombozyten und die Gerinnselretraktion beeinflusst. Meiklejohn et al. [76] wiederum beobachteten keine PI^{A2} Allel abhängigen Unterschiede in der Fibrinogen Bindung nach ADP Stimulation. Auch Cooke et al. [17] sahen keine Assoziation zwischen dem Auftreten des PI^{A2} Allels und einer erhöhten Bereitschaft zur Aggregation der Thrombozyten. Überraschenderweise stellte diese Arbeitsgruppe fest, dass PI^{A2} Allel Träger eine verstärkte Hemmung der Thrombozytenaggregation nach Gabe von Acetylsalicylsäure zeigten [17]. Michelson et al. [78] wiesen eine verstärkte Hemmung der Thrombozytenaggregation bei PI^{A2} Allel Trägern gegenüber dem GP IIb/IIIa Rezeptor Antagonist Abciximab nach [78]. Kastrati et al. [55] berichteten über ein ungünstigeres 30 Tage Outcome nach koronarer Stentimplantation bei PI^{A2} homozygot mutierten Patienten im Vergleich zu den Trägern der beiden anderen Genotypen. Senti et al. [111] stellten erhöhte Fibrinogenspiegel bei Patienten nach Myokardinfarkt fest, die Träger des PI^{A2} Allels waren. In einer weiteren Studie von Senti et al. [112], wurde eine Assoziation zwischen PI^{A2} Allel Trägern und erhöhten Triglyzidsiegeln bei Rauchern gefunden.

Zusammenfassend muss man feststellen, dass die Frage nach der funktionellen Bedeutung des GP $PI^{A1/A2}$ Genpolymorphismus kontrovers diskutiert wurde. Allerdings wird in jüngerer Zeit von einer erhöhten Aggregabilität der Thrombozyten von PI^{A2} Trägern ausgegangen. Diese Annahme stützt sich insbesondere auf die Studien von Feng et al. [26], von Vijayan et al. [122] und auf die Beobachtung der erhöhten Restenoserate nach Stentimplantation [55]. Jedoch kann in keiner Weise von gesicherten Erkenntnissen gesprochen werden, da es auch Studien gibt, die eine gegenteilige Meinung vertreten [17; 67; 76]. Es bedarf daher weiterer Studien, die sich mit diesem Themenkomplex auseinandersetzen, um gesicherte Aussagen über die funktionelle Bedeutung des Genpolymorphismus $PI^{A1/A2}$ des Glykoproteins IIIa zu treffen.

5. 5. Darstellung der publizierten Ergebnisse zur potentiellen Assoziation zwischen dem Glykoprotein $PI^{A1/A2}$ Genpolymorphismus und koronarer Herzkrankheit bzw. Myokardinfarkt

Ein intakter Fibrinogen Rezeptor, bestehend aus den beiden Glykoproteinen GP IIb und GP IIIa, ist eine unerlässliche Voraussetzung für die primäre Hämostase. Mehrere Punktmutationen in den Genen der Glykoproteine IIb und IIIa wurden bereits identifiziert [104; 119]. Die Annahme war naheliegend, dass diese Mutationen die Interaktionen zwischen dem Liganden Fibrinogen und seinem Rezeptor, und somit die primäre Hämostase, modifizieren könnte. Solche genetisch bedingten funktionellen Änderungen könnten die Ursache für eine verminderte oder erhöhte Neigung zur Ausbildung arterieller Thrombosen sein.

Weiss et al. [131] waren die erste Arbeitsgruppe, die eine Assoziation des PI^{A2} Allels mit der koronaren Herzkrankheit beobachtete und zwar besonders bei Patienten, die jünger als 60 Jahre waren. Sie untersuchten 71 männliche und weibliche Patienten, die einen Herzinfarkt erlitten hatten und verglichen diese mit einer aus 68 Probanden bestehenden Kontrollgruppe, bei denen keine KHK bekannt war. Die Genotypisierung der Patienten erfolgte mittels PCR und zusätzlich mit reverser Dot-Blot Hybridisierung.

Die Patienten wurden auch auf die bekannten koronaren Risikofaktoren untersucht: Zigarettenkonsum, erhöhter Blutdruck, erhöhte Serumcholesterin- und Triglyzeridwerte und Diabetes mellitus. Der Koronarstatus der Patienten ergab sich aus der Dokumentation abgelaufener koronarer Ereignisse, wurde aber nicht durch angiographische Verfahren objektiviert.

Die Studie von Ridker et al. [99] erwuchs aus der „Physician's Health Studie“, bei der 14916 initial gesunde Männer randomisiert, doppelblind und Plazebo kontrolliert, ursprünglich auf den Nutzen für die primäre Prävention von Aspirin (Acetylsalicylsäure) und β -Carotin im Hinblick auf die koronare Herzkrankheit und auf Krebs untersucht wurden. Ridker et al. [99] führten, in Analogie zu Weiss, die gleichen Untersuchungen durch. Allerdings umfasste ihre Studienpopulation 1408 Probanden, deren Genotypus mit Hilfe der PCR ermittelt wurde. Bei den Probanden handelte es sich ausschließlich um Männer. Ridker et al. führten diese Untersuchungen ebenfalls bei Niedrigrisiko-Patienten durch. Im Gegensatz zu Weiss et al. [131] konnten sie jedoch weder in der Gesamtpopulation eine Assoziation zwischen dem Auftreten von Myokardinfarkt und dem PI^{A2} Allel feststellen, noch bei Niedrigrisiko-Patienten und bei Patienten, die jünger als 60 Jahre zum Zeitpunkt ihres ersten Myokardinfarktes waren.

Herrmann et al. [51] verglichen die Häufigkeit des PI^{A2} Allels zwischen 620 Myokardinfarkt Patienten und einer Kontrollgruppe bestehend aus 700 herzgesunden Probanden. Patienten und Probanden wurden für die Untersuchung aus Nord-Irland und Frankreich rekrutiert. Auch in diese Studie wurden nur Männer aufgenommen. Von 93 %, der an dieser Studie teilnehmenden Personen, konnten koronarangiographische Daten verwendet werden. Auch Herrmann et al. [51] beobachteten keinen Zusammenhang zwischen dem PI^{A2} Allel und dem Myokardinfarkt-Risiko. Diese Aussage trifft auch für Niedrigrisiko-Patienten zu.

In der Studie von Samani et al. [102] (209 Herzgesunde, 242 Myokardinfarkt-Patienten) wurde ebenfalls kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten des PI^{A2} Allels bei Patienten und dem Auftreten eines Myokardinfarktes beobachtet. Sie bezweifelten, dass das PI^{A2} Allel irgendeinen Risikoindikator für den Myokardinfarkt darstellt. Samani et al. [102] unterschieden bei der Auswahl der Probanden nicht zwischen männlichen und weiblichen Geschlecht.

Auch der genaue Koronarstatus wurde nicht bestimmt, sondern nur über Veränderungen im EKG, Enzymerhöhungen und klinische Symptome definiert. Zwei weitere, kleine Studien von de Maat et al. [22] und Marian et al. [73] beobachteten ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein des PI^{A2} Allel und dem Myokardinfarkt.

Von den Studien, die bis zur Publikation der hier vorgelegten Arbeit im August 1998 veröffentlicht wurden, war es außer Weiss et al. [131] nur die Arbeitsgruppe um Carter [15], die ebenfalls einen Zusammenhang zwischen dem PI^{A2} Allel und dem Auftreten des Myokardinfarkt-Risikos beobachteten. Carter et al. [15] führten ihre Studie bei 405 Patienten und 216 Kontrollpersonen durch. Sie nahmen männliche und weibliche Probanden in ihre Studie auf. Der Genpolymorphismus wurde mit der PCR bestimmt und der Koronarstatus wurde mittels Angiographie dargestellt. Carter et al. [15] untersuchten zusätzlich den Fibrinogen B β 448 Genpolymorphismus, dem eine besondere Bedeutung bei den makrovaskulären Erkrankungen zukommen soll [15; 35]. Diese Arbeitsgruppe fand eine Assoziation des PI^{A2} Allels mit dem Auftreten eines Myokardinfarkts insbesondere bei Patienten, die jünger als 47 Jahre alt waren.

5. 6. Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Studie mit publizierten Arbeiten zum Thema des $PI^{A1/A2}$ Polymorphismus

Mehrere Punktmutationen der Membranglykoproteine der Thrombozyten im menschlichen Genom sind bekannt [89; 104; 108]. Insbesondere die „diallelischen Systeme“, das heißt die Systeme, bei denen es nur drei mögliche Varianten der Genotypen gibt (z. B. $PI^{A1/A1}$, oder $PI^{A1/A2}$, oder $PI^{A2/A2}$), waren in der Vergangenheit von besonderem Interesse für Wissenschaftler auf der ganzen Welt.

Die Bedeutung der Polymorphismen im Glykoprotein IIIa für die Entstehung oder Beteiligung an verschiedenen Erkrankungen, war seit Jahren bekannt [75; 132]. Von besonderer Bedeutung sind die Produktion Thrombozyten spezifischer Alloantikörper.

Diese Alloantikörper sind verantwortlich für die Neonatale alloimmune Thrombozytopenie (NATP), eine nach Thrombozytentransfusion auftretende Purpura (PTP) und die Erfolglosigkeit einer Thrombozytentransfusion [75].

Seit dem ersten Report 1996 von Weiss et al. [131], die über eine Assoziation des PI^A2 (HPA-1b) Allels zum Myokardinfarkt berichteten, folgten weitere Studien die sich mit diesem Thema beschäftigten [14; 15; 22; 51; 73; 91; 99; 102; 115]. Mit Ausnahme von [51; 99], wurden diese Studien allerdings nur mit relativ kleinen Probandengruppen durchgeführt. Der grundlegende Nachteil kleiner Kollektive liegt in der geringen statistischen Aussagekraft und der relativ großen Wahrscheinlichkeit eines statistischen Fehlers 1. oder 2. Art. In diesen Untersuchungen, mit Ausnahme von [15], und ebenfalls in einer großen prospektiven Studie [99], konnten die Wissenschaftler keinen Zusammenhang zwischen dem PI^A2 Allel und dem Risiko eines Myokardinfarkts demonstrieren. Ridker et al. [99] und Herrmann et al. [51] konnten ebenfalls keine Assoziation des PI^A2 Allels zum Myokardinfarktrisiko auch bei jüngeren Patienten und in Untergruppen von Niedrigrisiko-Patienten beobachten. Daher stimmen die Ergebnisse der vorliegenden Studie mit denen von Ridker et al. [99] und denen von Herrmann et al. [51] überein. Nur Carter et al. [15], aber keine anderen Untersucher [22; 51; 115], entdeckten eine Assoziation des $PI^{A1/A2}$ Genpolymorphismus mit dem Risiko und Schweregrad der koronaren Herzkrankheit. In der hier vorgelegten Studie war der relative Anteil des GP IIIa PI^A2 Allels bei Patienten mit Null-, Ein-, Zwei- oder Dreifäßerkrankungen etwa gleich. Allerdings hatten GP IIIa $PI^{A2/A2}$ homozygote Individuen nach Ausschluss von Probanden mit hohem BMI ($> 26 \text{ kg/m}^2$) und/oder niedrigem Apo A-I ($< 1,43 \text{ mg/dl}$), eindeutig höhere Gensini Scores als $PI^{A1/A1}$ Homozygote; $PI^{A1/A2}$ Heterozygote hatten mittlere Werte. Bei denselben Niedrigrisiko-Gruppen fand sich ebenfalls eine Assoziation zwischen dem GP IIIa PI^A2 Allel und dem Schweregrad der KHK, nach Unterteilung der Studienpopulation in eine Gruppe von Individuen ohne jegliche Zeichen der KHK (Gensini Score = 0) und in eine andere Gruppe mit ausgedehntem atherosklerotischen Befall (Gensini Score ≥ 120). Es wurde dagegen keine Assoziation zwischen dem PI^A2 Allel und dem Myokardinfarktrisiko gefunden.

Nach Publikation der eigenen Untersuchungen sind acht Arbeiten veröffentlicht worden [3; 4; 11; 13; 77; 79; 116; 136], in denen eine Assoziation des P1^{A2} Allels zum Myokardinfarkt beobachtet wurde. Dagegen sind fünf Arbeiten [8; 24; 57; 72; 109] erschienen, die einen statistischen Zusammenhang nicht feststellen können. Man kann also zusammenfassend folgern, dass es derzeit (Stand: Januar 2003) neun Arbeiten [3; 4; 11; 13; 15; 77; 79; 116; 136] gibt, die eine Assoziation zwischen dem P1^{A2} Allel und dem Myokardinfarkt zeigen konnten und elf Studien [8; 24; 29; 51; 57; 72; 73; ; 91; 99; 102; 109], die keinen statistischen Zusammenhang zwischen dem Auftreten des P1^{A2} Allels und dem Myokardinfarkt beobachteten. Es stellt sich somit die Frage, wie solche diskrepante Ergebnisse zu erklären sind. Im Vergleich der Untersuchungen lassen sich erhebliche methodische Unterschiede erkennen, die zumindest zum Teil die abweichenden Studienergebnisse erklären können:

1. Größe der Studienpopulation: z. B. Weiss et al. [131] 71 Patienten und 68 Kontrollpersonen, Ridker [99] 704 Patienten und 704 Kontrollpersonen, Carter et al. [15] 405 Patienten und 216 Kontrollpersonen, Zotz et al. [136] 207 Patienten und 91 Kontrollpersonen, Kekomaki et al. [57] 133 Patienten und 326 Kontrollpersonen
2. Retrospektive Studien versus prospektive Studien: retrospektive Studien z. B. von Weiss et al. [131], Carter et al. [15], Marian et al. [73] und Mikkelsen et al. [80]; prospektive Studien z. B. von Ridker et al. [99], Samani et al. [102] und Mamotte et al. [72]
3. Studien, die primär für andere Untersuchungsziele konzipiert wurden: So wurde die Studie von Ridker et al. [99] als Physicians' Health Study zur Überprüfung des Nutzen von Acetylsalicylsäure und β -Carotin bei der Primärprävention von KHK und Krebs durchgeführt; die ECTIM-Studie, aus der die Publikation von Hermann et al. [51] hervorging, hatte die allgemeine Charakterisierung etablierter und Identifikation bisher unbekannter Risikofaktoren der KHK zum Ziel.
4. Rassistische Unterschiede: Weiße Europäer in den Studien von Hermann et al. [51], Carter et al. [15], Samani et al. [102], Zotz et al. [136], Böttiger et al. [8]; dagegen Japaner bei Odawara et al. [90], Grönland Inuits bei de Maat et al. [22], Finnen bei Mikkelsen et al. [80] und Kekomaki et al. [57]. Heterogene

ethnische Studiengruppen wurden u. a. von Weiss et al. [131], Ridker et al. [99], Marian et al. [73] und Anderson et al. [3] etabliert.

5. Einschluss- und Ausschlusskriterien: Männer und Frauen wurden u. a. durch Weiss et al. [131], Carter et al. [15], Samani et al. [102] und Ardissino et al. [4] untersucht. Ausschließlich Männer wurden u. a. in die Studien von Ridker et al. [99], Herrmann et al. [51] und Mikkelsen et al. [80] aufgenommen. Odawara et al. [90] untersuchte Diabetiker. Mikkelsen et al. [80] führte seine Untersuchungen bei Patienten durch, die einen Myokardinfarkt nicht überlebten, während alle anderen Autoren diese Gruppe von Patienten gerade nicht beachteten.

Es kommt noch einem weiteren Diskussionspunkt eine erhebliche Bedeutung zu, der ebenfalls die vorliegenden differenten Ergebnisse erklären könnte. Einige Autoren unterscheiden nicht exakt zwischen den klinischen Variablen koronare Herzkrankheit und Myokardinfarkt. Weiss et al. [131] nahm in die Myokardinfarkt-Gruppe auch Patienten auf, die das klinische Bild der instabilen Angina pectoris boten. Dieses wurde in der Studie von Marian et al. [73] als nicht zulässige Vermischung dieser zu trennenden Patientengruppen angesehen. Andere Autoren [3; 24; 51; 72] etablierten eine Patientengruppe mit akutem Koronarsyndrom (stumme Ischämie, instabile Angina pectoris und akuter Myokardinfarkt).

Die vorliegende Studie unterscheidet klar zwischen KHK und Myokardinfarkt und untersucht beide getrennt voneinander auf ihre Assoziation zum GP IIIa P1^{A1/A2} Genpolymorphismus. Mit Hilfe des Gensini Scores wurde zusätzlich der Schweregrad der koronaren Herzkrankheit genau bestimmt. Es stellt sich die Frage, warum in der vorliegenden Untersuchung ein Zusammenhang in Niedrigrisiko-Gruppen von P1^{A2} Allel und koronarer Herzkrankheit gefunden wurde, jedoch keinerlei Assoziation zwischen dem P1^{A2} Allel und dem Myokardinfarkt-Risiko. Immerhin ist die koronare Herzkrankheit in den meisten Fällen die Ursache für einen Myokardinfarkt. Dieser Unterschied kommt wahrscheinlich dadurch zustande, dass in dieser Studie nur Überlebende eines oder mehrerer Herzinfarkte und keine Patienten, die an einem Myokardinfarkt verstarben, aufgenommen wurden.

Diese These wird durch die Arbeiten von Mikkelsen et al. [79; 81] unterstützt. Mikkelsen untersuchte bei Autopsien von 700 finnischen Patienten, die nach einem Myokardinfarkt die Klinik nicht mehr lebend erreichten, den Grad ihrer Koronarsklerose. Zusätzlich wurde von jedem Verstorbenen der $PI^{A1/A2}$ Genotyp bestimmt. Mikkelsen et al. [79; 80; 81] kamen zu der Einschätzung, dass Thrombozyten von PI^{A2} Allel Trägern eine erhöhte Bereitschaft zur Aggregation zeigten und somit diese Personen ein höheres Risiko aufwiesen, an einem „Sekundenherztod“ (sudden cardiac death (SCD)) zu versterben [79;80; 81].

Es werden daher weitere - vor allem prospektive - Studien mit einem repräsentativen und großen Kollektiv benötigt, die statistische Beziehungen zwischen dem GP $PI^{A1/A2}$ Genpolymorphismus und der koronaren Herzkrankheit bzw. dem Myokardinfarkt identifizieren können. Ein- und Ausschlusskriterien für diese Kollektive müssen genau definiert werden (z. B. nur Männer, oder beide Geschlechter; Definition der Niedrig- und Hochrisikogruppen nach Mittelwert, Median oder anderen Kriterien). Weiterhin müssen rassische Einflüsse auf die Genotypverteilung bedacht werden. Sehr viel größere Beachtung muss der Gruppe von Patienten geschenkt werden, die einen Myokardinfarkt nicht überlebten [79; 80; 81]. Es bedarf Studien, welche die Wechselwirkungen von Genpolymorphismen der Glykoproteine auf das KHK- bzw. Myokardinfarktrisiko analysieren [11]. Schließlich wird man die durch die Polymorphismen der thrombozytären Membranglykoproteine veränderte Wirkungen antikoagulatorischer Substanzen (z. B. Acetylsalicylsäure [17], GP IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten [78; 100]) zu überprüfen haben.

Die koronare Herzkrankheit stellt immer noch die häufigste Ursache für Morbidität und Mortalität in der westlichen Welt dar. Unser immer größer werdendes Verständnis für das menschliche Genom und die immer weiter optimierten Methoden der molekularbiologischen Forschung geben uns immer bessere Möglichkeiten, den Mechanismus der Krankheit zu verstehen, bisher unbekannte Risikofaktoren zu identifizieren, damit die Primärprävention zu optimieren und Erkrankte effektiv zu therapieren. Es wird aber noch einen erheblichen Zeitraum in Anspruch nehmen, bis diese Möglichkeiten im vollen Umfang genutzt werden können.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Studienpopulation von 2252 männlichen Patienten, die aus der Klinik für Kardiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen und aus der Kerckhoff Klinik Bad Nauheim rekrutiert und deren Koronarstatus mit Hilfe der Koronarangiographie bestimmt worden war, wurde der Zusammenhang des Glykoprotein IIIa $PI^{A1/A2}$ Genpolymorphismus zur koronaren Herzkrankheit (KHK) und zum Myokardinfarkt untersucht.

Beziehung zwischen dem Glykoprotein IIIa PI^{A2} Allel und KHK:

In der Gesamtpopulation ist die Frequenz des Glykoprotein IIIa PI^{A2} Allel nicht mit der Anwesenheit oder der Ausdehnung der KHK assoziiert. In definierten Niedrigrisiko-Gruppen, wie niedriger Body-mass-index ($< 26,9 \text{ kg/m}^2$) und/oder hohes Apolipoprotein A-I ($> 1,43 \text{ mg/dl}$), haben die Träger des Glykoprotein IIIa PI^{A2} Allels ein signifikant höheres Risiko an ausgedehnter KHK zu erkranken.

Beziehung zwischen dem Glykoprotein IIIa PI^{A2} Allel und Myokardinfarkt:

Es wurde keine Assoziation zwischen dem Glykoprotein IIIa PI^{A2} Allel und Myokardinfarkttrisiko gefunden. Diese Beobachtung wurde in der Gesamtpopulation und in Niedrig- und Hochrisiko-Gruppen gemacht.

Schlussfolgerung:

Während kein Unterschied in der Verteilung der Allele und der Frequenz der Genotypen zwischen der Kontrollgruppe und Überlebenden eines Myokardinfarktes gefunden werden konnte, ist das Auftreten des Glykoprotein IIIa PI^{A2} Allels mit einem erhöhtem Risiko, an der koronaren Herzkrankheit zu erkranken, in bestimmten Niedrigrisiko-Gruppen assoziiert.

7. Literaturverzeichnis

1. Afshar-Khargan V, Li CQ, Khoshnevis-Asl M, Lopez JA. Kozak sequence polymorphism of the glycoprotein (GP) Ib α gene is a major determinant of the plasma membrane levels of the platelet GP Ib-IX-V- complex. *Blood* 1999; 94: 186-91.
2. Amant C, Bauters C, Bodart JC, Lablanche JM, Grollier G, Danchin N, Hamon M, Richard F, Helbecque N, McFadden EP, Amouyel P, Bertrand ME. D allele of the angiotensin I -converting enzyme is a major risk factor for restenosis after coronary stenting. *Circulation* 1997; 96: 56-60.
3. Anderson JL, King GJ, Bair TL, Elemer SP, Muhlestein JB, Habashi J, Carlquist JF. Association between a polymorphism in the gene encoding glycoprotein IIIa and myocardial infarction or coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1999; 33: 727-33.
4. Ardissino D, Manucci PM, Merlini PA, Duca F, Fetiveau R, Tagliabue L, Tubaro M, Galvani M, Ottani F, Ferrario M, Corral J, Margaglione M. Prothrombotic genetic risk factors in young survivors of myocardial infarction. *Blood* 1999; 94: 46-51.
5. Arepally G, McKenzie SE, Jiang XM, Poncz M, Cines DB. FcRIIa H/R131 polymorphism, subclass specific IgG antiheparin platelet factor 4 antibodies and clinical course in patients with heparin induced thrombocytopenia. *Blood* 1997; 89: 370-5.
6. Aster RH. Clinical significance of platelet specific antigens and antibodies. In: *Advance in immunobiology and bone marrow transplantation*. J. McCullough and G. Sandler, editors. Alan R. Liss, New York, 1984: 103-18.

7. Behar E, Chao NJ, Hiraki DD, Brown BW, Zehnder JL, Grumet FC. Polymorphism of adhesion molecule CD31 and its role in acute graft-versus-host disease. *N Engl J med* 1996; 334: 286-91.
8. Böttiger C, Kastrati A, Koch W, Mehilli J, Seidl H, Schömig K, von Beckerath N, Schömig A. HPA-1 and HPA-3 polymorphisms of platelet fibrinogen receptor and coronary artery disease and myocardial infarction. *Thromb Haemost* 2000; 83: 559-62.
9. Braizier L, Tiret L, Luc G, Arveiler D, Ruidarets JB, Evans A, Chapman J, Cambien F, Thillet J. Sequence polymorphism in the apolipoprotein (a) gene and their association with lipoprotein (a) levels and myocardial infarction. The ECTIM Study. *Arteriosclerosis* 1999; 144: 323-33.
10. Bray PF, Jin Y, Kickler T. Rapid genotyping of the five major platelet alloantigens by reverse dot-blot hybridization. *Blood* 1994; 84: 4361-7.
11. Bray PF. Platelet glycoprotein polymorphisms as risk factors for thrombosis. *Curr Opin Hematol* 2000; 7: 284-9.
12. Carlsson LE, Santoso S, Baurichter G. Heparin-induced thrombocytopenia: new insights into impact of the FcR11a-R-H131 polymorphism. *Blood* 1998; 92: 1526-31.
13. Carter AM, Ossei-Gerning, Grant PJ. Platelet glycoprotein IIIa P1^A polymorphism in young men with myocardial infarction. *Lancet* 1996; 348: 485-6.
14. Carter AM, Ossei-Gerning, Grant PJ. Platelet glycoprotein IIIa polymorphism and myocardial infarction. *N Engl J Med* 1996; 335: 1072-3.

15. Carter AM, Ossei-Gerning, Wilson IJ, Grant PJ. Association of platelet P1^A polymorphism of glycoprotein IIb/IIIa and the fibrinogen B β 448 Polymorphism with myocardial infarction and extent of coronary disease. *Circulation* 1997; 96: 1424-31.
16. Clauss A. Rapid physiological coagulation method in determination of fibrinogen. *Acta Haematol* 1957; 17: 237.
17. Cooke GE, Bray PF, Hamlington JD, Dung MP, Goldschmidt-Clermont PJ. P1^{A2} polymorphism and efficacy of aspirin. *Lancet* 1998; 351: 1253.
18. Corral J, Lozano ML, Gonzales-Conejero R. A common polymorphism flanking the ATG initiator codon of Ib α does not affect expression and is not major risk factor for arterial thrombosis. *Thromb Haemost* 2000; 83: 23-8.
19. Croft S, Hampton K, Daly M, Steeds R, Channer K, Samani N. Kozak sequence polymorphism in the platelet GP Ib α gene is not associated with risk of myocardial infarction. *Blood* 2000; 95: 2183-4.
20. D'Souza SE, Ginsberg MH, Matsueda GR, Plow EF. A discrete sequence in a platelet integrin is involved in ligand recognition. *Nature* 1991; 350: 66-8.
21. Dawson SJ, Wiman B, Hamston A, Green F, Humphries S, Henney AM. The two allele sequences of a common polymorphism in the promotor of the plasminogen activator inhibitor (PAI) gene respond differently to interleukin-1 in HepG2 cells. *J Biol Chem* 1993; 268:10739-5.
22. Demaat MPM, Bladbjerg EM, Johansen LG, Bemtzen, Jespersen J. P1^{A1/A2} polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risk of cardiovascular disease. *Lancet* 1997; 349: 1099-100.

23. Denomme GA, Warkentin TE, Horsewood P, Sheppard JAI, Warner MN, Kelton JG. Activation of platelets by sera containing IgG1 heparin-dependent antibodies. An explanation for the predominance of the FcRIIa "low responder" (his₁₃₁) gene in patients with heparin-induced thrombocytopenia. *J Lab Clin Med* 1997; 130: 278-84.
24. Durante-Mangoni E, Davies GJ, Ahmend N, Ruggiero G, Tuddenham EG. Coronary thrombosis and the platelet glycoprotein IIIa gene Pl^{A2} polymorphism. *Thromb Haemost* 1998; 80: 218-9.
25. Eikelboom JW, Baker RI, Parson R, Taylor RR, van Bockxmeer FM. No association between the 20210 G/A prothrombin gene mutation and premature coronary artery disease. *Thromb Haemost* 1998; 80: 878-80.
26. Feng D, Lindpaintner K, Larson MG, Rao VS, O'Donnell CJ, Lipinska I, Levy D, Tofler GH. Increased platelet aggregability associated with platelet GP IIIa polymorphism: the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 19: 1142-7.
27. Frank MB, Reiner AP, Schwartz SM. The Kozak sequence polymorphism of platelet glycoprotein Ib α and risk of nonfatal myocardial infarction and nonfatal stroke in young women. *Blood* 2001; 97: 875-9.
28. Gardemann A, Arsic T, Katz N, Tillmanns H, Hehrlein FW, Haberbosch W. The factor II G20210A and factor V G1691A gene transitions and coronary heart disease. *Thromb Haemost* 1999; 81: 208-13.
29. Gardemann A, Humme J, Stricker J, Nguyen QD, Katz N, Philipp M, Tillmanns H, Hehrlein FW, Rau M, Haberbosch W. Association of the platelet glycoprotein IIIa Pl^{A1/A2} gene polymorphism to coronary artery disease but not to nonfatal myocardial infarction in low risk patients. *Thromb Haemost* 1998; 80: 214-7.

30. Gardemann A, Knapp A, Katz N, Tillmanns H, Haberbosch W. No evidence for the CD31 C/G gene polymorphism as an independent risk factor of coronary heart disease. *Thromb Haemost* 2000; 83: 629.
31. Gardemann A, Lohre J, Cayci S, Katz N, Tillmanns H, Haberbosch W. The T allele of the missense Glu298Asp endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is associated with coronary heart disease in younger individuals with high atherosclerotic risk profile. *Artherosclerosis* 2002; 160: 167-75.
32. Gardemann A, Lohre J, Katz N, Tillmanns H, Hehrlein FW, Haberbosch W. The 4G/4G genotype of the plasminogen activator inhibitor 4G/5G gene polymorphism is associated with coronary atherosclerosis in patients at high risk for this disease. *Thromb Haemost* 1999; 82: 1121-6.
33. Gardemann A, Nguyen QD, Humme J, Stricker J, Katz N, Tillmanns H, Hehrlein FW, Rau M, Haberbosch W. Angiotensin II type 1 receptor A1166C gene polymorphism. Absence of an association with the risk of coronary artery disease and myocardial infarction and of synergistic effect with angiotensin-converting enzyme gene polymorphism on the risk of these disease. *Eur Heart J* 1998; 19: 1657-65.
34. Gardemann A, Ohly D, Fink M, Katz N, Tillmanns H, Hehrlein FW, Haberbosch W. Association of the insertion genepolymorphism of the apolipoprotein B signal peptide with myocardial infarction. *Atherosclerosis* 1998; 141: 167-75.
35. Gardemann A, Schwartz O, Haberbosch W, Katz N, Weiss T, Tillmanns H, Hehrlein FW, Waas W, Eberbach A. Positive association of the β fibrinogen H1/H2 gene variation to basal fibrinogen levels and to the increase in fibrinogen concentration during acute phase reaction but not to coronary artery disease and myocardial infarction. *Thromb Haemost* 1997; 77: 1120-6.

36. Gardemann A, Weidemann H, Philipp M, Katz N, Tillmanns H, Hehrlein FW, Haberbosch W. The TT genotype of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism is associated with the extent of coronary atherosclerosis in patients at the high risk for coronary artery disease. *Eur Heart J* 1999; 20 : 584-92.
37. Gardemann A, Weiss T, Schwartz O, Eberbach A, Katz N, Hehrlein FW, Tillmanns H, Waas W, Haberbosch W. Gene polymorphism but not catalytic activity of angiotensin I converting enzyme is associated with coronary artery disease and myocardial infarction in low risk patients. *Circulation* 1995; 92: 2796-9.
38. Gawaz M, Loftus JC, Bajt ML, Frojmovic MM, Plow EF, Ginsberg MH. Ligand bridging mediates integrin α IIb β 3 (platelet GP IIb-IIIa) dependant homotypic and heterotypic cell-cell interactions. *J Clin Invest* 1991; 8: 1128-34.
39. Gawaz M, Neumann FJ, Schömig A. Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease. Consequence for diagnosis and therapy. *Circulation* 1999; 99: e1-e11.
40. Gawaz M. Das Blutplättchen: Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und Therapie bei koronarer Herzerkrankung. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1999; 1. Auflage: 35.
41. Gemmati D, Serino ML, Moratelli S, Tognasso S, Ongaro A, Scapoli GL. Coexistence of factor V G1691A and factor II G20210A gene mutations in a thrombotic family is associated with recurrence and early onset of venous thrombosis. *Haemostasis* 2001; 31: 99-105.

42. Gensini GG. A more meaningful scoring system for determining the severity of coronary heart disease. *Am J Cardiol* 1983; 53: 606.
43. Gensini GG. Coronary arteriography. In: Braunwald E, ed. *Heart disease*. WB Saunders Co, Philadelphia 1980: 352-3.
44. Georges JL, Louhaci V, Poirier O, Evans A, Luc G, Arveiler D, Ruidarets JB, Cambien F, Tiret L. Interleukin-6 gene polymorphism and susceptibility to myocardial infarction. The ECTIM Study. *J Mol Med* 2001; 79 : 300-5.
45. Ginsberg MH, Loftus JC. Platelet integrins. *Thromb Haemost* 1995; 74: 352-9.
46. Gonzales-Conejero R, Lozano ML, Rivera J. Polymorphism of platelet glycoprotein Ib α associated with arterial thrombotic disease. *Blood* 1998; 92: 2771-6.
47. Green F, Hamsten A, Blombäck M, Humphries S. The role of β -fibrinogen genotype in determining plasma fibrinogen levels in young survivors of myocardial infarction and healthy controls from Sweden. *Thromb Haemost* 1993; 70: 915-20.
48. Gulec S, Aras O, Akar E, Tutar E, Omurlu K, Avci F, Dincer I, Akar N, Oral D. Methylene tetrahydrofolate reductase gene polymorphism and risk of premature myocardial infarction. *Clin Cardiol* 2001; 24: 281-4.
49. Hawiger J. Mechanisms involved in platelet vessel wall interaction. *Thromb Haemost* 1995; 74: 369-72.
50. Herman SM, Ricard S, Nicaud V. The P-selectin gene is highly polymorphic: reduced frequency of the Pro715 allele carriers in patients with myocardial infarction. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 1277-84.

51. Herrmann SM, Poirier O, Marques-Vidal P, Evans A, Arveiler D, Luc G, Emmerich J, Cambien F. The Leu33/Pro polymorphism (PI^{A1}/PI^{A2}) of the glycoprotein IIIa (GP IIIa) receptor is not related to myocardial infarction in the ECTIM study. *Thromb Haemost* 1997; 77: 1179-81.
52. Hingorani AD, Jia H, Stevens PA, Monteith PS, Brown MJ. A common variant in exon 7 of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene. *Clin Sci* 1995; 88: 21.
53. Ito T, Ishida T, Shimodaira S, Kitano K. Polymorphism of platelet membrane glycoprotein Iba and plasma von Willebrand factor antigen in coronary artery disease. *Int J Hematol* 1999; 70: 47-51.
54. Joven J, Simo JM, Vilella E, Camps J, Masana L, de Febrer G, Camprubi M, Richart C, Bardaji A, Casao E, Pocovi M, Civeira F. Lipoprotein (a) and the significance of the association between platelet glycoprotein IIIa polymorphism and the risk of premature myocardial infarction. *Artherosclerosis* 1998; 140: 155-9.
55. Kastrati A, Koch W, Gawaz M, Mehilli J, Böttiger C, Schömig K, von Beckerath N, Schömig A. PI^A polymorphism of glycoprotein IIIa and risk of adverse events after coronary stent placement. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 84-9.
56. Kawasaki ES. Sample preparation from blood, cells, and other fluids. In: *PCR protocols: A guide to methods and applications*. Eds: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. Academic Press Inc, San Diego 1990: 146-52.
57. Kekomaki S, Hamalainen L, Kauppinen-Makelin R, Palomaki H, Kaste M, Kontula K. Genetic polymorphism of platelet glycoprotein IIIa in patients with acute myocardial infarction and acute ischaemic stroke. *J Cardiovasc Risk* 1999; 6: 13-7.

58. Kiefel V, Kroll H, Bonnert J, Unkelbach K, Katzmann B, Nebenführer Z, Santoso S, Mueller-Eckhardt C. Platelet alloantigen frequencies in Caucasian: a serological study. *Transfus Med* 1993; 3: 237-42.
59. Koch W, Kastrati A, Böttiger C, Mehilli J, von Beckerath N, Schömig A. Interleukin-10 and tumor necrosis factor gene polymorphisms and risk of coronary artery disease and myocardial infarction. *Artherosclerosis* 2001; 159: 137-44.
60. Kroll H, Gardemann A, Fechter A, Haberbosch W, Santoso S. The impact of the glycoprotein Ia receptor subunit A1648G gene polymorphism on coronary artery disease and acute myocardial infarction. *Thromb Haemost* 2000; 83: 392-6.
61. Kroll H, Kiefel V, Santoso S. Clinical aspects and typing of alloantigens. *Vox Sang* 1998; 74: 345-54.
62. Kuijpers RWAM, Faber NM, Cuypers TM, Ouwehand WH, von der Borne AEGK. NH₂-terminal globular domain of human platelet glycoprotein Ib α has a methionine¹⁴⁵/threonine¹⁴⁵ amino acid polymorphism, which is associated with the HPA-2 (Ko) alloantigens. *J Clin Invest* 1992; 89: 381-4.
63. Kuijpers RWAM, Simsek S, Faber NM, Goldschmeding R, van Wermerkerken RKV, von dem Borne AEGK. Single point mutation in human glycoprotein IIIa is associated with a new platelet-specific alloantigen (Mo) involved in neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Blood* 1993; 81: 70-6.
64. Kunicki TJ and Newmann PJ. The biochemistry of the platelet specific antigens. In: *Current studies in hematology and blood transfusion*. A. Hassig, editor. S. Karger, Basel 1986: 18-32.
65. Kunicki TJ, Aster RH. Isolation and immunologic characterization of the human platelet alloantigen, P^{A1}. *Mol Immunol* 1979; 16: 353-60.

66. Kunicki TJ, Newmann PJ. The molecular immunology of human platelet proteins. *Blood* 1992; 80: 1386-404.
67. Lasne D, Krenn M, Pingault V, Arnaud E, Fiesinger JN, Aiach M, Rendu F. Interdonor variability of platelet response to thrombin receptor activation: influence of PI^{A2} polymorphism. *Br J Haematol* 1997; 99: 801-7.
68. Lefkowitz J, Plow EF, Topol EJ. Platelet glycoprotein IIb-IIIa receptors in cardiovascular medicine. *N Engl J Med* 1995; 332: 1553-9.
69. Li CQ, Gamer SF, Davies J, Smethurst PA, Wardell MR, Ouwehand WH. Threonine-145/methionine-145 variants of baculovirus produced recombinant ligand binding of von Willebrand factor. *Blood* 2000; 95: 205-10.
70. Lopez JA, Ludwig EH, McCarthy BJ. Polymorphism of human glycoprotein Ib α results from a variable number of tandem repeats of a 13-amino acid sequence in the mucin-like macroglycopeptide region. Structure-function implications. *J Biol Chem* 1992; 267: 10055-61.
71. Lyman S, Aster RH, Visentin GP, Newmann PJ. Polymorphism of human platelet membrane glycoprotein IIb associated with the Bak^a/Bak^b alloantigen system. *Blood* 1990; 75: 2343-48.
72. Mamotte CD, van Bockxmeer FM, Taylor RR. $PI^{A1/A2}$ polymorphism of glycoprotein IIIa and risk of coronary artery disease and restenosis following coronary angioplasty. *Am J Cardiol* 1998; 82: 13-6.
73. Marian AJ, Brugada R. Platelet glycoprotein IIIa PI^A polymorphism and myocardial infarction. *N Engl J Med* 1996; 335: 1071-2.

74. Mazzucato M, Pradella P, de Angelis V, Steffan A, De Marco L. Frequency and functional relevance of genetic threonine145/methionine145 145 dimorphism in platelet glycoprotein Ib α in an Italian population. *Transfusion* 1996; 36: 891-4.
75. McFarland JG, Aster RH, Bussel JB, Gianopoulos JG, Derbes RS, Newmann PJ. Prenatal diagnosis of neonatal alloimmune thrombocytopenia using allele specific oligonucleotide probes. *Blood* 1991; 78: 2275-82.
76. Meiklejohn DJ, Urbaniak SJ, Greaves M. Platelet glycoprotein IIIa polymorphism HPA-1b (PI^{A2}): no association with platelet fibrinogen binding. *Br J Haematol* 1999; 105: 664-6.
77. Melus V, Pullmann R, Hybenova J, Skerenova M, Pullmann JR. Is the PI^{A1/A2} polymorphism of the human platelet membrane glycoprotein IIIa gene a risk factor for myocardial infarction? *Bratisl Lek Listy* 1999; 100: 593-7.
78. Michelson AD, Furmann MI, Goldschmidt-Clermont P, Mascelli MA, Hendrix C, Coleman L, Hamlington J, Barnard MR, Kickler T, Christie DJ, Kundu S, Bray PF. Platelet GP IIIa PI(A) polymorphism display different sensitivities to agonists. *Circulation* 2000; 101: 1013-8.
79. Mikkelsen J, Perola M, Laippala P, Penttila A, Karhunen PJ. Glycoprotein IIIa PI^{A1/A2} polymorphism and sudden cardiac death. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 13-23.
80. Mikkelsen J, Perola M, Laippala P. Glykoprotein IIIa PI^A polymorphism associates with progression of coronary artery disease and with myocardial infarction in an autopsy series of middle-aged men who died suddenly. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2573-8.

81. Mikkelsen J, Perola M, Pentilla A, Goldschmidt-Clermont PJ, Karhunen PJ. The GP IIIa (beta 3 integrin) P^A polymorphism in the early development of coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2001; 154: 721-7.
82. Moroi M, Jung SM, Yoshida N. Genetic polymorphism of glycoprotein Ib. *Blood* 1984; 64: 622-9.
83. Mueller-Eckhardt C, Kiefel V, Santoso S. Review and update of platelet alloantigen systems. *Transfus Med Rev* 1990; 4: 98-109.
84. Mullis K, Faloona F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Meth Enzymol* 1987; 55: 335-50.
85. Murata M, Kawano K, Matsubara Y, Ishikawa K, Watanabe K, Ikeda Y. Genetic polymorphisms and risk of coronary artery disease. *Semin Thromb Hemost* 1998; 24: 245-50.
86. Murata M, Matsubara Y, Kawano K. Coronary artery disease and polymorphisms in a receptor mediating shear stress-dependent platelet activation. *Circulation* 1997; 96: 3281-5.
87. Newmann PJ, Derbes RS, Aster RH. The human platelet alloantigens P^{A1} and P^{A2} are associated with a leucine 33 / proline 33 amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by a DNA typing. *J Clin Invest* 1989; 83: 1778-81.
88. Newmann PJ, Martin LS, Knipp MA, Kuhn RA. Studies on the nature of the human platelet alloantigen, P^{A1}: Localisation to a 17.000-dalton polypeptide. *Mol Immunol* 1985; 22: 719-29.
89. Nurden AT. Polymorphisms of human platelet membrane glycoproteins: Structure and clinical significance. *Thromb Haemost* 1995; 74: 345-51.

90. Odawara M, Matsunuma A, Yamashita K. Platelet glycoprotein IIIa P1^A polymorphism and Japanese diabetic patients with coronary heart disease. *Lancet* 1996; 348: 1310.
91. Osborn SV, Hampton KK, Smillie D, Channer KS. Platelet glycoprotein IIIa gene polymorphism and myocardial infarction. *Lancet* 1996; 348: 1310.
92. Passarge E. Taschenatlas der Genetik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1994; 1. Auflage: 67.
93. Phillips DR, Charo IF, Parise LV, Fitzgerald LA. The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood* 1988; 71: 831-43.
94. Phillips DR, Charo IF, Scarborough RM. GP IIb-IIIa: the responsive integrin. *Cell* 1991; 65: 359-62.
95. Plow EF, D'Souza SE, Ginsberg MH. Ligand binding to GP IIb-IIIa: a status report. *Semin Thromb Hemost* 1992; 18: 324-32.
96. Plow EF, Ginsberg MH. Cellular adhesion: GP IIb-IIIa as a prototypic adhesion receptor. *Prog Haemost Thromb* 1989; 9: 117-56.
97. Rauch U, Osende JI, Fuster V, Badimon JJ, Fayad Z, Chesebro JH. Thrombus formation on atherosclerotic plaques. Pathogenesis and clinical consequence. *Ann Int Med* 2001; 134: 224-38.
98. Reguero JR, Cubero GI, Batalla A, Alvarez V, Heria S, Cortina A, Coto E. Apolipoprotein A1 gene polymorphism and risk of early coronary disease. *Cardiology* 1998; 90: 231-35

99. Ridker PM, Hennekens CH, Schmitz C, Stampfer MJ, Lindpaintner K. $PI^{A1/A2}$ polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis. *Lancet* 1997; 349: 385-8.
100. Rossi F, Rossi E, Pareti FI, Colli S, Tremoli E, Gallo L. In vitro measurement of platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade by abciximab: interindividual variation and increased platelet secretion. *Haematologica* 2001; 86: 192-8.
101. Roth GJ. Developing relationships: Arterial platelet adhesion, glycoprotein Ib, and leucin-rich glycoproteins. *Blood* 1991; 7: 5-19.
102. Samani NJ, Lodwick D. Platelet glycoprotein IIIa PI^A polymorphism and myocardial infarction. *Cardiovascular Research* 1997; 33: 693-7.
103. Santoso S, Kalb R, Kroll H, Walka M, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C, Newmann PJ. A point mutation leads to an unpaired cysteine residue and a molecular weight polymorphism of a functional platelet $\beta 3$ integrin subunit. *J Biol Chem* 1994; 269: 8439-44.
104. Santoso S, Kiefel V. Human platelet alloantigens. *Wien Klin Wochenschr* 2001; 113: 806-13.
105. Santoso S, Kiefel V. Human platelet alloantigens: update. *Vox Sang* 1998: 249-53.
106. Santoso S, Kunicki TJ, Kroll H, Haberbosch W, Gardemann A. Association of the platelet glycoprotein Ia C807T gene polymorphism with nonfatal myocardial infarction in younger patients. *Blood* 1999; 93: 2449-53.
107. Santoso S, Zimmermann P, Sachs UJ, Gardemann A. The impact of the Kozak sequence polymorphism of the glycoprotein $Ib\alpha$ gene on the risk and extent of coronary heart disease. *Thromb Haemost* 2002; 87: 345-6.

108. Santoso S. Platelet polymorphisms in thrombotic disorders. *Transfus Clin Biol* 2001; 8: 261-6.
109. Scaglione L, Bergerone S, Gaschino G. Lack of relationship between the $PI^{A1/A2}$ polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and premature myocardial infarction. *Eur J Clin Invest* 1998; 28: 385-8.
110. Schettler G, Greten H. *Innere Medizin. Verstehen-Lernen-Anwenden*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1998; 9. Auflage: 28.
111. Senti M, Aubo C, Bosch M, Pavesi M, Pena A, Masia R, Marrugat J. Platelet glycoprotein IIb/IIIa genetic polymorphism is associated with plasma fibrinogen levels in myocardial infarction patients. The REGICOR Investigators. *Clin Biochem* 1998; 31: 647-51.
112. Senti M, Aubo C, Bosch M. The relationship between smoking and triglyzeride-rich lipoproteins is modulated by genetic variation in the glycoprotein IIIa gene. *Metabolism* 1998; 47: 1040-1.
113. Shattil SJ. Function and regulation of the β_3 integrins in hemostasis and vascular biology. *Thromb Haemost* 1995; 74: 149-55.
114. Simsek S, Faber NM, Vlekke ABJ, Huiskes E, Goldschmeding R, von dem Borne AEGK. Determination of human platelet antigen frequencies in the Dutch population by immunotyping and DNA (allele-specific restriction enzyme) analysis. *Blood* 1993; 81: 835-40.
115. Smith N, Pathansali R, Bath P. $PI^{A1/A2}$ polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risk of cardiovascular disease. *Lancet* 1997; 349: 1099.

116. Tereshchenko SN, Levchuk NN, Drozdov VN. Polymorphism of GP IIIa platelet glycoprotein gene $PI^{A1/A2}$ compared to plasma hemostasis in myocardial infarction patients. *Ter Arkh* 1999; 71: 66-70.
117. Thomas AE, Green FR, Kelleker CH, Wilkes HC, Brennan PJ, Meade TW, Humphries SE. Variation in the promotor region of the β fibrinogen gene is associated with plasma fibrinogen levels in smokers and nonsmokers. *Thromb Haemost* 1991; 65: 487-90.
118. Unkelbach K, Kalb R, Breitfeld C, Santoso S, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C. New polymorphism on platelet glycoprotein IIIa gene recognized by endonuclease *Msp I*: implications for PI^A typing by allele-specific restriction analysis. *Transfusion* 1994; 34: 592.
119. Unkelbach K, Kalb R, Santoso S, Kroll H, Mueller-Eckhardt C, Kiefel V. Genomic RFLP typing of human platelet alloantigens Zw (PIA), Ko, Bak and Br (HPA-1, 2, 3, 5). *Br J Haematol* 1995; 89: 169-76.
120. Van Aken H, Reinhart K, Zimpfer M. *Intensivmedizin*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2001; 1. Auflage: 581.
121. van Loghem JJ, Dormeijer H, van der Hart M. Serological and genetical studies on a platelet antigen (Zw). *Vox Sang* 1959; 4: 161-9.
122. Vijayan KV, Goldschmidt-Clermont PJ, Roos C, Bray PF. The PI^{A2} polymorphism of integrin β_3 enhances outside - in signaling and adhesive functions. *J Clin Invest* 2000; 105: 793-802.
123. Visentin GP. Heparin-induced thrombocytopenia: molecular pathogenesis. *Thromb Haemost* 1999; 82: 448-56.

124. von dem Borne AEGK, Decary F. ICSH/ISBT Working party on platelet serology nomenclature of platelet-specific antigens. *Vox Sang* 1990; 58: 176.
125. Walchshofer S, Ghali D, Fink M, Panzer-Grünmayer ER, Panzer S. A rare leucine⁴⁰/Arginine⁴⁰ polymorphism on platelet glycoprotein IIIa is linked to the human platelet antigen 1b. *Vox Sang* 1994; 67: 231-4.
126. Wang J, Warzecher D, Wilchen D, Wang XL. Polymorphism in the gelatinase B gene and severity of coronary arterial stenosis. *Clin Sci* 2001 ; 101: 87-92.
127. Wang R, Furihata K, McFarland JG, Friedmann K, Aster RH, Newman PJ. An amino acid polymorphism within the RGD binding domain of platelet membrane glycoprotein IIIa is responsible for the formation of the Pen^a/Pen^b alloantigen system. *J Clin Invest* 1992; 90:2038-43.
128. Wang R, McFarland JG, Kekomaki R, Newmann PJ. Amino acid 489 is coded by a mutational "hot spot" on the beta 3 integrin chain: the CA/TU human platelet alloantigen system. *Blood* 1993; 82: 3386-91.
129. Wang XL, Sim AS, Badenshop RF, McCredie RM, Wilchen DEL. A smoking dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Nat Med* 1996; 2: 41-5.
130. Warkentin TE, Chong BH, Greinacher A. Heparin-induced thrombocytopenia: toward consensus. *Thromb Haemost* 1998; 79: 1-7.
131. Weiss EJ, Bray PF, Tayback M, Schulman SP, Kickler TS, Becker LC, Weiss JL, Gerstenblith G, Goldschmidt-Clermont PJ. A polymorphism of a platelet receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. *N Engl J Med* 1996; 334: 1090-4.

132. Weiss EJ, Goldschmidt-Clermont PJ, Grigoryev D, Yin Y, Kickler TS, Bray PF. A monoclonal antibody (SZ21) specific for platelet GP IIIa distinguishes P1^{A1} from P1^{A2}. *Tissue Antigens* 1995; 46: 374-81.
133. Weiss HJ, Turitto VT, Baumgartner HR. Effect of shear rate on platelet interaction with subendothelium in citrated and native blood. 1. Shear rate dependent decrease of adhesion in von Willebrand's disease and the Bernard-Soulier syndrome. *J Lab Clin Med* 1978; 92: 750-64.
134. Wenzel K, Felix S, Kleber FX, Brachold R, Menke T, Schattke S, Schulte KL, Gläser C, Rohde K, Baumann G, Speer A. E-selectin polymorphism and atherosclerosis: an association study. *Hum Mol Gen* 1994; 3: 1935-7.
135. Zimrin AB, Gidwitz S, Lord S, Schwartz E, Bennet JS, White GC III, Poncz M. The genomic organization of platelet glycoprotein IIIa. *J Biol Chem* 1990; 265: 8590-5.
136. Zotz RB, Winkelmann BR, Nauck M, Giers G, Maruhn-Debowski B, März W, Scharf RE. Polymorphism of platelet membrane glycoprotein IIIa: human platelet antigen 1b (HPA-1b/P1^{A2}) is an inherited risk factor for premature myocardial infarction in coronary disease. *Thromb Haemost* 1998; 79: 731-5.

Lebenslauf

Name:	Jörg Humme
Geburtsdatum:	11.11.1968
Geburtsort:	Dortmund
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	verheiratet
Wohnort:	Johann-Sebastian-Bach-Str. 17 35392 Gießen
Schulbildung:	
1975-1979	Grundschule Dortmund - Kirchhörde
1979-1988	Gymnasium und Abitur, Dortmund
Studium:	
1990- 1998	Medizinstudium an der Justus- Liebig- Universität Gießen
Mai 1998	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Berufstätigkeit:	
1998-1999	Arzt im Praktikum am Klinikum Wetzlar, Abteilung Anästhesie
1999-2000	Assistenzarzt in der Abteilung für Anästhesie und Intensivmedizin der Philipps-Universität Marburg
seit 12/2000	Assistenzarzt am Klinikum Wetzlar, Abteilung Anästhesie

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. Andreas Gardemann für die Überlassung des Themas, die jederzeit herzliche und anregende Auseinandersetzung mit dem Thema, für die großartige Hilfestellung beim Erstellen dieser Arbeit und nicht zuletzt für seine zuverlässige Betreuung.

Herrn Prof. Dr. Dr. Norbert Katz danke ich für die freundliche Unterstützung meiner Arbeit.

Weiterhin möchte ich Frau Monika Philipp für Ihre engagierte und zuverlässige Unterstützung bei der praktischen Versuchsvorbereitung und -durchführung ganz herzlich danken.

Darüber hinaus gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Instituts für Klinische Chemie, der Klinik für Kardiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen und der kardiologischen Abteilung der Kerckhoff Klinik, Bad Nauheim, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zuletzt, dafür umso mehr, möchte ich meiner Familie und Kerstin für die nie endende Unterstützung und ihr Verständnis danken.