

Der C-154T-Genpolymorphismus des thrombozytären
Kollagenrezeptors Glykoprotein VI als genetischer Risikofaktor für
Patienten mit koronarer Herzkrankheit

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

vorgelegt von Karina Reichhardt
aus Lich

Gießen 2008

Aus dem Institut für Klinische Immunologie
und Transfusionsmedizin
des Fachbereiches Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Direktor: Prof. Dr. Gregor Bein

Gutachter: Prof. Dr. Gregor Bein

Gutachter: Prof. Dr. Daniela Steinberger

Tag der Disputation: 12. August 2008

Inhaltsverzeichnis

1.	Einführung	1
1.1	Thrombozyten	1
1.2	Primäre Aufgaben der Thrombozyten	2
1.2.1	Adhäsion	2
1.2.2	Aggregation	3
1.2.3	Aktivierung	3
1.3	Glykoproteinrezeptor GPVI	6
1.3.1	Struktur	6
1.3.2	Physiologie und Biochemie	7
1.3.3	Pathophysiologie und -biochemie	10
1.3.4	Genpolymorphismen	12
1.4	Koronare Herzkrankheit und Myokardinfarkt	15
1.4.1	Pathophysiologie	18
1.4.2	Myokardinfarkt	19
1.5	Fragestellung	21
2.	Material und Methoden	22
2.1	Studienpopulation	22
2.1.1	Patientengruppe	22
2.1.2	Kontrollgruppe	22
2.1.3	Datenerhebung bei Patienten und gesunden Probanden	23
2.1.4	Koronarangiographie und koronare Herzkrankheit	23
2.1.5	Definition von Niedrig- und Hochrisikogruppen	26
2.1.6	Probanden für die phänotypische Untersuchung	26

2.2. Probensammlungen und -aufbereitungen für die klinisch chemische Analytik, zur Gewinnung der Thrombozyten und zur Typisierung der Genpolymorphismen	26
2.2.1 Proben für die klinisch chemische Analytik	26
2.2.2 Antikörper und Antiseren für die Durchflußzytometrie	26
2.2.3 Isolierung von Thrombozyten für die Durchflußzytometrie	27
2.2.4 Herstellung von Thrombozytenlysate für den Immunoblot	27
2.3 Klinisch chemische Parameter	28
2.3.1 Gesamtcholesterin	28
2.3.2 Triglyzeride	28
2.3.3 Lipoprotein (a)	29
2.3.4 Apolipoproteine AI und B	29
2.4 Genotypische Untersuchungen	30
2.4.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	30
2.4.2 Polymerase-Ketten-Reaktion mit sequenzspezifischen Primern (PCR-SSP)	30
2.4.3 Auftrennung von PCR-Produkten in der Agarosegel-Elektrophorese	31
2.4.4 Sequenzierung	33
2.5 Phänotypische Untersuchungen	35
2.5.1 Durchflußzytometrie (FACS)	35
2.5.2 Immunoblot	35
2.6 Statistik	36
3. Ergebnisse	37
3.1 Charakterisierung der Patienten- und Kontrollgruppe	37
3.1.1 Altersstruktur des Gesamtkollektivs	37
3.1.2 Altersstruktur innerhalb der Patienten- und Kontrollgruppe	37
3.1.3 Myokardinfarkt-Verteilung innerhalb der Patientengruppe	39

3.1.4	Zusammenhang zwischen koronarer Herzkrankheit und Myokardinfarkt in der Patientengruppe	40
3.1.5	Zusammenhang zwischen Gensini-Score und koronarer Herzkrankheit	42
3.1.6	Zusammenhang zwischen Gensini-Score und Schweregrad der koronaren Herzkrankheit	43
3.1.7	Zusammenhang zwischen Gensini-Score und Myokardinfarktrisiko	44
3.2	Verteilung der Risikofaktoren der koronaren Herzkrankheit und des Myokardinfarktes	46
3.2.1	Verteilung der Risikofaktoren bei Herzgesunden und bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit	46
3.2.2	Verteilung der Risikofaktoren in Abhängigkeit vom Myokardinfarkt	48
3.3	Verteilung der GPVI C-154T-Genotypen	49
3.4	Phänotypische Untersuchungen des GPVI C-154T-Genpolymorphismus	51
3.5	Der Zusammenhang zwischen dem GPVI C-154T -Genpolymorphismus und dem Risiko für eine koronare Herzkrankheit und einen Myokardinfarkt	54
3.5.1	Risiko für die koronare Herzkrankheit	54
3.5.2	Schweregrad der koronaren Herzkrankheit	55
3.5.3	Risiko für den Myokardinfarkt	57
4.	Diskussion	59
4.1	Zur Validität der Studienpopulation	59
4.2	Genpolymorphismen von thrombozytären Glykoproteinen und die koronare Herzkrankheit	63
4.2.1	Der C-154T Genpolymorphismus und die koronare Herzkrankheit	66
4.3	Die klinische Bedeutung des Glykoproteins VI	67

5.	Literaturverzeichnis	72
6.	Anhang	84
6.1	Selbständigkeitserklärung	84
6.2	Zusammenfassung	85
6.3	Summary	86
6.4	Danksagung	87
6.5	Lebenslauf	88

1. Einführung

1.1 Thrombozyten

Thrombozyten sind die kleinsten korpuskulären Bestandteile des zirkulierenden Blutes. Sie entstehen als Abschnürung des Zytoplasmas von Megakaryozyten im Knochenmark und werden dann ins periphere Blut ausgeschwemmt. Sie haben einen Durchmesser von 2 – 4 μm und besitzen im Gegensatz zu anderen eukaryoten Zellen keinen Zellkern, sie werden deshalb auch als „anukleäre Zellen“ bezeichnet (Gawaz, 1999).

Die Thrombozyten haben im peripheren Blutkreislauf eine Überlebensdauer von fünf bis elf Tagen, bevor sie durch das retikuloendotheliale System der Leber und Milz abgebaut werden. Die physiologische Thrombozytenzahl im peripheren Blut beträgt 150.000–350.000 pro μl Blut (Weiss und Jelkmann, 1997).

Thrombozyten kommen in einer ruhenden und in einer aktivierten Form vor. Ruhende Thrombozyten weisen eine diskoide Form mit einer Oberfläche von acht μm^2 auf. Werden die Thrombozyten aktiviert, so kommt es zu einer Formänderung, dem so genannten „shape change“ (Gawaz, 1999). Dies wird durch die Organisation verschiedenen Zytoskelettproteine erreicht. Folge dieser Aktivierung ist die Bildung von Pseudopodien, wodurch sich die Oberfläche auf 13 μm^2 vergrößert. Die Pseudopodien begünstigen die effektive Abdichtung der Gefäßwandläsion. Zudem wird erst durch die Formveränderungen die Bindungsstelle für Fibrinogen auf dem Glykoprotein (GP) IIb-IIIa-Komplex freigelegt, die zur Aggregation der Thrombozyten benötigt wird (Gawaz, 1999).

Die Zytoplasmamembran der Thrombozyten besteht, vergleichbar mit anderen Zellen, aus einer zellspezifisch polarisierten Phospholipidschicht, auch „bilayer“ genannt. In ihr ist eine Vielzahl von Membranproteinen integriert, wie zum Beispiel Rezeptoren für ADP oder Fibrinogen und Kollagen (Gawaz, 1999).

Intrazellulär finden sich in den Thrombozyten verschiedene Speichergranula. Es können elektronendichte Granula, α -Granula und Lysosomen unterschieden werden. Die elektronendichten Granula enthalten ADP/ATP, GDP/GTP, Calcium und Serotonin. In den α -Granula können Fibrinogen, die Gerinnungsfaktoren V und VIII, Thrombospondin, Plättchenfaktor 4 (PF4) und verschiedene Wachstumsfaktoren nachgewiesen werden (Weiss und Jelkmann, 1997). Bei der

Thrombozytenaktivierung werden die Inhaltsstoffe der elektronendichten und der α -Granula freigesetzt (Gawaz et al., 2005).

1.2 Primäre Aufgaben der Thrombozyten

Eine der wichtigsten Aufgaben der Thrombozyten besteht darin, bei Gefäßwandverletzungen ein Austreten von Flüssigkeit aus dem Gefäß zu verhindern. Dies erfolgt durch eine Abdichtung des Defektes und Bildung eines hämostatischen Pfropfes, wodurch es zur Blutstillung (Hämostase) kommt. Die Blutstillung kann in eine primäre und eine sekundäre Blutstillung unterschieden werden (Gawaz, 1999).

Bei der primären Hämostase kommt es zu einer Vasokonstriktion und der Bildung eines Plättchenthrombus. Dieser Thrombus entsteht durch Adhäsion der Thrombozyten an die Läsion und die darauf folgende Aktivierung und Aggregation weiterer Blutplättchen durch Fibrinogenbindung zur Bildung des primär hämostatischen Thrombus ausgelöst durch die Freisetzung von ADP (Sixma et al., 1997). Unter sekundärer Hämostase versteht man die Aktivierung der Gerinnungskaskade (Gawaz, 1999). Hierbei wird aus Prothrombin das Thrombin abgespalten, welches wiederum Fibrin aus Fibrinogen bildet und seinerseits den Thrombus weiter verfestigt (Santoso und Kunicki, 2001). Um ein unkontrolliertes Thrombuswachstum zu verhindern, steht unter physiologischen Verhältnissen der Hämostase die Fibrinolyse entgegen, welche ein Auflösen der entstandenen Thromben durch Aktivierung von Plasminogen zur Folge hat. Des Weiteren wirken die körpereigenen Enzyme Antithrombin III, Protein C und S der Hämostase entgegen (Weiss und Jelkmann, 1997).

1.2.1 Adhäsion

Beim Vorliegen einer Gefäßwandverletzung kommt es nach dem ersten Kontakt der Thrombozyten mit der Läsion zu deren Aktivierung. Dies hat eine Formveränderung der Blutplättchen und die Ausschüttung der Granulainhaltsstoffe zur Folge (Clemetson, 1995).

Der Adhäsionsvorgang wird durch thrombozytäre Glykoproteine gesteuert. Hier ist besonders die Affinität des von Willebrand Faktors (vWF), welcher sich im Subendothel der Gefäßwand befindet, mit dem GPIb-V-IX-Komplex auf den

Thrombozyten zu nennen. Dieser Vorgang tritt beim Vorliegen hoher Scherkräfte ($\geq 1000/s$), wie bei durch Atherosklerose verengten Gefäßen, besonders ausgeprägt auf (Clemetson, 1995). Liegen dagegen nur geringe Scherkräfte vor, so wird die Thrombozytenaktivierung am ehesten durch das GPVI vermittelt (Andrews et al., 2001). Die primäre Adhäsion wird dann durch weitere Interaktionen via Kollagenrezeptoren (GPIa-IIa und GPVI) und Fibrinogenrezeptor (GPIIb-IIIa) verstärkt und stabilisiert (Shattil et al., 1994; Nieswandt und Watson, 2003).

GPIa-IIa und GPVI nehmen eine zentrale Rolle bei der Interaktion zwischen Kollagen und Thrombozyten ein (Kunicki, 2001; Furihata et al., 2001). Dieser Vorgang ist sowohl für die physiologische Hämostase als auch für die pathologische Thrombusbildung verantwortlich.

1.2.2 Aggregation

Über Fibrinogenbrücken werden die an der Läsion adherierenden Thrombozyten miteinander verbunden, wodurch eine bessere Abdichtung der Gefäßläsion erreicht wird (Sixma et al., 1997). Eine zentrale Bedeutung nimmt dabei der GPIIb-IIIa-Komplex ein, dieser legt erst nach Aktivierung der Thrombozyten seine Fibrinogenbindungsstellen frei. Die Aktivierungsprozesse der Thrombozyten werden zum einen durch die Bindung des GPIa-IIa an das an der Gefäßwandverletzung frei liegende Kollagen in Gang gebracht (Furihata et al., 2003). Zum anderen ist die Bindung von GPIIb-IIIa Ca^{2+} -abhängig, das in ausreichender Menge im Plasma und zusätzlich in thrombozytären Granula vorliegt. Auch GPVI bindet spezifisch an Kollagen und bringt damit die Aktivierungsprozesse in Gang (Jandrot-Perrus et al., 2000).

1.2.3 Aktivierung

Während der Thrombozytenaktivierung kommt es durch die Phospholipasen C und A_2 und der Adenylatzyklase zur Bildung von Botenstoffen, den so genannten „second messenger“. Die Thrombozyten unterliegen während dieses Vorgangs auch morphologischer Veränderungen (Marcus und Safier, 1994). So nimmt die Thrombozytenoberfläche zu, Oberflächenrezeptoren werden aktiviert und die Membranphospholipide werden entsprechend modifiziert (Gawaz, 1999).

Im Laufe der Aktivierung werden Substanzen, wie z. B. Thrombin und ADP freigesetzt (Sixma et al., 1997). Diese Stoffe führen wiederum dazu, dass G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und im Zuge dessen auch bestimmte Enzymkomplexe aktiviert werden (Quinton et al., 2002). Hier sind als wichtige Enzyme wieder die Phospholipasen C und A₂ und die Adenylatzyklase zu nennen (Sixma et al., 1997). Die Phospholipase C spaltet Phosphoinositol-4,5-bisphosphonat (PIP₂) in Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP₃) und 1,2-Diacylglycerol (DG) (Watson und Gibbins, 1998). Das IP₃ bewirkt eine Erhöhung der Ca²⁺-Freisetzung aus dem tubulären System der Thrombozyten, während DG die Proteinkinase C in einen aktivierten Zustand versetzt (Gawaz, 1999). Dies führt in den Thrombozyten zu einer vermehrten Freisetzung der granulären Speicherstoffe, einer Aktivierung der Phospholipase A₂ und der Aktivierung des GPIIb-IIIa-Komplexes durch Phosphorylierung der GPIIIa-Untereinheit (Gawaz, 1999; Clemetson, 1995). Die Phospholipase A₂ wird außerdem noch durch die erhöhte intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration aktiviert (Sixma et al., 1997). Der erhöhte Calciumspiegel katalysiert die Freisetzung von Arachidonsäure aus der Zytoplasmamembran, aus der wiederum das Thromboxan A₂ gebildet wird (Sixma et al., 1997). Die Aufgaben des Thromboxans A₂ bestehen u. a. in einer Stimulation eines speziellen Rezeptors auf der Thrombozytenoberfläche mit nachfolgender Sekretion weiterer Granulainhaltsstoffe. Außerdem fördert das Thromboxan A₂ über eine Vasokonstriktion noch zusätzlich die Thrombusbildung (Marcus und Safier, 1993). Durch Expression von Phosphatidylserinen (PS), kommt es zu einer gesteigerten Prothrombinaseaktivität. Prothrombin wird folglich in das koagulierende Thrombin umgewandelt, wodurch die Blutgerinnung aktiviert wird (Kuijpers et al., 2003). Diese Prothrombinaseaktivität scheint wohl nach neueren Erkenntnissen auch von der Dichte und dem Genotyp des GPVI abhängig zu sein (Siljander et al., 2004).

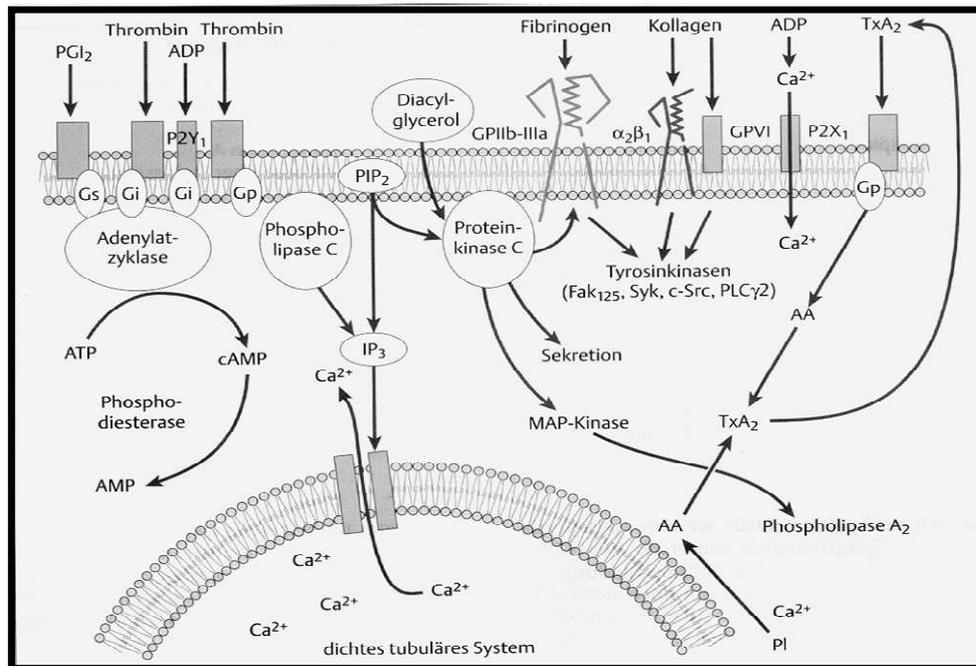


Abb. 1 Mechanismus der Signalübertragung bei der Thrombozytenaktivierung (nach Gawaz, Thieme 1999)

Die Oberflächenrezeptoren GPIIb-IIIa bzw. GPIa-IIa und GPVI werden über Fibrinogen und Kollagen aktiviert (Nakamura et al., 1999). Diese Kollagenrezeptoren aktivieren über die Proteintyrosinkinase syk ($p72^{\text{syk}}$) die Phosphorylierung der Phospholipase C γ 2 (PLC γ 2), bewirken somit die Mobilisation von Ca²⁺ und setzen die PIP₂-abhängige Signalkaskade in Gang (Watson and Gibbins, 1998; Sixma et al., 1997). Die Aktivierung via GPVI führt zur Bindung von $p72^{\text{syk}}$ an den „immunreceptor tyrosine-based activation motif“ (ITAM) in der γ -Kette des Fc γ R und führt damit zu einer Aktivierung und Verstärkung der Kollagen-Bindung (Inoue et al., 1999). Weiterhin verstärkt GPVI die Adhäsion der Thrombozyten durch Aktivierung der β_1 und β_3 -Integrine, die zum weiteren Thrombuswachstum führen (Holtkötter et al., 2001). Nieswandt et al. (2000) zeigten zusätzlich, dass die Funktion von GPVI, im speziellen die Kollagen-induzierte Thrombozytenaktivierung, von dem Vorhandensein des Fc γ R abhängig ist.

In neueren Studien wurde eine synergistische Interaktion zwischen GPIa-IIa und GPVI bei der Thrombozytenaktivierung beobachtet (Siljander et al., 2004; Nieswandt und Watson, 2003; Kuijpers et al., 2003). Für die Adhäsion an Kollagen wird GPIa-IIa benötigt, um GPVI zu aktivieren. Damit kommt es zur verstärkten

Adhäsion der Thrombozyten an Kollagen (Nieswandt und Watson, 2003). In Abwesenheit von GPIa-IIa kommt es zu einer verminderten Thrombozytenadhäsion mit der Folge einer schwächeren Aggregation. Es wird vermutet, dass dies mit einer fehlenden Ca^{2+} -Mobilisation und PS-Expression auf der Thrombozytenoberfläche einhergeht (Kuijpers et al., 2003). Siljander et al. (2004) bestätigten diese Vermutung und zeigten, dass es zunächst zu einer Anlagerung der Thrombozyten an den vWF kommt, wodurch die Adhäsion durch GPIa-IIa an Kollagen verstärkt wird und es abschließend zur Aktivierung der Thrombozyten durch GPVI kommt. Somit mehren sich die Hinweise, dass an der Bildung eines stabilen Thrombus die Interaktionen mehrerer Rezeptoren beteiligt sind. Bei Verminderung oder Fehlen eines einzelnen dieser Rezeptoren (GPIa-IIa, GPVI und GPIb-V-IX) kommt es nur selten zu Gerinnungsstörungen (Chen et al., 2001; Snell et al., 2002). Fehlen allerdings zwei oder alle drei Rezeptoren, werden weitere Agonisten wie Thrombin, ADP oder Thromboxan A_2 benötigt, um eine Gefäßläsion „abdichten“ (Nieswandt und Watson, 2003; Siljander et al., 2004).

Um eine überschießende Thrombusbildung zu verhindern, existieren so genannte „negative Feedback-Mechanismen“ (Gawaz, 1999). So bewirken zum Beispiel die von aktivierten Thrombozyten sezernierten Substanzen wie ADP/ATP, Serotonin oder Thromboxan A_2 eine Stimulierung von cGMP in den Endothelzellen (Marcus und Safier, 1993). Diese Konzentrationserhöhung des cGMP führt zur vermehrten Bildung von Stickstoffmonoxid (NO), welches dem „endothelium derived relaxing factor“ (EDRF) entspricht. Das NO wirkt zum einen über die Aktivierung der Adenylatzyklase, was eine vermehrte Bildung des auf Thrombozyten inhibitorisch wirkenden cAMP zur Folge hat (Marcus und Safier, 1993). Zum anderen wirkt es als Vasodilatator der Thrombozytenaktivierung entgegen (Gawaz, 1999).

1.3 Glykoproteinrezeptor GPVI

1.3.1 Struktur

GPVI wurde das erste Mal in der Literatur von Sugiyama et al. (1987) als 62kDa-schweres Polypeptid beschrieben. In den folgenden Jahren wurde GPVI genauer untersucht (Clemetson et al., 1999; Jandrot-Perrus et al., 2000; Ezumi et al., 2002). Das Glykoprotein VI wird auf dem Chromosom 19 an der Stelle 19q13.4

codiert und besteht aus acht verschiedenen großen Exons (Ezumi et al., 2000). Im Gegensatz zu GPIIb/IIIa findet man das GPVI nur in Megakaryozyten und Thrombozyten (Kunicki et al., 2001). Es gehört zu der Familie der Immunglobuline, und zeigt eine Homologie zu dem Fc Rezeptor für IgA (FcαR) und zum NK-Rezeptors (Jandrot-Perrus et al., 2000; Moroi et Jung, 2004).

Das GPVI hat eine Molekularmasse von 60 kDa (Moroi et al., 1989). Ihre full-length cDNA besteht aus 1.017 Basenpaaren, die für ein Protein aus 319 Aminosäuren codieren (Clemetson et al., 2001). Hervorzuheben ist dabei die Signalsequenz aus 23 Aminosäuren, welche in der extrazellulären Kette (249 Aminosäuren) lokalisiert ist. Der transmembrane Anteil besteht aus 19 Aminosäuren und der etwas größere intrazelluläre aus 51 Aminosäuren (Clemetson et al., 1999). Über Arginin (Arg252) scheint der Rezeptor eine nicht kovalente Verbindung mit Aspartat (Asp11) der Fcγ-Untereinheit einzugehen (Miura et al., 2002; Smethurst et al., 2004). Allerdings benötigt das GPVI zusätzlich zur transmembranen Arginin-Region auch den zytoplasmatischen Anteil, um eine Verbindung mit der Fcγ-Untereinheit herzustellen (Berlanga et al., 2002). Seine extrazelluläre Region besitzt zwei Immunglobulin-ähnliche Domänen, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind und eine Mucin-ähnliche Serin/Threonin-Region enthalten (Miura et al., 2000).

1.3.2 Physiologie und Biochemie

Die Fcγ-Untereinheit des GPVI enthält eine ITAM-Domäne und ist damit für die Src-Tyrosinkinase-abhängige Phosphorylierung mitverantwortlich (Clemetson et al., 1999). Der zytoplasmatische Anteil des GPVI besitzt eine vorwiegend basische Region als Bindungsstelle für Calmodulin und eine Prolin-reiche Sequenz zur Interaktion mit der SH3-Domäne der Src-Tyrosinkinase (Joutsu-Korhonen, 2003; Locke et al., 2003). Bei Calmodulin handelt es sich um ein Protein, das die Wirkung von intrazellulärem Calcium vermittelt und die Aktivität von Proteinkinasen steuert (Rhoads und Friedberg, 1997). Fehlt eine dieser beiden Regionen, werden die Aktivierungsprozesse von GPVI deutlich abgeschwächt (Locke et al., 2003). Das Calmodulin scheint außerdem noch in der Regulation der Dichte des GPVI auf der Thrombozytenoberfläche einzugreifen (Gardiner et al., 2004). Schlussendlich greift der zytoplasmatische Anteil des GPVI auch unabhängig von der Fcγ-Kette in die Signalkaskade nach Aktivierung des

Rezeptors ein (Gardiner et al., 2004). Miura et al. (2002) konnten zeigen, dass auf der Thrombozytenoberfläche eine Dimerisierung des GPVI vorliegt. So sind zwei GPVI-Fc-Moleküle durch eine Disulfidbrücke über das Cystin in der Fc-Domäne verbunden. Über diese Dimerisierung wird eine Affinitätserhöhung zu Kollagen erreicht (Moroi und Jung, 2004). Die für den GPVI-Rezeptor entscheidende Sequenz scheint ein sich wiederholendes Glycin-Prolin-Hydroxyprolin-Triplet (Gly-Pro-Hyp) zu sein, welches in der Triple-Helix-Struktur des Kollagens zu finden ist (Kehrel et al., 1998; Clemetson et al., 1999). Dabei ist festzuhalten, dass GPVI lediglich mit unlöslichen faserigen Kollagen reagiert, es zeigt keinerlei Affinität zu löslichem Kollagen (Moroi und Jung, 2004).

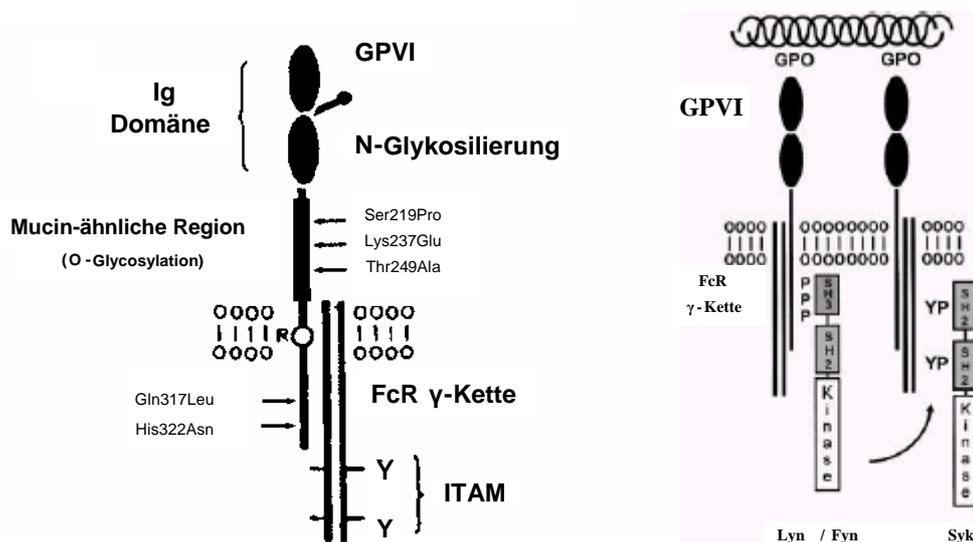


Abb. 2 Glykoprotein VI-FcR γ -Komplex

Das GPVI besteht aus zwei Immunglobulin-Domänen, die mit einer Mucin-ähnlichen Region verbunden sind. Über das Arginin (R) im transmembranen Anteil ist das GPVI mit der FcR γ -Untereinheit verbunden, die eine ITAM-Domäne enthält. Verschiedene Polymorphismen im Stamm und im intrazellulären Anteil sind dargestellt.

Kollagen bindet über die Gly-Pro-Hyp-Triplets (GPO) an den GPVI-FcR γ -Komplex. Die Prolinreiche Sequenz in der zytosomatischen Kette bindet an die SH3-Domäne der Src-Tyrosinkinase, wodurch diese aktiviert wird und an das ITAM der Fc γ -Kette bindet. Daraufhin kommt es zur Interaktion von der syk-Tyrosinkinase mit diesen Domänen und startet damit die Signalkaskade mit Phosphorylierung von PLC γ 2 und Ausschüttung von intrazellulärem Ca²⁺ (Nieswandt und Watson, 2003).

Die Aktivierung dieses Rezeptors löst intrazellulär über p72^{Syk} eine Signalkaskade über Phosphatkinase-Proteine aus, die die Ausschüttung der Granulainhaltsstoffe zur Aggregation induzieren (Kehrel, 1995). Dabei wird die Fc γ -Kette phosphoryliert, welche wiederum die Phosphorylierung der PLC γ 2 induziert

(Nieswandt et al., 2000; Quinton et al., 2002). Folge dieser chemischen Reaktion ist dann eine intrazelluläre Ca^{2+} -Mobilisierung, welche letztendlich über den IP_3 -abhängigen Weg erfolgt (Inoue et al., 1999). Wird die transmembrane Aminosäure Arginin (Arg252), die für die Kopplung des Fcy mit GPVI verantwortlich ist, verändert oder fehlt diese ganz, so kann der Rezeptor nicht aktiviert und somit auch kein Calcium ausgeschüttet werden (Locke et al., 2003). Während die Aktivierung der Tyrosinproteinkinase c-Src von der Interaktion zwischen GPIa-IIa und Kollagen abhängig scheint, wird die Tyrosinproteinkinase Syk dagegen bei fehlendem GPVI nicht entsprechend aktiviert (Kehrel et al., 1998). Dies hat zur Folge, dass unter anderem die „focal adhesion kinase“ (FAK) und $\text{PLC}\gamma 2$ nicht phosphoryliert werden und so die für die Blutgerinnung entscheidenden Reaktionen ausbleiben (Ichinohe et al., 1999)

Ichinohe et al. (1995) zeigten in einer anderen Arbeit, dass GPVI in die Phosphorylierungsvorgänge nach Bindung der Thrombozyten mit Kollagen eingreift. Die Verbindung zwischen GPVI und Kollagen ist für die Thrombozytenaggregation und -aktivierung essentiell (Clemetson et al., 1999). Die GPVI vermittelte Thrombozytenaggregation wird in voneinander unabhängigen Reaktionswegen durch Calcium bzw. über die Phosphatkinase C reguliert (Quinton et al., 2002). Zu einer weiteren Potenzierung der primären Aggregation kommt es durch das sezernierte ADP, das entsprechende Prozesse mittels Protein G gekoppelten Rezeptoren auslöst (Quinton et al., 2002). So betonten Nieswandt und Watson (2003) die Wichtigkeit der sekundären Mediatoren wie ADP und TXA_2 als Botenstoffe. Fehlen diese Substanzen, so kommt es zu einer verminderten Thrombozytenaggregation durch Kollagen. Die Folge ist eine Adhäsion und schwache Aggregation mittels GPIa-IIa und GPIIb-IIIa (Nieswandt und Watson, 2003). Des Weiteren werden ADP und TXA_2 zur Aktivierung der Thrombozyten benötigt, die nicht in direkten Kontakt mit Kollagen kommen können. Durch diese Aktivierung kann ein Thrombus gebildet werden, obwohl nur die unterste Schicht der angelagerten Thrombozyten durch Kollagen aktiviert werden (Quinton et al., 2002).

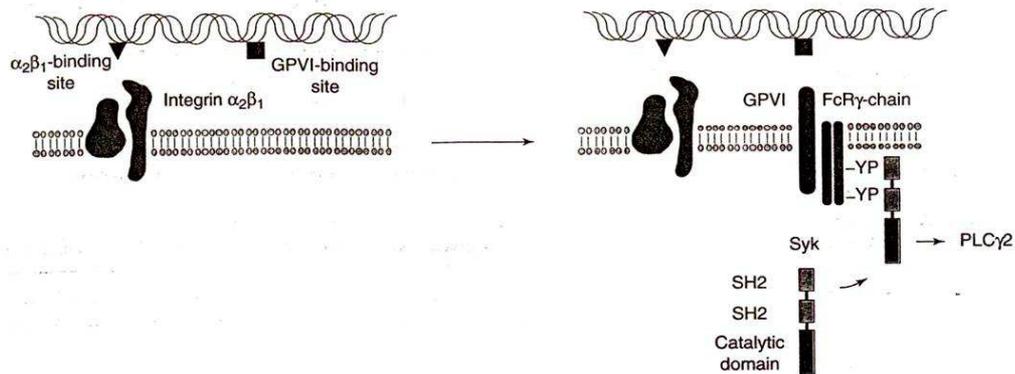


Abb. 3 Hypothese der Rolle von Glykoprotein Ia-IIa (Integrin $\alpha_2\beta_1$) und Glykoprotein VI in der Aktivierung von Thrombozyten (Watson und Gibbins, 1998)

Suzuki et al. (2003) zeigten, dass sowohl die Konzentration von GPVI auf der Oberfläche von Thrombozyten als auch die intrazelluläre Expression des GPVI bei Aktivierung der jeweiligen Thrombozyten deutlich zunimmt. Sie schlossen daraus, dass die Thrombozyten einen „internen pool“ für GPVI haben, aus dem das GPVI bei Aktivierung auf die Thrombozytenoberfläche und auf α -Granula verteilt werden. „Collagen-related-peptides“ (C-R-P) und das Schlangentoxin Convulxin (CVX) sind selektive Agonisten des GPVI-Rezeptors (Miura et al., 2002). Die C-R-P beinhalten ähnlich den Kollagenen eine Gly-Pro-Hyp-Sequenz, während CVX synergistisch mit ADP für die Regulation der Thrombozytenaggregation verantwortlich ist. Zudem spielen Ca^{2+} und die Proteinkinase C eine große Rolle in diesem Aggregationsprozess (Atkinson et al., 2001). Lediglich die Bindungsstellen sind dabei unterschiedlich. Weisen die C-R-P die gleiche Bindungsstelle an Thrombozyten wie Kollagen auf, bindet CVX an einen anderen Rezeptor. Weiterhin besitzt CVX mehrere Bindungsstellen für das GPVI und ist somit in der Lage, mehrere GPVI-Moleküle dieses Glykoproteins gleichzeitig zu binden (Miura et al., 2002). Allerdings bindet GPVI nicht nur an Kollagen, sondern auch an den vWF, der für die frühe Thrombozytenadhäsion verantwortlich ist (Goto et al., 2002).

1.3.3 Pathophysiologie und -biochemie

Bei Patienten mit leichter Blutungstendenz konnte eine verminderte Kollagen-induzierte Adhäsion der Thrombozyten festgestellt werden, welche durch eine eingeschränkte GPVI-Funktion begründet war (Joutsu-Korhonen et al., 2003).

Zudem wurde bei einigen dieser Patienten ein spezifischer Antikörper (anti-p62 IgG) gegen den Kollagenrezeptor gefunden, der durch Bindung an die Fab-Fragmente des Antikörpers inaktiviert wurde (Ichinohe et al., 1995; Kehrel et al., 1998). Dieser Antikörper hatte eine leichte Blutungstendenz zur Folge. Es kam zwar zur GPIa-IIa-vermittelten Adhäsion der Thrombozyten an das Kollagen, aber sowohl Aggregation als auch Aktivierung waren vermindert (Kehrel et al., 1998). Antikörper, die nicht gegen die Kollagen-Bindungsstelle oder gegen den Fcγ-Rezeptor, sondern gegen eine beliebige Stelle des GPVI gerichtet waren (JAQ2, JAQ3), führten zu einer Reduktion der GPVI-Dichte auf der Thrombozytenoberfläche und damit zu einem antithrombotischen Effekt (Schulte et al., 2003). Ohne einen funktionstüchtigen Fcγ-Rezeptor konnte GPVI auf der Thrombozytenoberfläche nicht exprimiert werden und somit nicht in Kontakt mit Kollagen treten. Daraus resultierte eine verminderte Thrombozytenaggregation (Best et al., 2003). Auch Nieswandt et al. (2000) wiesen anhand eines Antikörpers (JAQ1) nach, dass die Expression und Funktion des GPVI von seiner Assoziation mit der Fcγ-Kette abhängig ist.

Im Jahre 1987 zeigten Moroi et al. (1989) einen Zusammenhang zwischen der Autoimmunthrombozytopenie (ITP) und einem plättchenspezifischen Antikörper gegen ein ungefähr 62 kDa großes Membranprotein, das später als GPVI identifiziert wurde. In anderen Studien zeigten Massberg et al. (2003), dass bei Fehlen oder Blockierung des GPVI die Anlagerung der Thrombozyten an die verletzte Gefäßwand, und damit an das freigelegte Kollagen, um ca. 89% reduziert wurde. Damit scheint GPVI ein essentieller Bestandteil bei der Bildung von arteriellen Thromben zu sein. Kato et al. (2003) konnten diese Befunde bestätigen. Bei Fehlen des GPVI konnten die Autoren allerdings keine erhöhte Blutungstendenz feststellen. Vielmehr zeigten die Thrombozyten eine normale Adhäsionsfähigkeit, aber eine verminderte Aktivierungsfähigkeit, die eine instabilere Thrombusbildung zur Folge hatte.

In einer Folgestudie von Massberg und Mitarbeitern (2004) wurde die Möglichkeit einer antithrombotischen Therapie mittels gereinigter GPVI diskutiert. So hemmte lösliches GPVI kompetitiv die Bindung der Thrombozyten am freigelegten Kollagen, wodurch die Anlagerung von Thrombozyten und somit die Bildung arterieller Thromben verhindert werden konnte. Da nicht gebundenes GPVI nur

eine kurze Halbwertszeit aufwies, war die Gefahr einer generalisierten Störung der Thrombozytenfunktion und eine damit verbundene Blutungstendenz minimiert.

Ein von Lecut et al. (2003) untersuchter spezifischer Antikörper (Klon 9012.2) gegen GPVI hemmte sowohl unter statischen als auch unter arteriellen Flussbedingungen die Thrombusformierung. Die Fab-Fragmente des Antikörpers schützten dabei spezifisch vor der Kollagen-induzierten Thrombozytenadhäsion, -aggregation und -aktivierung.

Aber nicht nur Antikörper gegen GPVI spielen eine Rolle in der Funktion der Thrombozyten. Auch die unterschiedliche Dichte des GPVI auf deren Oberfläche kann zur verstärkten Thrombusbildung bzw. Blutungsneigung führen (Best et al., 2003).

1.3.4 Genpolymorphismen

In den letzten Jahren wurde eine Reihe von thrombozytären Polymorphismen als potentielle genetische Risikofaktoren für die koronare Herzkrankheit (KHK) und dem Schlaganfall untersucht (Santoso und Kunicki, 2001). Warum Genpolymorphismen zu einem erhöhten Risiko für die KHK führen können, wird im Folgenden einzeln kurz erläutert.

Bei der Analyse des GPVI Gens fanden Croft et al. (2001) insgesamt neun „Single Nucleotid Polymorphisms“ (SNP) in der kodierenden Sequenz und einen SNP in der Promotorregion (C-154T). In der kodierenden Region konnten sie vier stumme Mutationen (C10781A, G10804A, G10873A und G22916C) identifizieren. Darüber hinaus fanden sie einen SNP an der Position T13254C, der zu einem Ser219Pro Aminosäuredimorphismus führte. Bei homozygoten Pro219 Trägern (ca. 22 %) fanden Best et al. (2003) eine um mehr als 90 Prozent verminderte GPVI-Expressionsdichte auf Thrombozyten als im Vergleichskollektiv (homozygot Ser219 bzw. Ser219Pro). Auch Joutsu-Korhonen et al. (2003) zeigten eine verminderte GPVI-Dichte auf der Thrombozytenoberfläche bei homozygoten Pro219 Trägern auf. Außerdem wurden weitere SNPs, A19871G, A21908G, A22630T und C22644A, die zu den Punktmutationen Lys237Glu, Thr249Ala, Gln317Leu und His322Asp im zytoplasmatischen Anteil führten, entdeckt (Croft et al., 2001). Die Wirkung der einzelnen Polymorphismen auf das Blutungsverhalten ist dabei bisher nicht bekannt.

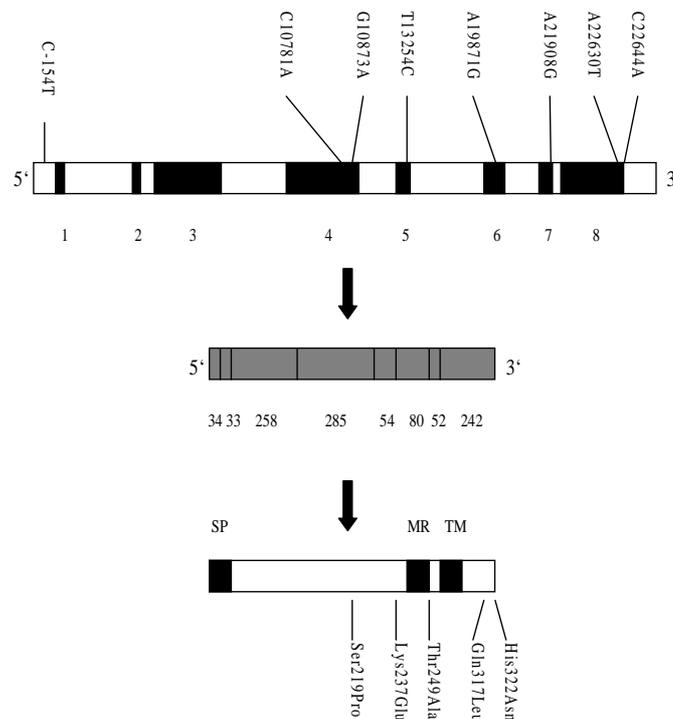


Abb. 4 Glykoprotein VI-Genpolymorphismen (Croft et al., 2001)

SP: Signalpeptid, MR: Mucin-ähnliche Domäne, TM: transmembrane Domäne.

In der Populationsstudie (n=999) von Croft et al. (2001) wurde ein Zusammenhang zwischen dem Ser219Pro-Dimorphismus und dem Myokardinfarkt beobachtet. Das Risiko für einen Herzinfarkt war für alle Frauen und für männliche und weibliche Nichtraucher, die homozygot für die Isoform Pro219 waren, zwei- bis viermal gegenüber einer Kontrollgruppe erhöht. Allerdings waren die Unterschiede nur bei der Altersgruppe über 75 Jahre signifikant. Dies lässt sich wahrscheinlich am ehesten mit der stärkeren Atherosklerose der Gefäße in diesem Alter und einer dadurch erhöhten Aktivierung der Thrombozyten an den stark geschädigten Gefäßwänden erklären. Diese Ergebnisse lassen insgesamt einen Zusammenhang zwischen der Genvarianz des GPVI und einer erhöhten Wahrscheinlichkeit eines Myokardinfarkts vermuten und weisen daraufhin, dass weitere Risikofaktoren und genetische Variabilitäten anderer Rezeptoren diesen Effekt noch verstärken können.

Die beschriebene Punktmutation Gln317Leu liegt direkt hinter einer Prolin-reichen Sequenz von Position 307 bis 316, welche für die Bindung der Src-Tyrosinkinase an die Fcγ-Kette verantwortlich ist (Cole et al., 2003). Mutationen in dieser Region könnten deshalb eine Veränderung des Aktivierungsverhaltens der Thrombozyten

zur Folge haben. Allerdings konnten sie kein signifikant erhöhtes Risiko für einen cerebrovaskulären Insult (CVI) in Zusammenhang mit diesem Polymorphismus beobachten. Watkins et al. (2002) analysierten die DNA von 94 Personen und fanden 14 SNPs, acht stumme und sechs missense-Mutationen. Fünf der sechs missense-Mutationen waren bereits durch Croft et al. (2001) beschrieben. Der neu gefundene Dimorphismus C307G liegt in der ersten immunglobulinähnlichen Domäne und führt zu einem Austausch von Leucin gegen Valin an der Position 83 (Leu83Val).

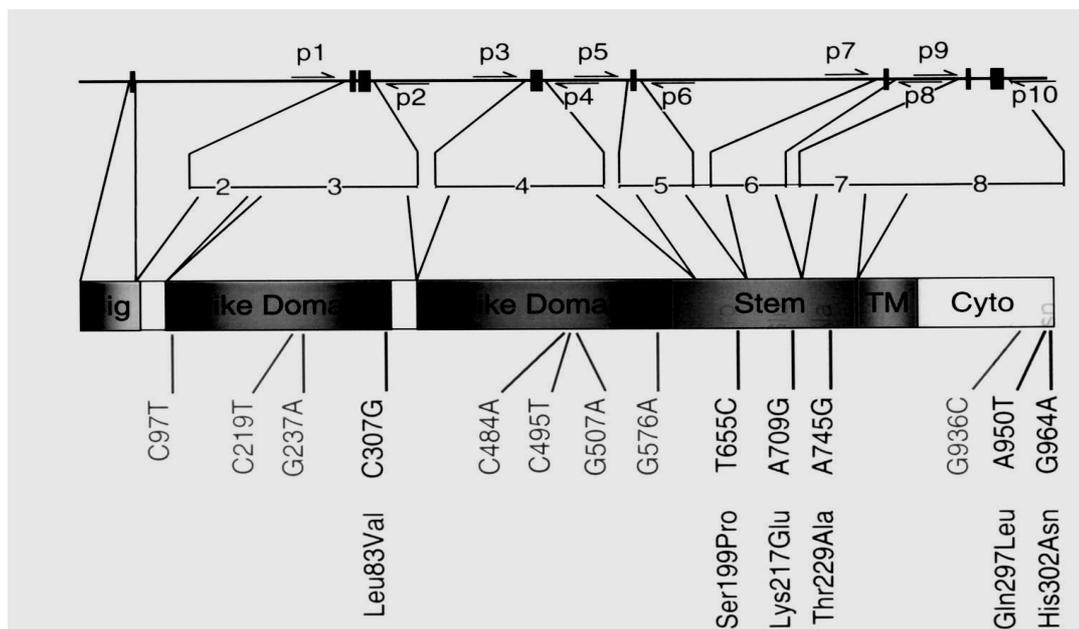


Abb. 5 Punktmutationen im Glykoprotein VI (Watkins et al., 2002)

Bei gesunden Personen konnte eine Variabilität der GPVI-Expression auf den Thrombozyten vom 1,5fachen (Best et al., 2003) bis auf das fünffache (Furihata et al., 2001) in der Normalbevölkerung beobachtet werden. Um diese Unterschiede zu erklären, untersuchten Furihata und Kunicki (2002) die Promotorregion des Gens. Es gelang ihnen, das Fehlen der TATA-Box nachzuweisen, die normalerweise -10 Basen in der 5'-Richtung vom Start der Transkription entfernt ist. Der Promotor des GPVI liegt zwischen der Position -191 und -39 und besitzt GATA-1- und Ets-1-Bindungsstellen (Furihata und Kunicki, 2002). Es handelt sich bei beiden – ähnlich der TATA-Box – um eine bestimmte Basenabfolge im Promotor, die zur Aktivierung der Transkription führt (Holmes et al., 2002). Transkriptionsfaktoren erkennen und binden an diese Sequenzen, und können

damit die Genexpression verändern (Gumina et al., 1996). Die genaue Lage dieser Sequenzen konnte identifiziert werden: GATA-1 liegt dabei zu Beginn der Promotorregion um Position -179, Ets-1 am Ende um Position -45 (Furihata und Kunicki, 2002). Während bei Furihata und Kunicki (2002) Mutationen des GATA-1 die Promotoraktivität um 30% und Mutation des Ets-1 um 40% verminderten, kam es bei Holmes et al. (2002) sogar zu einer Reduktion von 94% bzw. 80%. Beide Bindungsstellen addieren sich in ihrer Funktion und vermindern die Promotoraktivität. Damit haben sie bei Mutation oder Fehlen der jeweiligen Sequenz Einfluss auf die Transkriptionsrate von GPVI.

Der in dieser Arbeit untersuchte Dimorphismus C-154T wurde erstmals von Croft et al. (2001) beschrieben. Es ist eine stumme Mutation, so dass es zu keinem Aminosäureaustausch kommt. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass dieser in der Promotorregion liegende Polymorphismus mit einer unterschiedlichen Expressionsrate des GPVI auf der Thrombozytenoberfläche assoziiert sein kann (Croft et al., 2001). Eine verstärkte Expression könnte mit thrombotischen Ereignissen wie dem Myokardinfarkt in Verbindung stehen (Bigalke et al., 2006). Best et al. (2003) untersuchten den C-154T-Dimorphismus, konnten aber keinen Einfluss auf die Transkriptionsrate und damit die Expression nachweisen.

1.4 Koronare Herzkrankheit und Myokardinfarkt

Bei der koronaren Herzkrankheit (KHK) handelt es sich um eine Erkrankung, bei der aufgrund arteriosklerotischer Veränderungen der Herzkranzgefäße ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und -verbrauch des Herzmuskels (Myokard) besteht (Terres et al., 1999). Klinisch manifestiert sie sich als Angina pectoris oder als akuter Myokardinfarkt (Libby, 2001). Die KHK ist die häufigste Todesursache in den westlichen Ländern und nimmt etwa 30% der Gesamtmortalität ein (Gawaz, 1999).

Eine erhöhte basale Aktivierung und Hyperaggregabilität zirkulierender Thrombozyten ist unter anderem mit anderen kardiovaskulären Risikofaktoren assoziiert. Diese lassen sich unterteilen zum einen in nicht beeinflussbare Risikofaktoren wie familiäre Disposition, männliches Geschlecht und hohes Alter und zum anderen in beeinflussbare Risikofaktoren (Terres et al., 1999). Zu den beeinflussbaren Risikofaktoren zählt man den Nikotinabusus, die Adipositas, die

körperliche Inaktivität, die Hyperlipoproteinämie, die arterielle Hypertonie, der Diabetes mellitus bzw. die Insulinresistenz mit Hyperinsulinämie, Lipoprotein (a)-Erhöhung (Lp(a)) und Hyperfibrinogenämie (Libby, 2001). Weitere noch nicht endgültig gesicherte Risikofaktoren sind arterielle Infektionen (*Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, Cytomegalievirus), Hyperhomocysteinämie und so genannter „negativer Stress“ (Homma, 2004; Hausmann et al., 1999). Das Infarktisiko erhöht sich dabei bei Vorliegen von nicht therapierbaren Risikofaktoren. Immer mehr Aufmerksamkeit wird dabei der genetischen Komponente der KHK geschenkt. Durch den Fortschritt in der Molekularbiologie konnten bis heute zunehmend SNPs identifiziert werden, die den Blutdruck, Arrhythmien, den Lipidstoffwechsel und die Hämostase beeinflussen (zur Übersicht Nabel, 2003).

Die atherogene Wirkung des Nikotins ist nicht sicher geklärt. Es deutet darauf hin, dass das Nikotin den Lipidstoffwechsel beeinflusst (LDL-Erhöhung, HDL-Verminderung), es zu Vasospasmen führen und die Gerinnung über eine Erhöhung des Fibrinogenspiegels und gesteigerte Thrombozytenaktivität aktivieren kann (Terres et al., 1999; Hausmann et al., 1999). Die Adipositas ist zumeist mit dem „metabolischen Syndrom“, d.h. mit Dyslipidämie, arterieller Hypertonie, Diabetes mellitus und körperlicher Inaktivität vergesellschaftet. Damit gilt besonders die abdominale Adipositas (Taillenumfang > 102 cm bei Männern und > 88cm bei Frauen) als Risikofaktor (Carr und Brunzell, 2004). Ein BMI >29 kg/m² war beispielsweise mit einer 4,6fach erhöhten Mortalität an der KHK verbunden (Schunkert, 2002). Die arterielle Hypertonie führt zu einer linksventrikulären Hypertrophie, die im weiteren Verlauf eine diastolische und später auch eine systolische Dysfunktion nach sich zieht. Es kommt ähnlich wie bei den anderen Risikofaktoren zu einer endothelialen Dysfunktion (Meredith und Östergren, 2006). Das atherogene Risiko des Diabetes mellitus liegt zum einen im Auftreten von Co-Morbiditäten wie arterielle Hypertonie und Dyslipidämie. Zum anderen kann er zu endothelialer Dysfunktion und Gefäßwandveränderungen führen (Marwick, 2005). Die Dyslipidämie ist ein weiterer Risikofaktor der KHK. Die Triglyzeride sollten einen Wert von 150 mg/dl nicht überschreiten (Chiba et al., 2007). Der präventivmedizinische Wert des Gesamtcholesterins liegt unter 200 mg/dl. Liegt der Wert oberhalb von 200 mg/dl, so steigt die Infarkt-morbidität stark an. Bei 250 mg/dl hat sich die Morbidität verdoppelt, bei 300mg/dl sogar

vervierfacht (Scheuner, 2001; Walter und Zeiher, 2000). Aber nicht nur ein hohes Gesamtcholesterin wirkt atherogen, sondern auch eine bestimmte Konstellation vom „Low density lipoprotein“ (LDL) und „high density lipoprotein“ (HDL). Während ein erhöhter LDL-Spiegel (>150 mg/dl) atherogen wirkt, schützt HDL (>35 mg/dl) gegen die Entwicklung der KHK (Mertens und Holvoet, 2001; Homma, 2004). Eine Hypercholesterinämie ist zumeist sekundärer Genese (alimentär, bei Diabetes mellitus, Nephropathien etc.) und nur selten genetisch bedingt (familiäre Hypercholesterinämie). Das Lipoprotein(a) (Lp(a)) gilt in Konzentrationen > 25 mg/dl als selbständiger Arterioskleroserisikofaktor. Dieses Risiko wird durch erhöhte LDL-Spiegel gesteigert (Berglund und Ramakrishnan, 2004; Homma, 2004). So beschreibt Scheuner (2001) ein fünffach erhöhtes Atheroskleroserisiko bei gleichzeitig erhöhtem Lp(a) und LDL. Das Lp(a) enthält ein Apoprotein(a), das mit Plasminogen um die Bindungsstelle am Fibrin konkurriert und damit durch seine antiplasminogene Wirkung die Fibrinolyse behindern kann (Libby, 2001). Dadurch kommt es lokal zur Hemmung der Thrombolyse im Endothelbereich der Gefäße und zur Begünstigung der Plaquebildung. Die Apolipoproteine sind Proteine, die die Blutfette binden. Die gemeinsame Bestimmung der Apolipoproteine mit dem HDL- und LDL-Cholesterin verbessert die Aussagekraft bezüglich des Atheroskleroserisikos (Homma, 2004). Apolipoprotein AI ist die Hauptkomponente des HDL (Mertens und Holvoet, 2001), Apolipoprotein B dagegen die des LDL. Es ist für die Interaktion mit den LDL-Rezeptoren und für den Transport des Cholesterins in die Endothelzellen der Gefäße verantwortlich (Carr und Brunzell, 2004). Ein vermindertes Apolipoprotein AI (ApoAI, $<1,0$ g/l), ein erhöhtes Apolipoprotein B (ApoB, $>1,2$ g/l) sowie die Erhöhung des Quotienten ApoB/ApoAI gelten beispielsweise als atherogen. Auch Fibrinogen wird heute zu den Atherosklerosefaktoren gezählt (Voetsch und Loscalzo, 2004). Der Referenzbereich liegt bei 150-450 mg/dl. Fibrinogen gehört dabei zur Gruppe der Akuten-Phase-Proteine und steigt bei entzündlichen Reaktionen innerhalb von 24-48 Stunden an. Es wird zumeist bei Verdacht auf Blutgerinnungsstörungen, zur Überwachung fibrinolytischer Therapien und zur Verlaufskontrolle bei Verbrauchskoagulopathien und Lebererkrankungen bestimmt (Füeßl, 1999).

1.4.1 Pathophysiologie

Die ersten sichtbaren pathologischen Veränderungen in der Entstehung der Atherosklerose sind die intimalen Lipideinlagerungen („fatty streak“; Gawaz, 1999). Diese Lipideinlagerungen bestehen aus Monozyten, die sich durch die Aufnahme von oxidierten LDL-Partikeln (ox-LDL) zu Makrophagen differenzieren und sich damit in die so genannte Schaumzellen umwandeln (Tedgui und Mallat, 2006). Durch die Adhäsion von Thrombozyten an die Schaumzellen können die Endothelzellen aktiviert werden (Gawaz, 1999). Es kommt zu einer verstärkten Expression von chemotaktischen Substanzen wie „monocyte chemotactic protein“ (MCP-1), Interleukinen 1 und 8 (IL-1, IL-8) und Adhäsionsmolekülen wie „intercellular adhesion molecule“ (ICAM-1) „vascular adhesion molecule“ (VCAM-1), und P-Selektin im Endothel (Tedgui und Mallat, 2006). Diese führen weiterhin zu einer erhöhten Monozyten- und T-Lymphozyteninfiltration in das Endothel, wodurch die Plaqueentstehung begünstigt wird (Libby, 2001; Tedgui und Mallat, 2006). Durch die ausgeschütteten Mediatoren kommt es zur Proliferation glatter Muskelzellen und deren Migration an die Plaqueoberfläche. Zusammen mit extrazellulärer Matrix bilden sie die fibröse Oberfläche der Plaques (Libby, 2001). Dabei unterscheidet man zwischen einer stabilen Plaque, die von einer dicken fibrösen Schicht überzogen ist, und einer instabilen Plaque, die aus einem lipidreichen Kern mit dünner fibröser Schicht besteht (Tedgui und Mallat, 2006). Die Aktivierung der Thrombozyten durch die Endothelzellschädigung führt zudem zur Freisetzung vasokonstriktorischer und proaggregatorisch wirkender Substanzen wie Thromboxan A₂, ADP und Serotonin.

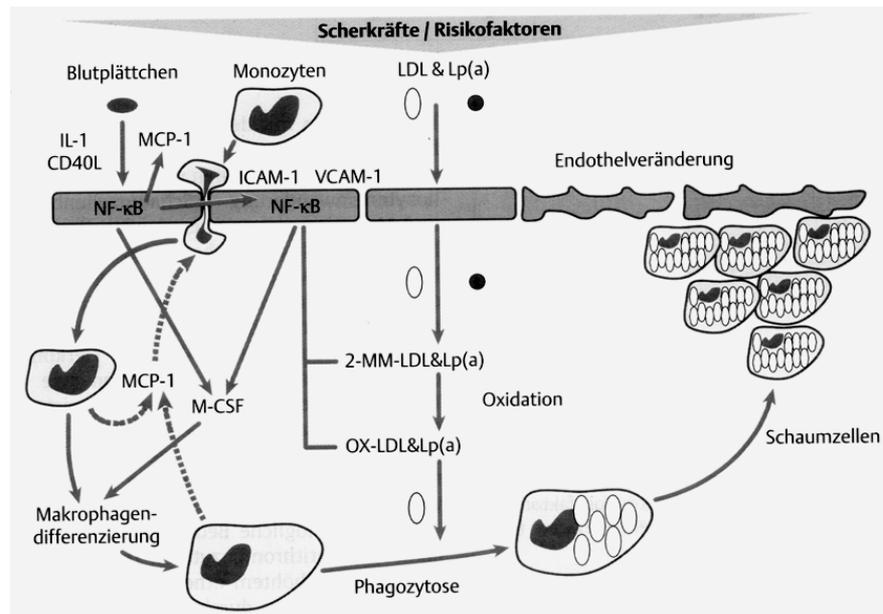


Abb. 6 Bedeutung der Thrombozyten für die Atherogenese

Die Thrombozyten aktivieren im Endothel die Sekretion eines chemotaktisch wirksamen Stoffes („monocyte chemoattractant protein-1“, MCP-1) und die Expression von Oberflächenproteinen wie Rezeptoren zur Monozytenadhäsion („intercellular adhesion molecule“ (ICAM-1) und dem „vascular adhesion molecule“ (VCAM-1). Diese Vorgänge erfolgen durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors „Nuklear-Faktor-κB“ (NF-κB). Nach Aufnahme von oxidierten Cholesterin-Partikeln (OX-LDL) entstehen so genannte Schaumzellen, die die atherogenetischen Prozesse an den veränderten Gefäßwandzellen begünstigen. (nach Gawaz, 1999).

Weitere Abkürzungen: IL-1: Interleukin 1, M-CSF: monocyte stem cell factor. LDL: low density lipoprotein, Lp(a): Lipoprotein (a).

1.4.2 Myokardinfarkt

Zu einem Myokardinfarkt kommt es zumeist durch eine akute Plaqueruptur mit nachfolgender Thrombozytenaggregation und Thrombusbildung (Libby und Theroux, 2005). Es folgt eine akute Minderversorgung des Myokards mit sauerstoffreichem Blut und letztendlich eine Nekrose des Gewebes. Rupturiert eine Plaque, kommt es zum einen durch das Freilegen thrombogenen Materials zur Thrombozytenadhäsion und -aktivierung. Zusätzlich wird über den so genannten „tissue factor“ (TF) die Gerinnungskaskade aktiviert (Libby und Theroux, 2005). Schließlich kommt es zu einer Interaktion von TF mit dem Adhäsionsmolekül P-Selektin auf aktivierten Thrombozyten und Endothelzellen und führt damit zu einer beschleunigten Fibrinbildung (Shebuski und Kilgore, 2002). Es entstehen „tissue-factor“-VIIa-Komplexe, die über Aktivierung der Gerinnungsfaktoren X und IX Thrombin bilden. Thrombin wiederum aktiviert zusätzliche Thrombozyten und fördert ihre Aggregation an die schon adhärenen Thrombozyten (Gawaz, 1999). Des Weiteren wird die Anlagerung der

Gerinnungsfaktoren V und VIII an die Thrombozytenoberfläche mit anschließender Bildung von Fibrin gefördert (Abb. 7).

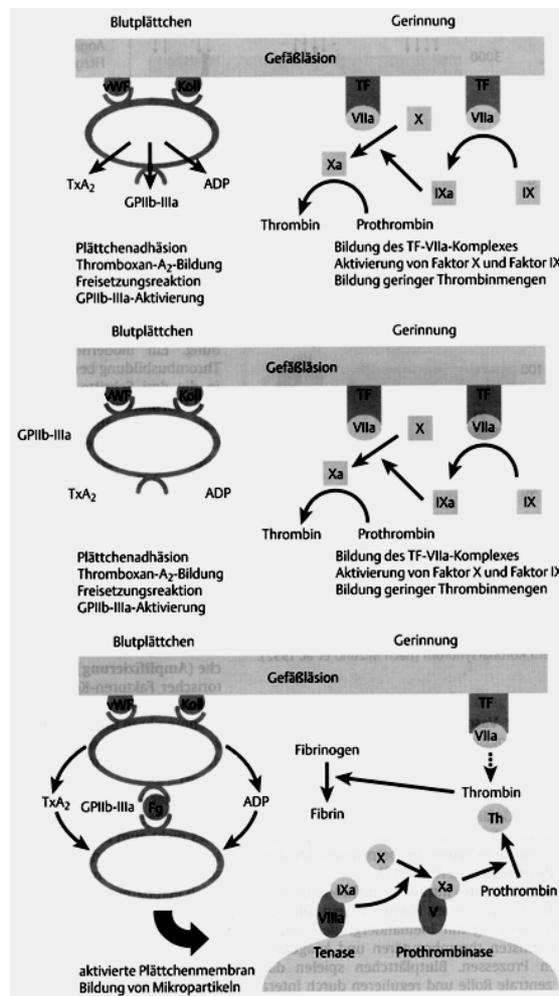


Abb. 7 Mechanismen der Thrombose bei Myokardinfarkt (nach Gawaz, 1999)

Initial lagern sich die Thrombozyten an den von Willebrand-Faktor (vWF) und das Kollagen an, bilden Thromboxan (TxA_2) und ADP und aktivieren das Glykoprotein (GP) IIb-IIIa. Im weiteren Verlauf kommt es zur Thrombozytenaggregation. Neben der Thrombozytenaktivierung wird ein „tissue-factor“-VIIa-Komplex gebildet, der zur Aktivierung der Gerinnungskaskade führt. Faktor X und Faktor IX werden aktiviert und bilden Thrombin aus Prothrombin. Thrombin fördert zum einen die Thrombozytenaggregation zum anderen führt es zur Anlagerung der Faktoren V und VIII an die Thrombozytenoberfläche. Das löst wiederum die Thrombinaktivierung aus, wodurch schließlich Fibrin gebildet wird.

Durch Aktivierung der Thrombozyten im Bereich der thrombotischen Plaques in embolisierten Gefäßabschnitten werden Serotonin und Thromboxan freigesetzt (Gawaz, 1999). Beide Metabolite haben einen Koronarspasmus mit nachfolgender Minderperfusion und Gewebeschämie des betroffenen Myokardabschnittes zur Folge.

1.5 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollte der Zusammenhang zwischen dem C-154T Dimorphismus in der Promotorregion des GPVI-Gens und ihrer Expressionsdichte auf der Thrombozytenoberfläche analysiert werden. Weiter sollte untersucht werden, ob dieser Dimorphismus einen genetischen Indikator für das Risiko der koronaren Herzerkrankung (KHK-Risiko), des Ausmaßes der koronaren Herzerkrankung (KHK-Schweregrad) und das Myokardinfarkttrisiko (MI-Risiko) darstellt. Dabei wurde die Verteilung der beiden Allele zwischen einer Patienten- und einer Kontrollgruppe verglichen.

2. Material und Methoden

2.1 Studienpopulation

Die Studienpopulation bestand aus einer Kontroll- und einer Patientengruppe. Es wurden insgesamt 1429 Probanden auf den GPVI C-154T Dimorphismus und das damit verbundene potentielle Risiko für eine koronare Herzkrankheit und deren Schweregrad untersucht. Die Kontrollgruppe machte dabei 530 Probanden, die Patientengruppe 899 Patienten aus.

2.1.1 Patientengruppe

Die Patientengruppe umfasste 899 männlichen Patienten der Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen und der Kerckhoffklinik Bad Nauheim. Alle Patienten wurden über die Studie informiert und gaben ihr Einverständnis zur Teilnahme. Bei allen diesen Patienten wurde aufgrund des Verdachtes auf eine koronare Herzkrankheit (KHK) eine Koronarangiographie nach Judkins durchgeführt.

2.1.2 Kontrollgruppe

Um die funktionelle und klinische Relevanz des GPVI C-154T-Polymorphismus bestimmen zu können, wurde zum Vergleich eine unabhängige Kontrollgruppe etabliert. Die Voraussetzung für die Aufnahme in die Kontrollgruppe war, dass bei den Probanden anamnestisch keinerlei Herz- oder Gefäßerkrankungen erhoben werden konnten und sie einen vergleichbaren ethnischen und demographischen Hintergrund aufwiesen. Die Anamnese wurde dabei nach gleichen Gesichtspunkten erhoben, wie es bei der Patientengruppe der Fall war. Mögliche Herzkreislaufkrankungen wurden mit Hilfe des Fragebogens nach Rose ausgeschlossen (Rose, 1962). Dieser Fragebogen besitzt eine hohe Spezifität und eine gute Sensitivität, die mit dem Belastungselektrokardiogramm vergleichbar ist. Es stellten sich männliche Probanden aus dem Großraum Gießen zur Verfügung. 530 Probanden erfüllten die Voraussetzungen und stimmten der Teilnahme an der Studie zu.

2.1.3 Datenerhebung bei Patienten und gesunden Probanden

Bei jedem Studienteilnehmer wurde zunächst eine detaillierte Anamnese bezüglich Gefäßerkrankungen, Angina pectoris, Myokardinfarkt, arterieller Hypertonie, Diabetes mellitus, Zigarettenkonsum (in „Pack Years“: ein „Pack Year“ entspricht 20 Zigaretten pro Tag über ein Jahr) und die aktuellen Medikamente erhoben. Diese Angaben wurden durch bereits vorhandene Befunde kontrolliert und vervollständigt (Arztberichte, Labor, EKG-, Echokardiographie-, Koronarangiographie-, Szintigraphiebefunde etc.). Des Weiteren wurde die Dauer der Beschwerden, die Anzahl, Lokalisation und der Zeitpunkt stattgefundenener Myokardinfarkte und die bisher durchgeführten therapeutischen Interventionen (perkutane transluminale koronare Angioplastie (PTCA), aortokoronarer Bypass (ACB)) protokolliert. Bei der körperlichen Untersuchung wurden neben der Messung des Blutdruckes auch der Body-Mass-Index (BMI = kg Körpergewicht pro m² Körpergröße) berechnet. Im Labor wurden das Blutbild, klinisch-chemische Parameter wie Glucose, Harnsäure, Kreatinin und C-reaktives-Protein (CRP) und das Gesamtcholesterin, Lipoprotein (a) (Lp(a)), Apolipoprotein AI (ApoAI) und B (ApoB), Triglyzeride und Fibrinogen bestimmt. Die Untersuchungen wurden nach den Messverfahren der klinischen Chemie durchgeführt. Gleichzeitig wurde Blut zur Isolierung der DNA entnommen.

2.1.4 Koronarangiographie und koronare Herzkrankheit

Die Koronarangiographie dient neben den nicht-invasiven Diagnose-Verfahren wie Ruhe- und Belastungs-Elektrokardiogramm (EKG), laborchemischen Analysen (Troponin I, CK und CK-MB) und der transthorakalen Echokardiographie (TTE) zur invasiven Diagnostik der KHK. Mit Hilfe der Koronarangiographie kann man nicht nur die Verdachtsdiagnose der KHK bestätigen, sondern auch noch das Ausmaß und die Lokalisation der Gefäßverengungen feststellen.

Die Koronarangiographie der 899 männlichen Patienten wurde in den Abteilungen für Kardiologie und Angiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen und der Kerckhoffklinik Bad Nauheim durchgeführt. Nach Aufklärung und Einwilligung der Patienten wurde nach Seldinger-Technik die Arteria femoralis dextra punktiert und eine Einführschleuse eingelegt. Unter Durchleuchtung und kontinuierlicher Überwachung der vitalen Parameter mittels EKG und Blutdruckmessung wurde der Koronarangiographiekatheter bis zu den beiden Koronararterien

vorgeschoben. Anschließend wurde über diesen Katheter ein Kontrastmittel nacheinander in die linke und rechte Koronararterie injiziert, wodurch Lokalisation und Ausmaß der Stenosen unter gleichzeitigen Röntgenfilmaufnahmen mit einer Gammakamera dargestellt werden konnten. Über eine weitere Kontrastmittelinjektion ließ sich auch die Pumpfunktion des linken Ventrikels beurteilen (enddiastolisches und endsystolisches Volumen, Myokardkontraktionen). Nach Beendigung der Koronarangiographie wurden Katheter und Einführschleuse entfernt und ein Kompressionsverband über dem Punktionsort angelegt. Die koronare Herzkrankheit war definiert als eine Stenose einer Koronararterie über 50 %. Dabei wurde zwischen Stenosen in der rechten Koronararterie, dem Ramus circumflexus und dem Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie unterschieden, so dass je nach Befall der genannten Äste zwischen einer Null-, Ein-, Zwei- und Dreigefäßerkrankung unterschieden werden konnte. Zur genaueren Einteilung der Erkrankung wurde der Gensini-Score herangezogen (Gensini, 1983), der eine Koronarangiographie voraussetzt. Dieser Score berücksichtigt nicht nur den Grad der Stenose aller 15 Koronaräste, sondern auch deren Lokalisation und somit auch die klinische Relevanz der Stenosen. Zur Berechnung des Scores wurde zunächst der Grad der Stenose beurteilt und mit Werten von 1 bis 32 (Severity-Score) versehen. Diese Werte wurden dann je nach Lokalisation der Stenose und somit nach der Bedeutung für die vitale Funktion des Herzens mit 0,5, 1, 1,5, 2,5 oder 5 multipliziert (Tab. 1, S. 25). Beispiel: für eine 75%ige Stenose des proximalen Segmentes der Arteria coronaria dextra (1.) ergibt sich ein Gensini-Score (GS) von $4 \times 1 = 4$, eine 75%ige Stenose des proximalen Segmentes des Ramus interventricularis anterior (6.) dagegen ein GS von $4 \times 2,5 = 10$.

Tab. 1 Berechnung des Gensini-Scores

Grad der Stenose	Severity-Score
25%	1
50%	2
75%	4
90%	8
99%	16
100%	32

Koronararteriensegmente	Faktor
Right coronary artery (RCA) = A. coronaria dextra	
1. proximales Segment	x 1
2. mittleres Segment	x 1
3. distales Segment	x 1
4. Right posterior descending (RPD) = R. interventricularis posterior	x 1
5. Left coronary artery (LCA) = A. coronaria sinistra	x 5
<i>Left anterior descending (LAD) = R. interventricularis anterior</i>	
6. proximales Segment	x 2,5
7. mittleres Segment	x 1,5
8. distales Segment	x 1
9. first diagonal (D1) = R. lateralis	x 1
10. second diagonal (D2) = R. lateralis	x 0,5
<i>Ramus circumflexus (RCX)</i>	x 1
11. proximales Segment	x 1
12. obtuse marginal (OM) = R. marginalis sinister	x 1
13. distales Segment	x 1
14. posterolateral (PL) = R. posterior ventriculi sinistri	x 0,5
15. posterior descending (PD) = R. interventricularis posterior	x 1

Faktor: Multiplikationsfaktor, A. = Arteria, R. = Ramus

2.1.5 Definitionen von Niedrig- und Hochrisikogruppen

Mittelwert und Mediane der koronaren Risikofaktoren der Studienpopulation (Alter, BMI, Nikotinabusus, Triglyzeride, ApoAI und B und Lp(a)) wurden als Parameter für die Unterteilungen in Niedrig- und Hochrisikountergruppen verwendet. Diabetes mellitus und arterielle Hypertonie wurden als binäre Variable („ja/nein“) definiert und nicht weiter unterteilt.

2.1.6 Probanden für die phänotypische Untersuchung

Zur Gewinnung der Thrombozyten für die phänotypische Untersuchung anhand der Durchflußzytometrie und des Immunoblots stellten sich neun Mitarbeiter des Institutes für Immunologie und Transfusionsmedizin zur Verfügung.

2.2 Probensammlungen und -aufbereitungen für die klinisch chemische Analytik, zur Gewinnung der Thrombozyten und zur Typisierung der Genpolymorphismen

2.2.1 Proben für die klinisch chemische Analytik

Jedem Probanden des Studienkollektivs wurden jeweils eine EDTA-, eine Serum- und eine Plasma-Blutprobe abgenommen. Die klinisch chemische Analytik erfolgte aus den Serum- und Plasma-Blutproben (siehe Kap. 2.3, S.28). Das EDTA-Blut diente zur Bestimmung des Blutbildes und zur Isolierung der DNA.

2.2.2 Antikörper und Antiseren für die Durchflußzytometrie

Die monoklonalen Antikörper Gi5 (anti-GPIIb-IIIa) und Gi18 (anti-PECAM-1) wurden im Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität Gießen hergestellt und charakterisiert (Santoso et al., 1993; Kroll et al., 1998); der monoklonale Antikörper gegen das P-Selektin (CD62p, BD Biosciences, Heidelberg) sowie die Kaninchen-Anti-Maus und Schwein-Anti-Kaninchen-Antikörper (DAKO AIS, Dänemark) wurden käuflich erworben. Das polyklonale Kaninchen-Anti-GPVI-Serum wurde uns freundlicherweise von Prof. K.J. Clemetson (Bern, Schweiz) zur Verfügung gestellt.

2.2.3 Isolierung von Thrombozyten für die Durchflußzytometrie

Zur Gewinnung von Thrombozyten wurden gesunden Mitarbeitern des Institutes für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität Gießen 20 bzw. 50 ml venöses Vollblut entnommen und durch ACD-A (NPBI-Biotrans, Dreieich) bzw. EDTA (Merck, Darmstadt) ungerinnbar gemacht.

Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 37°C wurde das Vollblut bei 125g 25 min zentrifugiert. Das thrombozytenreiche Plasma (PRP) wurde daraufhin sorgfältig bis auf ungefähr 1 ml abpipettiert und mit vorgewärmten Waschpuffer (Stock I: 2 M NaCl, 100 mM KCl; Stock II: 0.36 M Citrat, 199 mM MgCl₂, 100mM CaCl₂), ACD (Acid Citrate Dextrose: Nitril citras 22,0 g/l, Glucosum monohydr. 24,5 g/l, Acidum citricum anh. 7,3 g/l; NPBI, Reende, Niederlande), 0,35 µg/ml PGE₁ (Prostaglandin E₁; Serva, Heidelberg) und Apyrase (1000 U/l; Fa. Sigma, Deisenhofen) versetzt. Nach einem weiteren Inkubationsschritt und einer Zentrifugation für 10 Minuten bei 1200g wurde der Überstand verworfen und das Pellet in Waschpuffer und PGE₁ resuspendiert. Dieser Waschvorgang wurde noch zweimal wiederholt. Anschließend erfolgte die Fixierung der Thrombozyten mit 2%iger PFA (Paraformaldehyd; Merck, Darmstadt), die durch dreimaliges Waschen mit PBS-Puffer (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline; PAA Laboratories GmbH, Cölbe) anschließend entfernt wurde.

2.2.4 Herstellung von Thrombozytenlysat für den Immunoblot

50 ml EDTA antikoaguliertes Blut wurden 20 Minuten bei 125g zentrifugiert, das Plasma vorsichtig abgenommen und das PRP mit Puffer 1 (10mM Tris, 3 mM EDTA, 150 mM NaCl) im Verhältnis 1:2 verdünnt. Nach einer Zentrifugation bei 1500g wurde der Überstand abgekippt und das Pellet mit 2 ml vorgewärmtem Puffer 1 resuspendiert, auf 10 ml aufgefüllt und ein weiteres Mal abzentrifugiert. Insgesamt wurde dieser Waschschrift dreimal wiederholt. Zuletzt wurde das Pellet in 3 ml Puffer 1 gelöst und die Thrombozyten wurden am Counter gezählt.

Von den isolierten Thrombozyten wurden 4×10^6 mit Solubilisationspuffer (20 mM Tris, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 4 mM N-ethylmaleinimid, 1 mM Leupeptin, 1 mM PMSF) 30 Minuten auf Eis lysiert. Die Proben wurden jeweils alle 10 min resuspendiert. Anschließend wurde das Lysat 30 Minuten bei 4°C und 15000g abzentrifugiert.

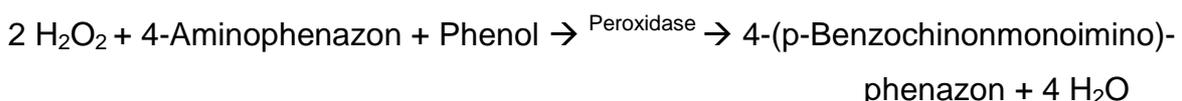
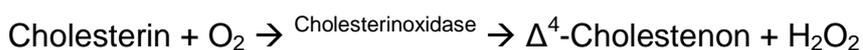
Der Überstand wurde abgenommen und deren Proteinkonzentration mit dem Solubilisierungspuffer des BCA Protein Assay Kit (Perbio, Bonn) auf 4 mg/ml eingestellt. Das Thrombozytenlysate wurde aliquotiert und bei -70°C eingefroren.

2.3 Klinisch chemische Parameter

Die folgenden klinisch chemischen Parameter wurden im Zentrallabor des Institutes für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Justus-Liebig-Universität Gießen bestimmt.

2.3.1 Gesamtcholesterin

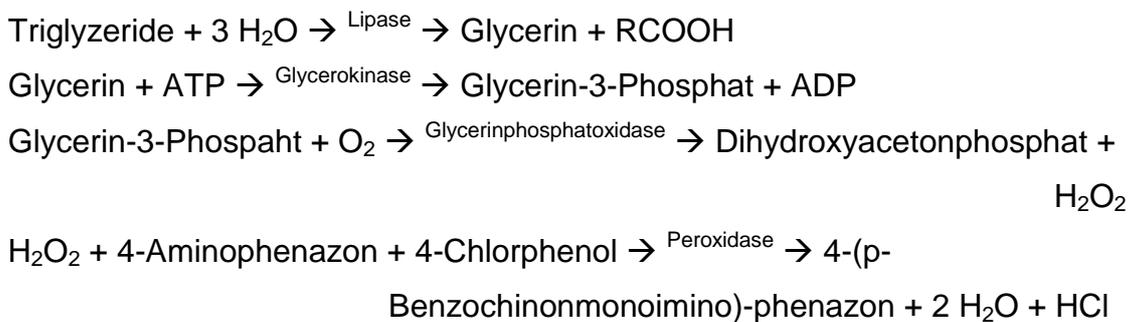
Die Gesamtcholesterinkonzentration wurde im Serum mit Hilfe des klinisch-chemischen Probenanalysators Hitachi 717 der (Boehringer, Mannheim) gemessen. 3 µl Serum wurden mit 250 µl Cholesterinreagenz (PIPES-Puffer: 75 mmol/l, pH 6,8; Mg²⁺: 10 mmol/l; Natriumcholat: 0,2 mmol/l; 4-Aminophenazon: 0,15 mmol/l; Phenol: 4,2 mmol/l; Fettalkoholpolyglycoether: 1 %; Cholesterinesterase: 0,5 U/ml; Cholesterin-Oxidase: 0,15 U/ml; Peroxidase: 0,25 U/ml) vermischt. Die in der Probe vorhandenen Cholesterinester wurden durch eine Cholesterinesterase hydrolysiert. Das daraufhin entstandene Cholesterin wurde durch eine spezifische Oxidase zu Δ⁴-Cholestenon umgewandelt. Das Wasserstoffperoxid ergab mit 4-Aminophenazon und Phenol unter der katalytischen Wirkung der Peroxidase einen Farbstoff, der photometrisch bei einer Wellenlänge von 700 nm und einer Temperatur von 37°C gemessen wurde und der Konzentration von Cholesterin direkt proportional war. Die folgende chemische Reaktionsgleichung verdeutlicht diesen Vorgang:



2.3.2 Triglyzeride

Zur Bestimmung der Triglyzeride wurde der Hitachi 717 (Boehringer, Mannheim) verwendet. Es wurde jeweils eine Probe von 3 µl mit 300 µl Reagenz (Tris-

Puffer: 150 mmol/l, pH 7,6; Magnesiumsulfat: 17,5 mmol/l; EDTA: Dinatriumsalz: 10 mmol/l; 4-Chlorphenol: 3,5 mmol/l; Natriumcholat: 0,15 %; Kaliumhexaferrat (II): 6 μ mol/l; Fettalkoholpolyglykoläther: 0,12 %; ATP: 0,5 mmol/l; 4-Aminophenazon: 0,35 mmol/l; Lipase: 3 U/ml; Glycerinphosphatoxidase: 2,5 U/ml; Glycerokinase: 0,2 U/ml; Peroxidase \geq 0,15 U/ml) versetzt. Bei der Spaltung der Triglyzeride durch Lipase und Esterase entstand Glycerin. Durch die Phosphorylierung des Glycerins mit ATP entstand mit Hilfe der Glycerokinase ADP und Glycerin-3-phosphat. Glycerin-3-phosphat wurde durch die Glycerinphosphatoxidase zu Dihydroxyacetonphosphat oxidiert. Das entstandene Wasserstoffperoxid oxidierte wiederum 4-Aminophenazon und 4-Chlorphenol. Es entstand 4-(p-Benzochinonmonoimino)-phenazon, das bei einer Temperatur von 37°C photometrisch bei 700 nm bestimmt wurde:



2.3.3 Lipoprotein (a)

Das Lipoprotein (a) wurde nach Agglutination mit spezifischen Polystyrol-Partikel-Antikörpern am Nephelometer (Behring, Marburg) bestimmt. Der Referenzbereich lag bei < 25 mg/l. Aus patentrechtlichen Gründen können weder die genauen Konzentrationen der Reaktionspartner noch der detaillierte Reaktionsablauf angegeben werden.

2.3.4 Apolipoproteine AI und B

In einer Reaktion zwischen den Apolipoproteinen und spezifischen Antikörpern entstanden Immunkomplexe. Diese Immunkomplexe führten im Nephelometer (Behring, Marburg) zur Streuung von eingestrahltm Licht. Die Intensität des Streulichts war von der Konzentration des jeweiligen Apolipoproteins abhängig und konnte durch den Vergleich mit einer Standardkonzentration quantitativ bestimmt werden. Aus patentrechtlichen Gründen können weder die genauen

Konzentrationen der Reaktionspartner noch der detaillierte Reaktionsablauf angegeben werden.

2.4 Genotypische Untersuchung

2.4.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR wurde mit der PCR Express Thermal Cycler (Hybaid GmbH, Heidelberg) durchgeführt. Als Grundlage wurde die publizierte DNA-Sequenz des GPVI auf Chromosom 19 verwendet (AC019238 und AC011476). Das GPVI-Gen wurde dabei von Nukleotid -276 bis 15 (291 bp) aus genomischer DNA mit Hilfe von einem Vorwärtsprimer (5'-TAT GGG AGC ACG GGA ACA CA-3') und einem Rückwärtsprimer (5'-CGG GGA TGG AGA CAT GGT TC-3') amplifiziert. Die PCR-Reaktion fand in einem Gesamtvolumen von 50 µl statt. Diese Lösung beinhaltete 2,5 µl genomische DNA, 5 µl PCR-Puffer, 0,5 µl AmpliTaq Gold DNA-Polymerase (Applied Biosystems, Warrington, Großbritannien), 8 µl 1,25 µM dNTP (Amersham Biosciences, Freiburg; Peqlab, Erlangen), je 5 µl 5 µM Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer (MWG-Biotech AG, Ebersberg) und Aqua dest. ad 50 µl. Die PCR-Ansätze wurden in 96 OmniPlates (Hybaid GmbH, Heidelberg) oder in STRIP-Ease-Tubes (Biozym, Hessisch Oldendorf) pipettiert.

Die PCR-Reaktion startete bei 95°C für 10 Minuten, daraufhin folgten je 1 Minute lang die Denaturierung bei 95°C, das Annealing bei 54°C und die Polymerisation bei 72°C über insgesamt 32 Zyklen. Der Nachlauf erfolgte bei 72°C über 7 Minuten. Zur Identifikation wurden manche PCR-Produkte anschließend sequenziert.

2.4.2 Polymerase-Ketten-Reaktion mit sequenzspezifischen Primern (PCR-SSP)

Um den GPVI C-154-T-Genotyp der gesunden Probanden und der Patienten bestimmen zu können, wurden zwei sequenzspezifische Vorwärtsprimer und ein gemeinsamer Rückwärtsprimer verwendet. Während die Vorwärtsprimer im Intron 1 liegen, ist der Rückwärtsprimer im Intron 2 positioniert. Amplifiziert wurde ein Genabschnitt, der das Exon 1 beinhaltete und aus 250 Basenpaaren bestand (-172 bis +84; Abb. 8, S. 31).

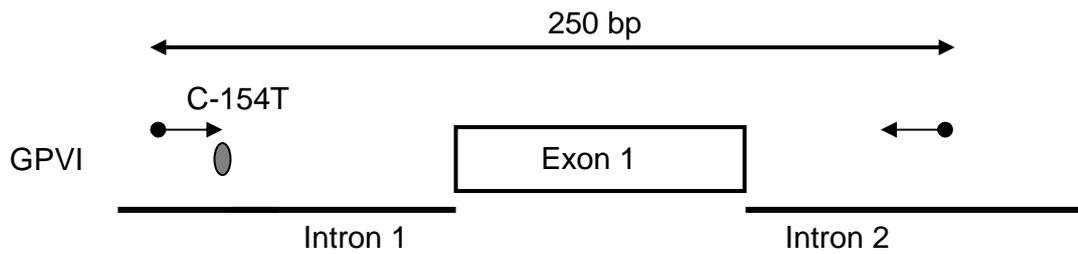


Abb. 8 Darstellung der sequenzspezifischen Amplifikation zur Genotypisierung an der Position -154

Die Genotypisierung des GPVI-Dimorphismus (C-154T) erfolgte in einem Gesamtvolumen von 50 μ l: 1 μ l genomische DNA, 5 μ l PCR-Puffer, 0,5 μ l AmpliTaq Gold DNA-Polymerase, 8 μ l 1,25 μ M dNTP, je 3 μ l des sequenzspezifischen 5 μ M Vorwärts- (5'-GTC ACT GTA CTG AGG AGC T-3' bzw. 5'- GTC ACT GTA CTG AGG AGC C-3') und Rückwärtsprimers (5'-cAGT CCA TGC CTG TCC TTC-3'), je 5 μ l 1,25 μ M Human Growth Hormone (HGH) I und II und Aqua dest. ad 50 μ l. Die Primer HGH I (5'-CAG TGC CTT CCC AAC CAT TCC CTT A-3') und HGH II (5'-ATC CAC TCA CGG ATT TCT GTT GTG TTT C-3') wurden als interne Kontrolle mitgeführt. Die PCR begann mit einem Vorlauf über 10 Minuten bei 95°C, anschließend erfolgte über je 1 Minute die Denaturierung bei 95°C, das Annealing bei 56°C und die Polymerisation bei 72°C für insgesamt 32 Zyklen. Der Nachlauf erfolgte über 7 Minuten bei 72°C, bevor die PCR-Produkte auf 4°C herunter gekühlt wurden.

2.4.3 Auftrennung von PCR-Produkten in der Agarosegel-Elektrophorese

Durch die Agarosegel-Elektrophorese wurden die PCR-Produkte aufgetrennt und sichtbar gemacht.

0,25g Agarose (Agarose Ultra Pure, Gibco, Karlsruhe) wurde in TBE-Puffer aus 45mM Tris (Roth, Karlsruhe), 45 mM Natriumborat (Merck, Darmstadt) und 1 mM EDTA, pH 8,0 (Merck, Darmstadt) unter Erhitzen gelöst. 25 ml Gellösung wurde mit 2,5 μ l Ethidiumbromid (10mg/ml; Gibco, Karlsruhe) versetzt und in einen Schlitten gegossen. 13 μ l PCR-Produkt wurden mit 2 μ l Probenpuffer aus 40% Saccharose, 0,05% Bromphenolblau-Lösung (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim) und Aqua dest vermischt und nach Abkühlen in die Geltaschen pipettiert. 1 μ l des Längenstandards (HAE III, Roche, Mannheim) wurde ebenfalls mit 2 μ l

Die Abb. 9 (S. 32) zeigt exemplarisch eine sequenzspezifische PCR des GPVI C-154T Genpolymorphismus. Die ersten beiden Spuren weisen dabei die Negativkontrolle mit Aqua dest. auf. Die nächsten beiden Spuren zeigen ein CC-homozygotes Individuum, bei dem in der T-spezifischen PCR nur die Kontrollbande mit HGH sichtbar ist. In den Spuren des zweiten Probanden erkennt man die Amplifikation der T-spezifischen Bande. In der C-spezifischen PCR erscheint nur die HGH-Kontrollbande. Dieser Proband war damit TT-homozygot. In den letzten beiden Spuren erkennt man ein CT-heterozygoten Allel, da sowohl die C- als auch die T-spezifische Bande erkennbar ist.

2.4.4 Sequenzierung

Um die korrekte Sequenz der Genprodukte zu überprüfen, wurde zusätzlich noch bei sieben ausgewählten Individuen eine DNA-Sequenzierung durchgeführt. Das GPVI-Gen wurde dabei von Nukleotid -276 bis 15 (291 bp) aus genomischer DNA amplifiziert und anschließend sequenziert.

Die Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte mit dem Sequenzierungs-Kit „Big Dye Terminator v3.0 Cycle“ (Applied Biosystems, Warrington, Großbritannien). Die Sequenzierungsreaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 20 µl bestehend aus 4 µl Terminator Ready Reaction, 1,4 µl (ca. 20 ng) PCR-Produkt, 2 µl 5 µM PCR-Primer (vgl. 2.4.2, S. 30) und Aqua dest. in 25 Zyklen durchgeführt. Die Denaturierung erfolgte bei 96°C über 10 Sekunden, das Annealing bei 50°C über 5 Sekunden und schließlich die Polymerisation bei 60°C über 4 Minuten.

Zur Präzipitation des sequenzierten Produktes wurde die Probe mit 2 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,6) und 55 µl absolutem Ethylalkohol versetzt und 16 min bei 15000g und 4°C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde der Vorgang nochmals durch Zugabe von 250 µl 70%iger Ethanol wiederholt und erneut zentrifugiert (5 Minuten, 15000g, 4°C). Anschließend wurde der Überstand abpipettiert und das Pellet in der Vakuumzentrifuge für 10 Minuten getrocknet. Nach der Zugabe von 25 µl TSR (Template Suppression Reagent) wurde der Ansatz 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur stehen gelassen und schließlich 2 Minuten bei 90°C denaturiert, auf 0°C abgekühlt und analysiert (ABI PRISM 310 Genetic Analyser; Perkin Elmer, Foster City, USA).

Es zeigte sich dabei eine Übereinstimmung mit den Ergebnissen der PCR-SSP. Die Abb. 10 (S.34) zeigt das Ergebnis der Sequenzierung von drei verschiedenen

Individuen. An der Position -154 erkennt man im obersten Bild ein C-Allel, im zweiten Bild ein T-homozygotes Individuum und im dritten Bild kommen sowohl ein C als auch ein T-Allel zur Darstellung, so dass hier ein CT-heterozygotes Individuum vorliegt.

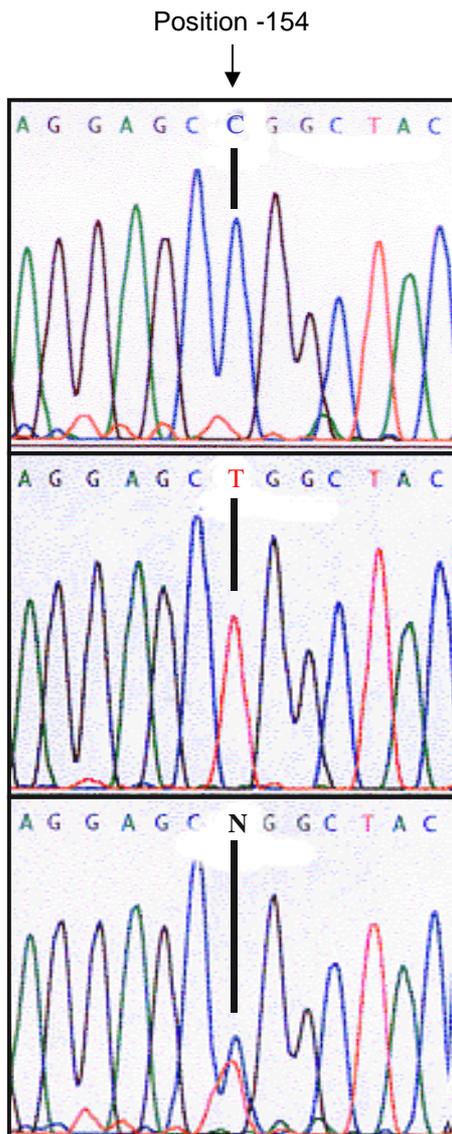


Abb. 10 Ergebnis der Sequenzierung an Position C-154T

Dargestellt sind die Basen von Position -160 bis -148 mit den gefundenen Genotypvarianten:

CC – homozygot

TT – homozygot und

CT – heterozygot (da dort beide Allele vorliegen, konnte bei der Sequenzierung keine eindeutige Base festgelegt werden, "N")

2.5 Phänotypische Untersuchungen

2.5.1 Durchflußzytometrie

In vier verschiedenen Eppendorfgefäßen wurden je 50×10^6 Thrombozyten mit 2%igen Rinderalbumin-PBS-Lösung gemischt. Je ein Gefäß wurde mit 10 µl Kaninchen-Anti-GPVI-Serum oder den monoklonalen Antikörpern Gi5- (anti-GPIIb-IIIa), Gi18 (anti-PECAM-1) und CD62p (anti-P-Selektin) versetzt und zur Inkubation bei 4°C für 30 Minuten in den Kühlschrank gestellt. Nach Zugabe von 200 µl 0,2%iger PBS wurde der Ansatz bei 9000g eine Minute zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschgang wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Anschließend wurden die Thrombozyten mit den Fluoreszinoisothiocyanat (FITC)-markierten Schwein-Anti-Kaninchen- oder Kaninchen-Anti-Maus-IgG versetzt und für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl 2%iger PBS wurden die Thrombozyten dreimal gewaschen (je eine Minute bei 9000g zentrifugiert). Nach dem letzten Waschgang wurde das Pellet in 200 µl PBS resuspendiert und in die mit 500 µl PBS gefüllten speziellen Röhrchen für die Durchflußzytometrie überführt. Die Messung erfolgte darauf im FACSCalibur (Becton Dickinson; San José, USA). Im Rechner wurden die Impulse daraufhin ausgewertet, aus denen man die Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ermitteln konnte.

2.5.2 Immunoblot

50 µg des Thrombozytenlysates wurden im Verhältnis 1:2 mit nicht reduziertem Probenpuffer (0,005% Bromphenolblau, 4% SDS, 15% Glycerol, 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8) verdünnt und über drei Minuten auf dem Thermomixer bei 95°C gekocht. Vor dem Auftragen auf das SDS-PAGE wurde das Lysat nochmals bei 15000g für drei Minuten abzentrifugiert. Zur Proteinauftrennung wurde das Gel daraufhin an 15 mA angeschlossen. Nach Beendigung des Trennvorganges wurden das Gel und die Nitrozellulose-Membran für 15 Minuten im Transferpuffer (20 mM Tris, 150 mM Glycin, 10% Methanol) auf dem Rüttler äquilibriert. Anschließend wurden die Proteine von dem Gel auf die Nitrozellulosemembran in einer Blotkammer bei 42 V für 75 Minuten transferiert.

Die Nitrozellulose wurde für 10 min mit 10 ml PBS gewaschen und dann mit 10 ml Blockierungslösung (1,5 % BSA; Serva, Heidelberg) in Waschpuffer (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20) versetzt und bei Raumtemperatur für eine Stunde auf dem Rüttler inkubiert. Anschließend wurde die Nitrocellulose mit 20 µl

Anti-GPVI in 15 ml Blockierungslösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und mehrmals mit dem Waschpuffer gewaschen; zunächst dreimal 15 Sekunden, danach für 15 Minuten und zum Schluss zweimal fünf Minuten.

Als Sekundärantikörper wurden ein Peroxidase-markiertes Kaninchen-anti-Maus-IgG (Dianova, Hamburg) in einer 1:50000 Verdünnung und ein Peroxidase-markiertes Ziege-anti-Kaninchen-IgG (DAKO, Glostrup, Dänemark) in einer 1:5000 Verdünnung verwendet. Diese wurden in 15 ml Blockierungslösung für 45 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Rüttler inkubiert. Daraufhin erfolgten erneut mehrere Waschschriffe mit dem Waschpuffer, um die Blockierungslösung zu entfernen. Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran eine Minute mit einem Chemilumineszenz-Reagenz (ECL Western blotting detection reagent; Amersham Biosciences, Freiburg) inkubiert. Die Membran wurde daraufhin auf Filterpapier getrocknet und auf einem Röntgenfilm in einer Filmkassette exponiert. Die Stärke der entstandenen Präzipitate ließ sich durch einen Scanner (HP, Image Quant Version 3.1) quantifizieren.

2.6 Statistik

Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe der SPSS-Software (Version 9.0 für Windows) durchgeführt. Der Chi-Quadrat (χ^2)-Test wurde für die Untersuchung der Abweichungen der GPVI C-154T-Genotypen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht verwendet. Um die etablierten Risikofaktoren zwischen den einzelnen Genotypen vergleichen zu können, wurden die statistischen Beziehungen der Genotypen zu den kontinuierlichen Parametern durch das Kruskal-Wallis 1-way ANOVA und zum Diabetes mellitus und der arteriellen Hypertonie durch den χ^2 -Test untersucht. Die etablierten Risikofaktoren für die koronare Herzkrankheit und den Myokardinfarkt wurden durch die multiple Regressionsanalyse (Schweregrad der koronaren Herzkrankheit) und durch die multiple logistische Regression (Bestehen oder Abwesenheit von Koronarer Herzkrankheit bzw. des Myokardinfarkts) identifiziert. Alle Regressionsanalysen erfolgten unter Berücksichtigung der in der Studienpopulation nachgewiesenen Risikofaktoren. Ein zweiseitiger Wahrscheinlichkeitswert von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant definiert. Die Analyse basierte auf den Modellen regressiver, kodominanter und dominanter Vererbung.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Patienten- und Kontrollgruppe

3.1.1 Altersstruktur des Gesamtkollektivs

Zunächst wurde die Altersstruktur des Gesamtkollektivs untersucht. Dabei wurden acht verschiedene Altersgruppen von 11 bis 90 Jahren gebildet. Wie in Abb. 11 erkennbar ist, waren die 51-60jährigen am häufigsten und die 61-70jährigen am zweithäufigsten in der Gesamtpopulation vertreten. Der Mittelwert des Alters innerhalb des Gesamtkollektivs lag bei $59,5 \pm 10,4$ Jahre. Das Alter war innerhalb der Gesamtpopulation normal verteilt.

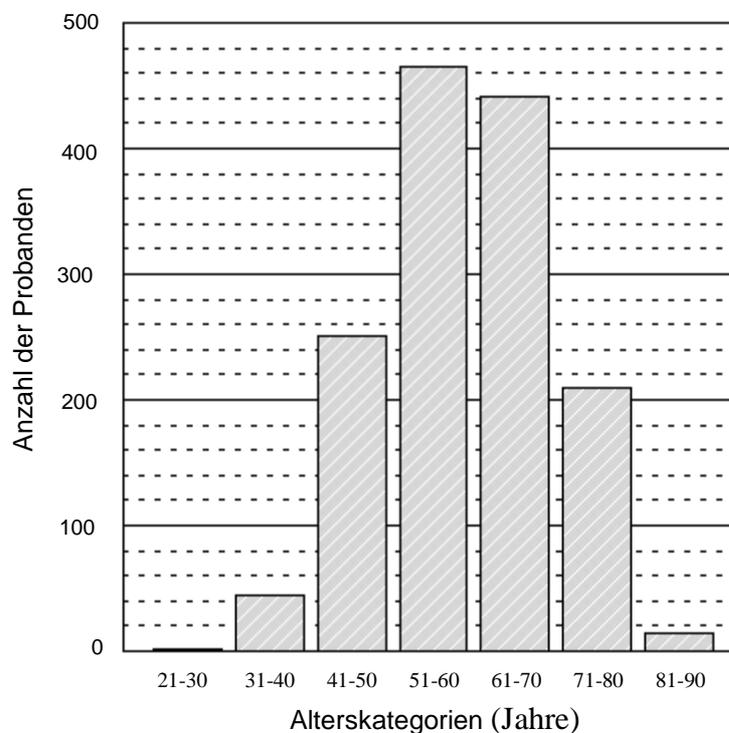


Abb. 11 Altersverteilung in der Gesamtpopulation

Anzahl der Probanden in absoluten Zahlen. 21-30 Jahre: 1, 31-40 Jahre: 37, 41-50 Jahre: 241, 51-60 Jahre: 423, 61-70 Jahre: 405, 71-80 Jahre: 194, 81-90 Jahre: 15.

3.1.2 Altersstruktur innerhalb der Patienten- und Kontrollgruppe

In der Kontrollgruppe (530 Personen) betrug das Durchschnittsalter $55,3 \pm 10,1$ Jahre. Dabei waren die 51-60jährigen am häufigsten und die 41-50jährigen Probanden am zweithäufigsten vertreten.

Die Patientengruppe (899 Personen) hatte ein Durchschnittsalter von $61,2 \pm 9,8$ Jahren. In dieser Gruppe waren am häufigsten die 61-70jährigen Patienten vertreten und am zweithäufigsten die 51-60jährigen.

In der Koronarangiographie konnte bei 113 der 899 Patienten (12,6%) keine signifikante KHK nachgewiesen werden. Das Durchschnittsalter diese Gruppe betrug $58,8 \pm 10,2$ Jahre. Diese Patienten zeigten definitionsgemäß Stenosen $<50\%$ und wurden somit für den Vergleich zwischen KHK-Patienten und herzgesunden Probanden ausgeschlossen, da sie weder als herzgesund noch als KHK-Patient eingestuft werden konnten. Bei den übrigen 786 Patienten (87,4%) konnte eine KHK nachgewiesen werden. Das Durchschnittsalter der KHK-Patienten betrug $62,4 \pm 9,6$ Jahre.

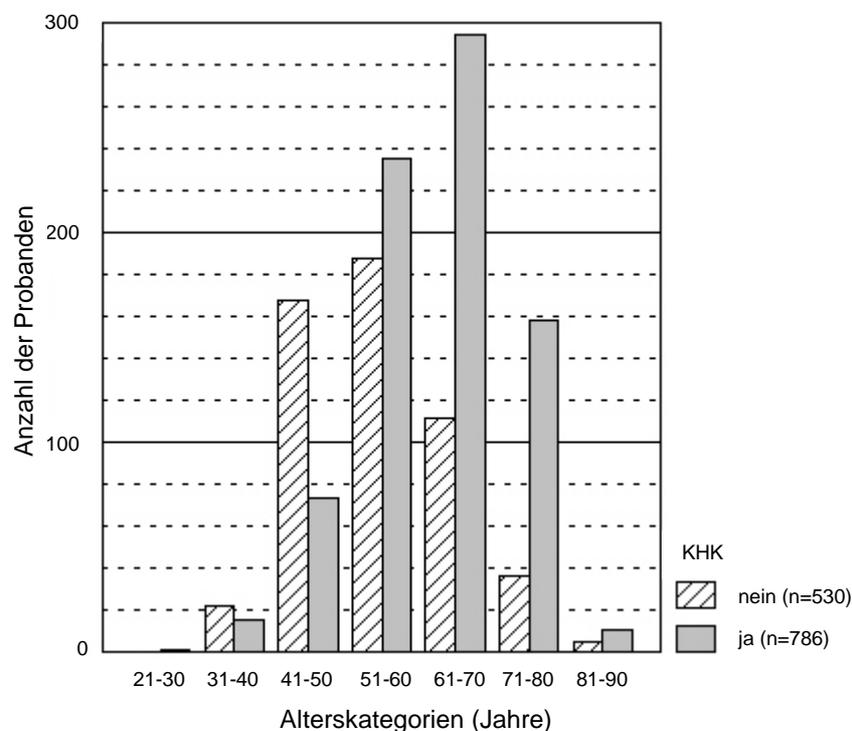


Abb. 12 Altersverteilung der Kontroll- und Patientengruppe mit signifikanter koronarer Herzkrankheit

Anzahl der Probanden in absoluten Zahlen. KHK: koronare Herzkrankheit, n: Anzahl der Probanden. Ohne KHK (Kontrollgruppe): 21-30 Jahre: 0, 31-40 Jahre: 22, 41-50 Jahre: 168, 51-60 Jahre: 188, 61-70 Jahre: 111, 71-80 Jahre: 36, 81-90 Jahre: 5. Mit KHK (Patientengruppe): 21-30 Jahre: 1, 31-40 Jahre: 15, 41-50 Jahre: 73, 51-60 Jahre: 235, 61-70 Jahre: 294, 71-80 Jahre: 158, 81-90 Jahre: 10.

Die Patientengruppe ließ sich durch die Koronarangiographie zusätzlich in die Untergruppen mit Ein-, Zwei- und Dreifäßerkrankung (GE) unterteilen. Die Altersverteilungen dieser drei Untergruppen und derjenigen der Kontrollgruppe

wurden in der Abb. 13 graphisch dargestellt. 195 der 786 Patienten (24,8%) mit KHK hatten eine 1-GE. Bei 234 Patienten konnte in der Koronarangiographie eine 2-GE (29,8%), bei 357 (45,4%) sogar eine 3-GE festgestellt werden.

Das Durchschnittsalter bei Patienten mit Eingefäßerkrankung lag bei $60,1 \pm 10,3$ Jahren, mit Zweigefäßerkrankung bei $61,9 \pm 9,9$ Jahren und mit Dreigefäßerkrankung bei $63,9 \pm 8,7$ Jahren.

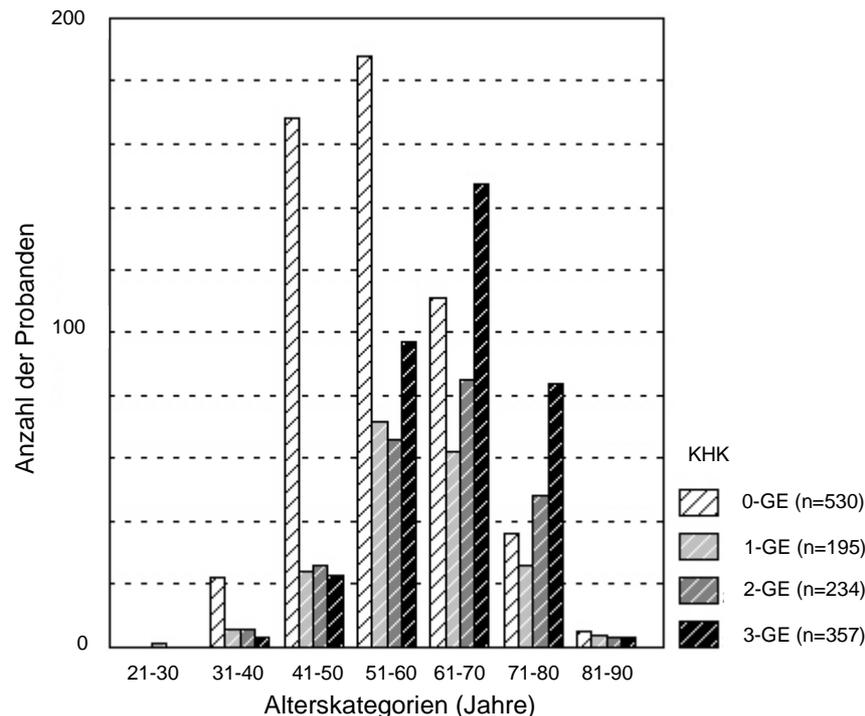


Abb. 13 Altersverteilung der Kontrollgruppe (Nullgefäßerkrankung) und Patienten mit Ein-, Zwei- und Dreigefäßerkrankung

Anzahl der Probanden in absoluten Zahlen. KHK: koronare Herzkrankheit, GE: Gefäßerkrankung, n: Anzahl der Probanden. 0-GE (Nullgefäßerkrankung=Kontrollgruppe): 21-30 Jahre: 0, 31-40 Jahre: 22, 41-50 Jahre: 168, 51-60 Jahre: 188, 61-70 Jahre: 111, 71-80 Jahre: 36, 81-90 Jahre: 5. 1-GE (Eingefäßerkrankung): 21-30 Jahre: 1, 31-40 Jahre: 6, 41-50 Jahre: 24, 51-60 Jahre: 72, 61-70 Jahre: 62, 71-80 Jahre: 26, 81-90 Jahre: 4. 2-GE (Zweigefäßerkrankung): 21-30 Jahre: 0, 31-40 Jahre: 6, 41-50 Jahre: 26, 51-60 Jahre: 66, 61-70 Jahre: 85, 71-80 Jahre: 48, 81-90 Jahre: 3. 3-GE (Dreigefäßerkrankung): 21-30 Jahre: 0, 31-40 Jahre: 3, 41-50 Jahre: 23, 51-60 Jahre: 97, 61-70 Jahre: 147, 71-80 Jahre: 84, 81-90 Jahre: 3.

3.1.3 Myokardinfarkt-Verteilung innerhalb der Patientengruppe

Unabhängig von einer vorhandenen koronaren Herzkrankheit wurden die Patienten in den einzelnen Altersgruppen auch noch danach eingeteilt, ob sie einen Myokardinfarkt (MI) durchgemacht hatten oder nicht. 160 der insgesamt 899 Patienten (17,8%) hatten keinen Myokardinfarkt, die restlichen 739 dagegen

schon (82,2%). Das Durchschnittsalter der Patienten ohne Myokardinfarkt lag dabei bei $62,1 \pm 9,8$ Jahren, das der Patienten mit mindestens einem Infarkt bei $61,9 \pm 9,7$ Jahren.

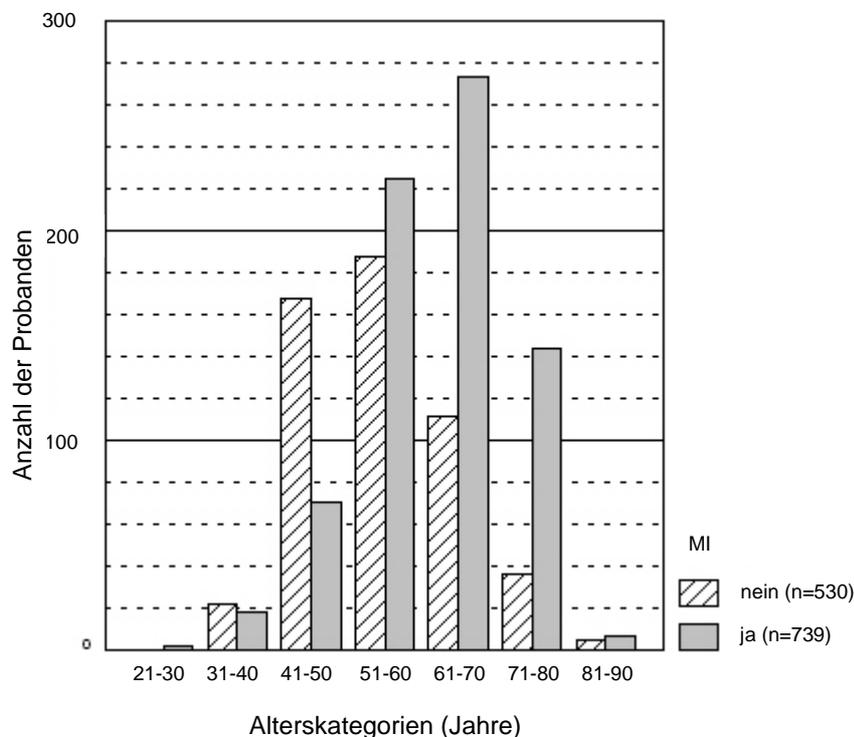


Abb. 14 Altersverteilung der Kontroll- und der Patientengruppe mit Myokardinfarkt

Anzahl der Probanden in absoluten Zahlen. MI: Myokardinfarkt, n: Anzahl der Probanden. Ohne MI (Kontrollgruppe): 21-30 Jahre: 0, 31-40 Jahre: 22, 41-50 Jahre: 168, 51-60 Jahre: 188, 61-70 Jahre: 111, 71-80 Jahre: 36, 81-90 Jahre: 5. Mit MI: 21-30 Jahre: 2, 31-40 Jahre: 18, 41-50 Jahre: 70, 51-60 Jahre: 225, 61-70 Jahre: 273, 71-80 Jahre: 144, 81-90 Jahre: 7.

3.1.4 Zusammenhang zwischen koronarer Herzkrankheit und Myokardinfarkt in der Patientengruppe

Weiterhin sollte nun in der Patientengruppe die Beziehung zwischen bestehender koronarer Herzkrankheit und dem Myokardinfarkt untersucht werden. Bei 47 der 899 Patienten (5,2%) konnte weder eine signifikante KHK noch ein Myokardinfarkt nachgewiesen werden (Abb. 15, S. 41). Dagegen bekamen 66 Patienten (7,3%) ohne zugrunde liegende signifikante KHK einen Infarkt. Bei 113 Patienten (12,6%) konnte in der Koronarangiographie zwar eine KHK diagnostiziert werden, sie bekamen jedoch keinen Myokardinfarkt. Die überwiegende Mehrheit der Patienten (673, 74,9%) erlitt bei vorhandener KHK einen Infarkt.

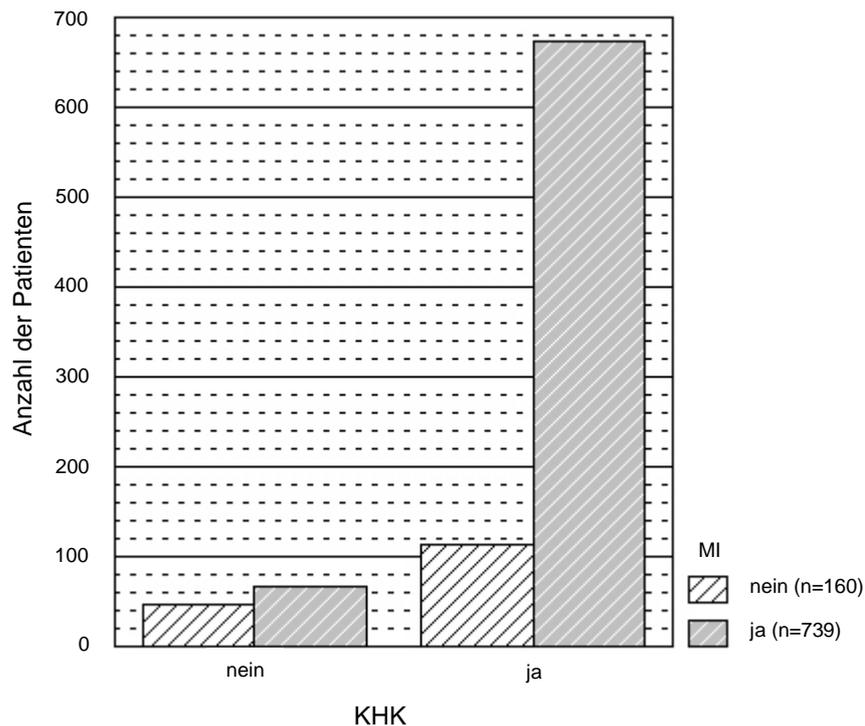


Abb. 15 Beziehung zwischen koronarer Herzkrankheit und Myokardinfarkt in der Patientengruppe

Anzahl der Probanden in absoluten Zahlen. KHK: koronare Herzkrankheit, MI: Myokardinfarkt, n: Anzahl der Probanden. Kein MI: keine KHK: 47, KHK: 113. Mit MI: keine KHK: 66, KHK: 673.

Es zeigte sich somit, dass der Myokardinfarkt deutlich häufiger bei vorbestehender KHK (673 von 786 Patienten; 85,6%) als ohne (66 von 113 Patienten; 58,4%) auftrat. Die KHK war damit hochsignifikant mit dem Myokardinfarkt assoziiert ($p < 0,0001$).

Um zu erkennen, ob der Schweregrad der koronaren Herzkrankheit Einfluss auf die Häufigkeit eines Myokardinfarktes nahm, wurde zusätzlich das Auftreten eines Infarktes mit den Null-, Ein-, Zwei- und Dreifäßerkrankung korreliert (Abb. 16, S. 42).

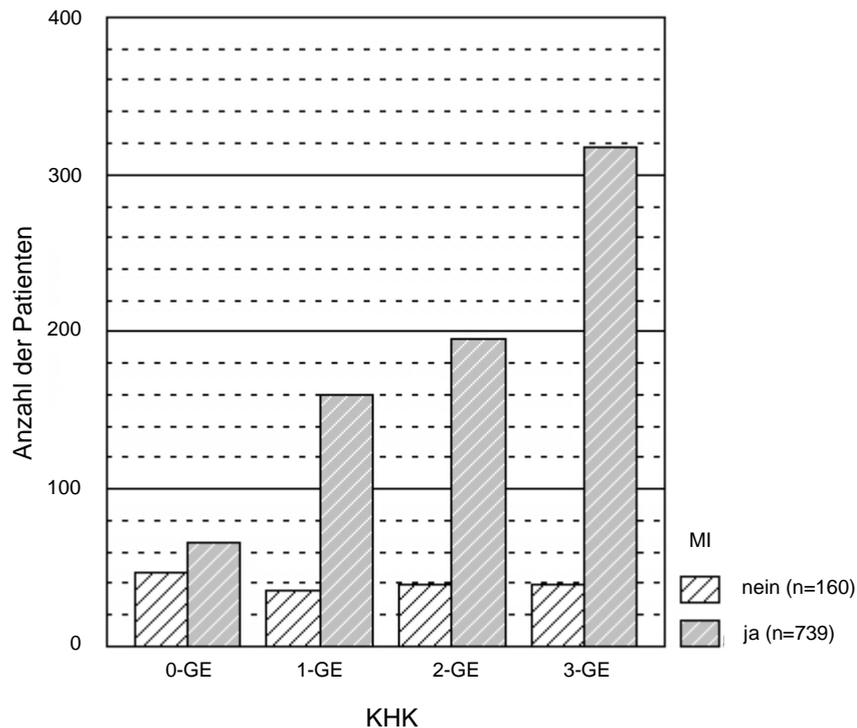


Abb. 16 Beziehung zwischen Schweregrad der koronaren Herzkrankheit und dem Myokardinfarkt

Anzahl der Probanden in absoluten Zahlen. KHK: koronare Herzkrankheit, 0-GE: Nullgefäßerkrankung, 1-GE: Eingefäßerkrankung, 2-GE: Zweigefäßerkrankung, 3-GE: Dreigefäßerkrankung, MI: Myokardinfarkt, n: Anzahl der Probanden. Kein MI: 0-GE: 47, 1-GE: 35, 2-GE: 39, 3-GE: 39. Mit MI: 0-GE: 66, 1-GE: 160, 2-GE: 195, 3-GE: 318.

160 der 195 Patienten (82,1%) mit einer 1-GE erlitten einen MI. Von den 234 Patienten mit einer 2-GE kam es bei 195 (83,3%) zu einem MI, in der Gruppe der Patienten mit einer 3-GE bekamen 318 von 357 (89,1%) einen MI (Abb. 16). Damit zeigte sich eine hochsignifikante Assoziation zwischen dem KHK-Schweregrad und dem Myokardinfarktrisiko ($p < 0,0001$).

3.1.5 Zusammenhang zwischen Gensini-Score und koronarer Herzkrankheit

Die Patienten wurden anhand ihrer Koronarangiographie auch noch nach dem Gensini-Score eingeteilt, der anhand von Box-Plots graphisch dargestellt wurde (Abb. 17, Seite 43). Dieser Score konnte ausschließlich für die Patientengruppe angewendet werden, da er eine Koronarangiographie voraussetzt. Der Gensini-Score wurde daraufhin mit der klinisch etablierten Einteilung in Ein-, Zwei- und Dreigefäßerkrankungen verglichen. Es zeigte sich, dass Patienten, bei denen in der Koronarangiographie keine koronare Herzkrankheit festgestellt werden konnte

(Stenosen <50%), einen Gensini-Score von 6,5 (Median) aufwiesen. Die Patienten mit nachgewiesener KHK zeigten dagegen einen Score von 54,0 ($p < 0,001$).

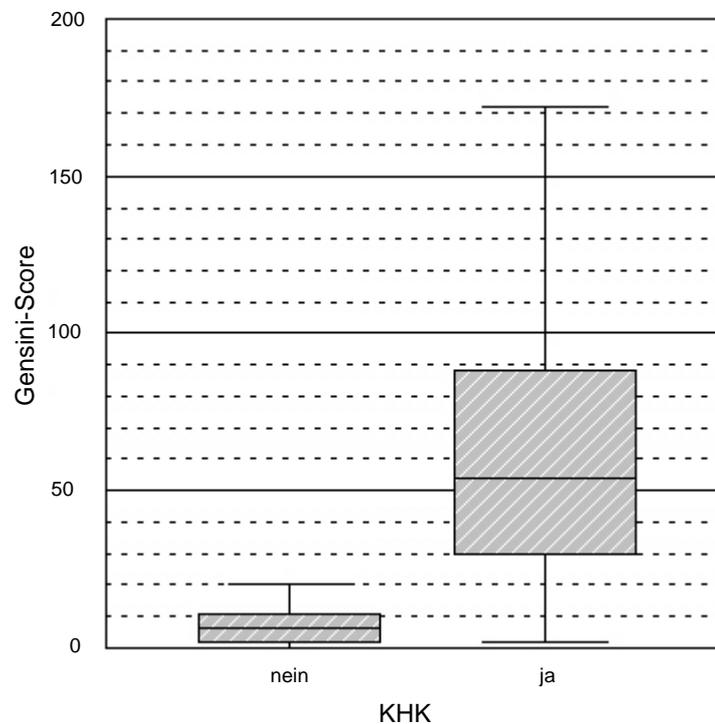


Abb. 17 Zusammenhang zwischen Gensini-Score und der koronaren Herzkrankheit nach klinischer Definition in der Patientengruppe

Darstellung in Box Plots. Die untere und obere Begrenzung des jeweiligen grauen Kastens bilden die 25%- bzw. die 75%-Perzentile. Der Querstrich innerhalb des Kastens verweist auf den Median. Minimum und Maximum sind als Begrenzungsstriche dargestellt. KHK: koronare Herzkrankheit. Ohne KHK: Mittelwert 6,9, Standardfehler (SD) 0,52, Median 6,5, Standardabweichung (SEM) 5,49, Minimum 0,0, Maximum 20,5. Mit KHK: Mittelwert 64,66, SD 1,61, Median 54,0, SEM 45,2, Minimum 2,0, Maximum 272,0*.

* Ausreißer wurden im Diagramm nicht dargestellt.

3.1.6 Zusammenhang zwischen Gensini-Score und Schweregrad der koronaren Herzkrankheit

Auch für die Patientengruppen mit Ein-, Zwei- und Dreifäßerkrankungen bei koronarer Herzkrankheit wurde der jeweilige Gensini-Score festgelegt. Es zeigte sich eine Übereinstimmung dieser beiden verschiedenen Definitionen des KHK-Schweregrades. Je mehr Gefäße befallen waren, desto höher war auch der Gensini-Score (Abb. 18, S. 44, $p < 0,001$). Bei den Patienten mit einer Eingefäßerkrankung lag der Median bei 27,0 und nahm bei den Patienten mit

Zweigegefäßerkrankung auf 49,25 zu. Der Median des Gensini Scores bei Patienten mit Dreigegefäßerkrankung lag bei 81,0.

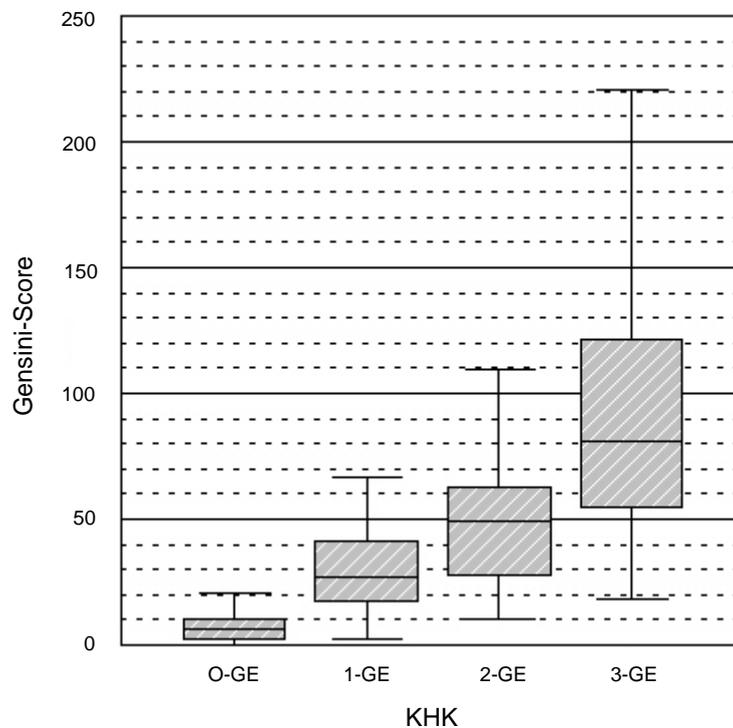


Abb. 18 Zusammenhang zwischen Gensini-Score und der Ein-, Zwei- und Dreigegefäßerkrankung

Darstellung in Box Plots. Die untere und obere Begrenzung des jeweiligen grauen Kastens bilden die 25%- bzw. die 75%-Perzentile. Der Querstrich innerhalb des Kastens verweist auf den Median. Minimum und Maximum sind als Begrenzungsstriche dargestellt. KHK: koronare Herzkrankheit, 0-GE: Nullgefäßerkrankung, 1-GE: Eingefäßerkrankung, 2-GE: Zweigegefäßerkrankung, 3-GE: Dreigegefäßerkrankung. 0-GE: Mittelwert 6,89, Standardfehler (SD) 0,52, Median 6,5, Standardabweichung (SEM) 5,49, Minimum 0,0, Maximum 20,5. 1-GE: Mittelwert 32,0, SD 1,53, Median 27,0, SEM 21,35, Minimum 2,0, Maximum 98,5*. 2-GE: Mittelwert 53,03, SD 2,12, Median 49,25, SEM 32,41, Minimum 10,0, Maximum 206,0*. 3-GE: Mittelwert 90,12, SD 2,51, Median 81,0, SEM 47,40, Minimum 18,5, Maximum 272,0*.

* Ausreißer wurden im Diagramm nicht dargestellt.

3.1.7 Zusammenhang zwischen Gensini-Score und Myokardinfarkttrisiko

Wie für die KHK wurde der Gensini-Score auch für die Patienten ohne und mit Myokardinfarkt berechnet. Wie oben dargelegt wurde (3.1.3, S. 39) erlitten 739 Patienten einen Myokardinfarkt unabhängig davon, ob bei ihnen eine koronare Herzkrankheit vorlag oder nicht.

Bei Patienten ohne Myokardinfarkt (160) lag der Median des Gensini-Scores bei 26,3, mit Myokardinfarkt bei 52,5 (Abb. 19, S. 45, $p < 0,001$). Auch bei der Einteilung nach Gensini zeigte sich der Zusammenhang zwischen KHK-

Schweregrad und Myokardinfarkt ($p < 0,0001$). Der Gensini-Score ließ sich also analog der Einteilung nach Ein-, Zwei- und Dreifäßerkrankung verwenden und bezog auch schon geringere Gefäßveränderungen mit ein.

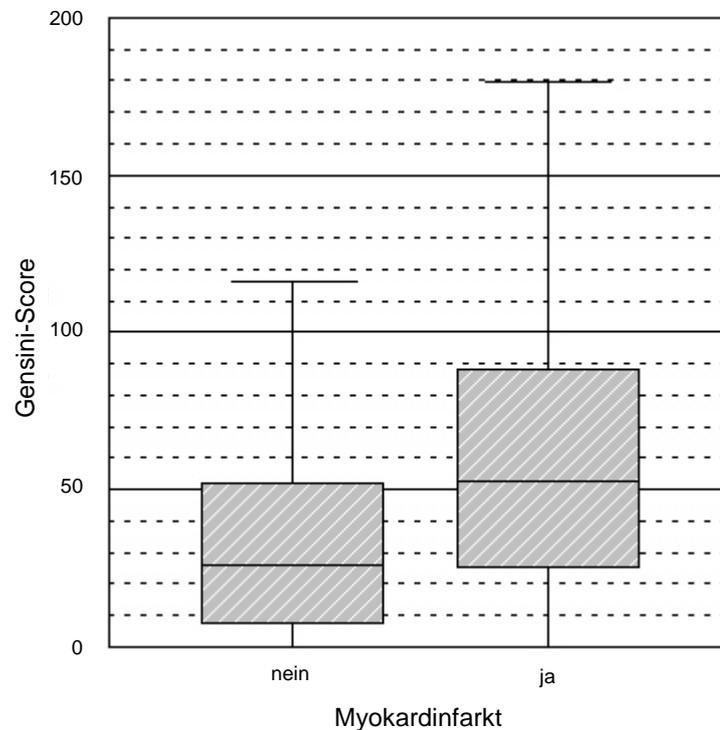


Abb. 19 Darstellung des Gensini-Scores bei Patienten ohne bzw. mit Myokardinfarkt

Darstellung in Box Plots. Die untere und obere Begrenzung des jeweiligen grauen Kastens bilden die 25%- bzw. die 75%-Perzentile. Der Querstrich innerhalb des Kastens verweist auf den Median. Minimum und Maximum sind als Begrenzungsstriche dargestellt. MI: Myokardinfarkt. Ohne MI: Mittelwert 36,58, Standardfehler (SD) 3,20, Median 26,25, Standardabweichung (SEM) 40,46, Minimum 0,0, Maximum 272,0*. Mit MI: Mittelwert 61,91, SD 1,71, Median 52,5, SEM 46,45, Minimum 0,0, Maximum 271,0*.

* Ausreißer wurden im Diagramm nicht dargestellt.

Außerdem stieg der Gensini-Score auch noch in Abhängigkeit von der Anzahl der erlittenen Myokardinfarkte an ($p < 0,001$; Ergebnisse nicht dargestellt). Je mehr Infarkte vorlagen, desto höher war auch der Score. Während der Score bei einem Myokardinfarkt bei 48,5 lag, stieg er bei zwei durchgemachten Infarkten auf 65,0 und bei dreien sogar auf 100,8 an (Ergebnisse ohne graphische Darstellung).

3.2 Verteilung der Risikofaktoren der koronaren Herzkrankheit und des Myokardinfarktes

3.2.1 Verteilung der Risikofaktoren bei Herzgesunden und bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit

Um die Population noch genauer charakterisieren zu können, wurden verschiedene Parameter bestimmt, die als Risikofaktoren für die koronare Herzkrankheit und den Myokardinfarkt gelten. Dazu gehörten das Alter, der Body Mass Index (BMI), der Nikotinabusus, der Diabetes mellitus, die arterielle Hypertonie, das Gesamtcholesterin, die Triglyzeride, die Apolipoproteine AI und B und das Lipoprotein (a) (Lp(a)).

Tab. 2 Verteilung der Risikofaktoren in Abhängigkeit von der koronaren Herzkrankheit

Risikofaktoren	Koronare Herzkrankheit			2p ⁽¹⁾	2p ⁽²⁾
	-KHK ⁽¹⁾ n=530	-KHK ⁽²⁾ n=113	+KHK n=786		
Alter (Jahre)	55.3 ± 10.1	58.8 ± 10.2	62.4 ± 9.6	0.0001	0.0001
BMI (kg/m ²)	26.3 ± 3.3	26.6 ± 3.4	26.9 ± 3.2	n. s.	n. s.
Pack-Years	16 ± 28	21 ± 24	26 ± 26	0.0001	0.031
% Diabetes	7	12	18	0.021	n. s.
% Hypertension	16	52	65	0.0001	0.045
Trig (mg/dl)	140 ± 53	134 ± 67	149 ± 82	n. s.	n. s.
Chol (mg/dl)	211 ± 43	202 ± 43	208 ± 43	n. s.	n. s.
ApoAI (g/l)	1.47 ± 0.25	1.46 ± 0.30	1.38 ± 0.29	0.0001	0.003
ApoB (g/l)	1.11 ± 0.25	1.19 ± 0.27	1.27 ± 0.34	0.0001	0.048
Lp(a) (mg/l)	19 ± 25	20 ± 29	30 ± 40	0.001	0.018

Die Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung oder % einer Gruppe. Die Beziehung der Risikofaktoren zur koronaren Herzkrankheit (KHK) wurde mittels multipler logistischer Regression analysiert. Abkürzungen: BMI: Body mass index, Trig: Triglyzeride, Chol: Cholesterin, Apo: Apolipoprotein, Lp(a): Lipoprotein (a), "-KHK⁽¹⁾": Probanden der Kontrollgruppe ohne KHK, "-KHK⁽²⁾", Patientengruppe *mit* Koronarangiographie und fehlendem Nachweis einer KHK, "+KHK": Patienten mit nachgewiesener KHK in der Koronarangiographie, "2p⁽¹⁾", zweiseitiger Wahrscheinlichkeitswert für den Vergleich von KHK-Patienten mit den Individuen der Kontrollgruppe ("-KHK⁽¹⁾"), "2p⁽²⁾", zweiseitiger Wahrscheinlichkeitswert für den Vergleich von KHK-Patienten mit koronarangiographierten Patienten ohne KHK ("-KHK⁽²⁾"), n. s.: nicht signifikant.

Bei dem Vergleich der herzgesunden Probanden (-KHK⁽¹⁾, n=530) mit den KHK-Patienten (+KHK, n=786) zeigte sich, dass das Alter ($p < 0,0001$), der Nikotinabusus ($p < 0,0001$), der Diabetes mellitus ($p = 0,028$), die arterielle Hypertonie ($p = 0,0001$), eine erniedrigte Apolipoprotein AI-Konzentration ($p < 0,0001$), ein erhöhtes Apolipoprotein B ($p < 0,0001$) und eine erhöhte Lipoprotein (a)-Konzentration ($p = 0,001$) als Risikofaktoren für eine koronare Herzkrankheit identifiziert werden konnten. Der BMI, die Triglyzeride und das Gesamtcholesterin unterschieden sich nicht zwischen Herzgesunden und KHK-Patienten (Tab. 2, S. 46).

Bei dem Vergleich der koronarangiographierten Patienten ohne nachgewiesene KHK (-KHK⁽²⁾, n=113) mit den KHK-Patienten (+KHK, n=786) zeigten sich Alter ($p < 0,0001$), Nikotinabusus ($p = 0,031$), arterielle Hypertonie ($p = 0,045$), eine erniedrigte Apolipoprotein AI-Konzentration ($p = 0,003$), ein erhöhtes Apolipoprotein B ($p = 0,048$) und eine erhöhte Lipoprotein (a)-Konzentration ($p = 0,018$) als Risikofaktoren für eine koronare Herzkrankheit. Keine Unterschiede zeigten sich beim BMI, dem Diabetes mellitus, den Triglyzeriden und dem Gesamtcholesterin (Tab. 2, S. 46).

Die Patientengruppe wurde weiterhin durch die Koronarangiographie in Untergruppen mit Ein-, Zwei- und Dreigefäßerkrankungen (1-GE, 2-GE, 3-GE) eingeteilt und mit der Kontrollgruppe (-KHK, n=530) verglichen (Tab. 3, S. 48). Auch hier waren Alter ($p < 0,0001$), Nikotinabusus ($p < 0,0001$), arterielle Hypertonie ($p < 0,0001$), eine erniedrigte Apolipoprotein AI-Konzentration ($p < 0,0001$), ein erhöhtes Apolipoprotein B ($p < 0,0001$) und eine erhöhte Lipoprotein (a)-Konzentration ($p = 0,007$) Risikofaktoren für eine koronare Herzkrankheit. BMI, Diabetes mellitus, Triglyzeride und Gesamtcholesterin zeigten dagegen keine signifikanten Unterschiede.

Tab. 3 Verteilung der Risikofaktoren in der Kontrollgruppe und der Patientengruppe mit unterschiedlichem Schweregrad der koronaren Herzkrankheit

Risikofaktoren	Koronare Herzkrankheit				2p
	-KHK n=530	1-GE n=195	2-GE n=234	3-GE n=357	
Alter (Jahre)	55.3 ± 10.1	60.1 ± 10.3	61.9 ± 9.9	63.9 ± 8.7	0.0001
BMI (kg/m ²)	26.3 ± 3.3	27.0 ± 3.5	26.8 ± 3.3	26.8 ± 3.0	n. s.
Pack-Years	16 ± 28	27 ± 27	26 ± 28	25 ± 26	0.0001
% Diabetes	7	12	18	21	n. s.
% Hypertension	16	65	67	64	0.0001
Trig (mg/dl)	140 ± 53	146 ± 76	158 ± 100	146 ± 73	n. s.
Chol (mg/dl)	211 ± 43	202 ± 44	207 ± 43	213 ± 42	n. s.
ApoAI (g/l)	1.47 ± 0.25	1.36 ± 0.30	1.39 ± 0.28	1.38 ± 0.29	0.0001
ApoB (g/l)	1.11 ± 0.25	1.20 ± 0.33	1.23 ± 0.34	1.32 ± 0.34	0.0001
Lp(a) (mg/l)	19 ± 25	27 ± 27	26 ± 28	28 ± 39	0.007

Die Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung oder % einer Gruppe. Die Beziehung der Risikofaktoren zur KHK wurde mittels multipler logistischer Regression analysiert. Abkürzungen: BMI: Body mass index, Trig: Triglyzeride, Chol: Cholesterin, Apo: Apolipoprotein, Lp(a): Lipoprotein (a), "-KHK": Probanden der Kontrollgruppe ohne KHK; "1-GE": Patienten mit Eingefäßerkrankung, "2-GE": Patienten mit Zweigefäßerkrankung, "3-GE": Patienten mit Dreigefäßerkrankung, "2p", zweiseitiger Wahrscheinlichkeitswert für den Vergleich von KHK-Patienten mit den Individuen der Kontrollgruppe, n. s.: nicht signifikant.

3.2.2 Verteilung der Risikofaktoren in Abhängigkeit vom Myokardinfarkt

Wir verglichen zudem die Kontrollgruppe (-MI⁽¹⁾, n=530) und die koronarangiographierten Patienten ohne Infarkt (-MI⁽²⁾, n=160) mit den koronarangiographierten Patienten mit Myokardinfarkt (+MI, n=739). Wie in Tab. 4 (S. 49) dargestellt wurde, zeigte sich im Vergleich zwischen den herzgesunden Probanden der Kontrollgruppe und den Myokardinfarktpatienten, dass das Alter (p<0,0001), der Nikotinabusus (p<0,0001), der Diabetes mellitus (p=0,017), die arterielle Hypertonie (p<0,0001), die Triglyzeride (p=0,017), eine erniedrigte Apolipoprotein AI-Konzentration (p<0,0001), ein erhöhtes Apolipoprotein B (p<0,0001) und eine erhöhte Lipoprotein (a)-Konzentration (p=0,002) Risikofaktoren für einen Myokardinfarkt waren. Der BMI, die Gesamtcholesterine

und die Triglyzeride wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen auf.

Bei dem Vergleich der koronarangiographierten Patienten ohne MI (-MI⁽²⁾) mit den Myokardinfarktpatienten (+MI) konnten lediglich der Nikotinabusus (p=0,008) und eine erniedrigte Apolipoprotein AI-Konzentration (p=0,001) als signifikante Risikofaktoren identifiziert werden (Tab. 4).

Tab. 4 Verteilung der Risikofaktoren in Abhängigkeit vom Myokardinfarkt

Risikofaktoren	Myokardinfarkt			2p ⁽¹⁾	2p ⁽²⁾
	-MI ⁽¹⁾ n=530	-MI ⁽²⁾ n=160	+MI n=739		
Alter (Jahre)	55.3 ± 10.1	62.1 ± 9.8	61.9 ± 9.7	0.0001	n. s.
BMI (kg/m ²)	26.3 ± 3.3	26.8 ± 3.4	26.9 ± 3.2	n. s.	n. s.
Pack-Years	16 ± 28	20 ± 25	26 ± 26	0.0001	0.008
% Diabetes	7	12	19	0.017	n. s.
% Hypertension	16	66	63	0.0001	n. s.
Trig (mg/dl)	140 ± 53	150 ± 79	147 ± 81	0.017	n. s.
Chol (mg/dl)	211 ± 43	214 ± 40	206 ± 43	n. s.	n. s.
ApoAI (g/l)	1.47 ± 0.25	1.46 ± 0.28	1.37 ± 0.29	0.0001	0.001
ApoB (g/l)	1.11 ± 0.25	1.26 ± 0.27	1.26 ± 0.34	0.0001	n. s.
Lp(a) (mg/l)	19 ± 25	24 ± 37	25 ± 34	0.002	n. s.

Die Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung oder % einer Gruppe. Die Beziehung der Risikofaktoren zum MI wurde mittels multipler logistischer Regression analysiert. Abkürzungen: BMI: Body mass index, Trig: Triglyzeride, Chol: Cholesterin, Apo: Apolipoprotein, Lp(a): Lipoprotein (a), "-MI⁽¹⁾": Probanden der Kontrollgruppe ohne MI, "-MI⁽²⁾", KHK-Patienten ohne MI, "+MI": KHK-Patienten mit MI, "2p⁽¹⁾", zweiseitiger Wahrscheinlichkeitswert für den Vergleich von MI-Patienten mit den Individuen der Kontrollgruppe ("-MI⁽¹⁾"), "2p⁽²⁾", zweiseitiger Wahrscheinlichkeitswert für den Vergleich zwischen MI-Patienten und koronarangiographierten Patienten ohne MI ("-MI⁽²⁾"), n. s.: nicht signifikant.

3.3 Verteilung der GPVI C-154T – Genotypen

Der GPVI C-154T-Dimorphismus führt zu den drei verschiedenen Genotypen CC, CT und TT. Die Genotypisierung erfolgte mittels sequenzspezifischer Polymerasekettenreaktion (PCR-SSP). Typisierungen wurden durch Sequenzierung kontrolliert und bestätigt (vgl. 2.4.4, S. 33-35).

Wie in der Abb. 20 graphisch dargestellt wurde, waren in der Gesamtpopulation (n=1429) 307 Individuen CC-homozygot (21,5%), 734 CT-heterozygot (51,4%) und 388 TT-homozygot (27,2%) bezüglich des GPVI C-154T-Polymorphismus.

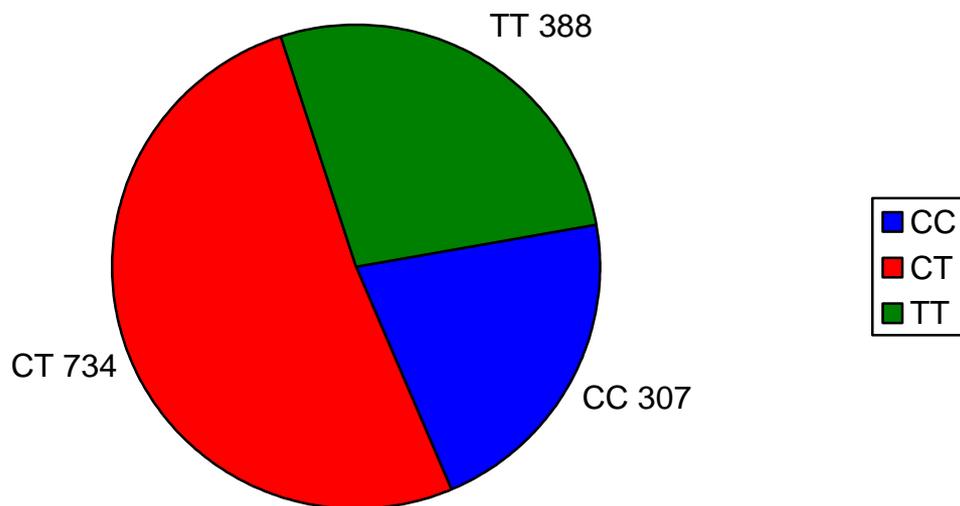


Abb. 20 Genotypenverteilung in der Gesamtpopulation

Die Gesamtpopulation sowie die einzelnen Untergruppen wurden nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG) untersucht, um bei Übereinstimmung mit dem HWG eine Assoziationsanalyse zwischen dem GPVI-Polymorphismus und der koronaren Herzkrankheit durchführen zu können. Die Gesamtpopulation (n=1429) zeigte keine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG, $p=0,192$). Auch bei der Kontrollgruppe (n=530, $p=0,906$), bei den koronarangiographierten Patienten mit Nullgefäßerkrankung (n=113, $p=0,170$), Eingefäßerkrankung (n=195, $p=0,271$), Zweigefäßerkrankung (n=234, $p=0,507$), Dreigefäßerkrankung (n=357, $p=0,497$) oder bei den Patienten mit Myokardinfarkt (n=739, $p=0,124$) bzw. ohne Myokardinfarkt (n=160, $p=0,430$) konnte jeweils keine Abweichung vom HWG festgestellt werden.

Tab. 5 Verteilung der Risikofaktoren in Abhängigkeit vom GPVI C-154T-Polymorphismus

Risikofaktoren	GPVI C-154T			2p
	CC n=307	CT n=734	TT n=388	
Alter (Jahre)	56.5 ± 10.5	59.6 ± 10.4	59.6 ± 10.4	0.722
BMI (kg/m ²)	26.5 ± 3.4	26.7 ± 3.14	26.7 ± 3.4	0.646
Pack-Years	25	28	25	0.446
% Diabetes	12	14	14	0.739
% Hypertension	44	45	48	0.582
Trig (mg/dl)	148 ± 77	145 ± 68	143 ± 78	0.634
Chol (mg/dl)	211 ± 46	207 ± 41	211 ± 44	0.282
ApoAI (g/l)	1.43 ± 0.28	1.39 ± 0.27	1.45 ± 0.28	0.003
ApoB (g/l)	1.18 ± 0.31	1.21 ± 0.31	1.21 ± 0.33	0.329
Lp(a) (mg/l)	23 ± 27	27 ± 37	24 ± 33	0.294

Die Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung oder % einer Gruppe. Abkürzungen: BMI: Body mass index, Trig: Triglyzeride, Chol: Cholesterin, Apo: Apolipoprotein, Lp(a): Lipoprotein. 2p: zweiseitige Wahrscheinlichkeit für Genotyp-abhängige Unterschiede bei den koronaren Risikofaktoren.

Wie in Tab. 5 dargestellt wurde, gab es innerhalb der Gesamtpopulation keinen signifikanten Unterschied zwischen den in dieser Studie untersuchten Risikofaktoren und den drei verschiedenen Genotypen. Den einzigen Genotyp-abhängigen Unterschied zeigte sich beim Apolipoprotein AI (p=0,003). Bei diesem Parameter hatten heterozygote Individuen niedrigere Apo AI Werte als CC- oder TT-Homozygote.

3.4 Phänotypische Untersuchungen des GPVI C-154T-Genpolymorphismus

Zur Überprüfung der Genotyp-abhängigen Expression des GPVI auf der Thrombozytenoberfläche wurden durchflußzytometrische Untersuchungen mit Kaninchen-anti-GPVI-Serum durchgeführt. Als Kontrolle dienten der monoklonale Antikörper Gi18 gegen PECAM-1 auf Thrombozyten. Als negative Kontrolle wurde

das Kaninchen-Serum verwandt. Untersucht wurden neun Individuen, die zunächst durch PCR-SSP genotypisiert worden waren. Um nun die Abhängigkeit der Expression von GPVI auf Thrombozyten von den Genotypen zu analysieren, wurden jeweils die Thrombozyten der drei verschiedenen Genotypen (CC, CT und TT) analysiert. In Abb. 21 sind beispielhaft die Fluoreszenzintensitäten der spezifischen Antikörper gegen GPVI und PECAM-1 in Abhängigkeit von den Genotypen dargestellt.

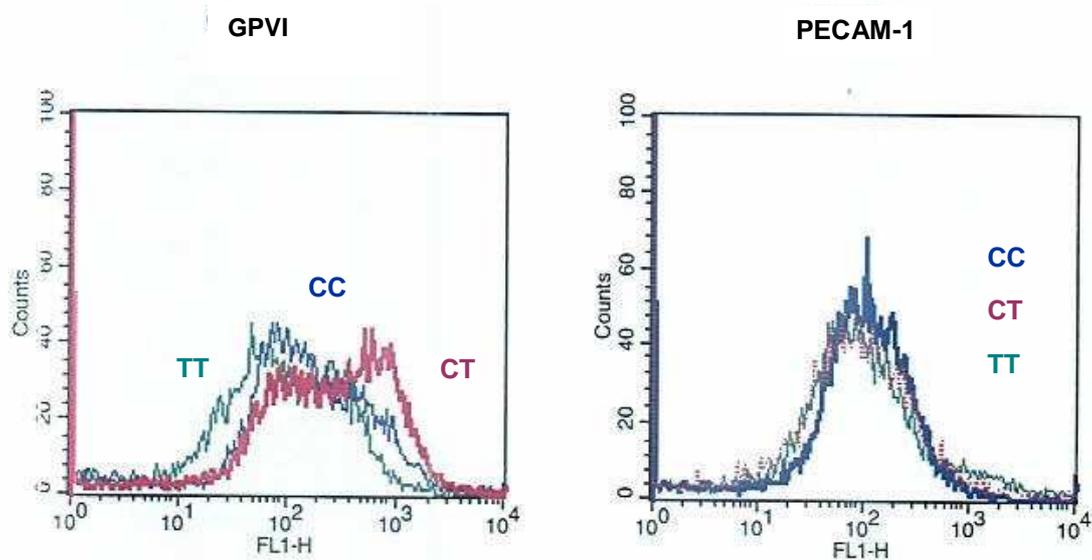


Abb. 21 Sequenzierung der drei GPVI C-154T-Genotypen

Darstellung der Fluoreszenzintensität (X-Achse) in Bezug zur gezählten Zellzahl (counts 1-100, Y-Achse) bei den drei verschiedenen Genotypen (TT-grün, CC-blau, CT-rot). Als positive Kontrolle diente dabei die Reaktion des Gi18-Antikörpers gegen PECAM-1. Die negative Kontrolle mit Kaninchen Serum ist dabei nicht dargestellt.

Anhand dieser durchflußzytometrischen Ergebnisse konnte die Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) bestimmt werden, die eine Aussage über die Dichte des GPVI auf der Thrombozytenoberfläche zulässt. Je höher die MFI, desto höher ist auch die Dichte des Glykoproteins auf der Thrombozytenoberfläche (Tab. 6, S. 53).

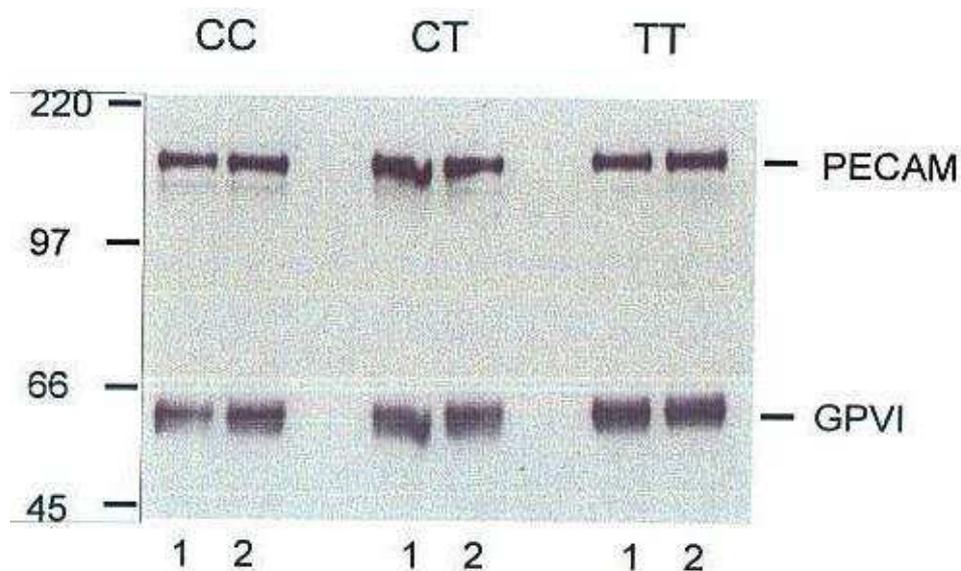
Tab. 6 Fluoreszenzintensität (Mittelwert) in Bezug auf den GPVI-Genotypen

	n	GPVI	PECAM-1	Kaninchen-Serum	MFI-Quotient
CC	3	246,86±207,93	195,75±72,66	14,00±6,16	1,29
CT	3	330,74±287,58	140,51±70,94	24,00±4,07	2,63
TT	3	347,25±232,40	145,74±60,91	19,98±8,33	2,60

Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Abkürzungen: MFI: Mittlere Fluoreszenzintensität.

Die Reaktionsstärke von GPVI wurde dann ins Verhältnis zur Reaktionsstärke von PECAM-1 gesetzt (MFI GPVI – MFI Kontrolle/MFI PECAM-1 – MFI Kontrolle). Es zeigte sich eine erhebliche Schwankung der Fluoreszenzintensitäten, so dass eine statistische Auswertung der Daten nicht möglich war.

Zur Verifizierung der Beobachtung in der Durchflußzytometrie wurde eine Immunoblot-Analyse durchgeführt. Ähnlich wie bei der Durchflußzytometrie wurde auch hierbei PECAM-1 als Kontrolle mitgeführt. In Abb. 22 erkennt man die verschiedenen Bandenmuster der drei Genotypen des GPVI und PECAM-1 als interne Kontrolle.

**Abb. 22** Ergebnis des Immunoblots

Die 170 kD großen Präzipitate zeigen das PECAM-1, die 60 kD großen die drei verschiedenen Genotypen CC, CT und TT des GPVI. Bande 1 stellt dabei das Ergebnis bei Verwendung von 5 µg des Antikörpers, Bande 2 von 10 µg dar.

Die Reaktionen von dem Antikörper Gi18 mit PECAM-1 auf Thrombozyten zeigten einheitliche Ausprägungen. Die GPVI-Expression der jeweiligen Genotypen CC, CT und TT waren optisch nicht zu unterscheiden. Diese Eindrücke ließen sich noch mit Hilfe von Quantifizierung der GPVI Bande über Scanner bestätigen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen (Tab. 7).

Tab. 7 Stärke der Präzipitation in Bezug auf den GPVI-Genotyp

	5 µg	10 µg
CC	1,16±0,07	1,08±0,05
CT	1,10±0,07	1,09±0,13
TT	1,13±0,14	1,22±0,22

Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung der durch den Scanner ermittelte Werte. Der Immunoblot wurde sowohl mit 5µg als auch 10µg des jeweiligen Antikörpers durchgeführt (vgl. 2.5.2, S. 35-36)

3.5 Der Zusammenhang zwischen dem GPVI C-154T -Genpolymorphismus und dem Risiko für eine koronare Herzkrankheit und einen Myokardinfarkt

3.5.1 Risiko für die koronare Herzkrankheit

Um herauszufinden, ob der C-154T Dimorphismus in einem statistischen Zusammenhang mit erhöhten Risiko für einen koronare Herzkrankheit steht, wurden nach oben beschriebenen Methoden (vgl. 2.4.2 und 2.4.3, S. 30-33) 899 Patienten, die sich einer Koronarangiographie unterzogen und 530 Personen der Kontrollgruppe genotypisiert. Tab. 8 (S. 55) zeigt die GPVI-Genotyp- und - Allelverteilungen der Kontroll- und Patientengruppen.

Tab. 8 GPVI-Genotyp und -Allelverteilungen in der Kontroll- (n=530) und der Patientengruppe (n=899)

	n	GPVI C-154T			C/T-Allel	
		n (CC)	n (CT)	n (TT)	C (95%KI)	T (95%KI)
Gesamtpopulation	1429	307	734	388	0.47 (0.45-0.49)	0.53 (0.50-0.55)
Kontrollgruppe	530	125	270	135	0.49 (0.46-0.52)	0.51 (0.48-0.54)
-KHK: 0-GE	113	25	50	38	0.44 (0.37-0.51)	0.56 (0.49-0.63)
+KHK: 1-GE	195	38	109	48	0.47 (0.43-0.52)	0.53 (0.48-0.57)
+KHK: 2-GE	234	46	124	64	0.46 (0.42-0.51)	0.54 (0.49-0.58)
+KHK:3-GE	357	73	181	103	0.46 (0.42-0.50)	0.54 (0.51-0.58)

Die Kontrollgruppe wurde anhand des Fragebogens nach Rose etabliert. Abkürzungen: KHK: koronare Herzkrankheit, GE: Gefäßerkrankung, n=Anzahl, KI: Konfidenzintervall. -KHK: 0-GE: koronarangiographierte Patienten ohne signifikante KHK (Stenosen < 50%), +KHK: 1-GE: koronarangiographierte Patienten mit einer Eingefäßerkrankung, +KHK: 2-GE: koronarangiographierte Patienten mit einer Zweigefäßerkrankung, +KHK: 3-GE: koronarangiographierte Patienten mit einer Dreigefäßerkrankung. Die 95%-Konfidenzintervalle sind in Klammern angegeben.

Mit keinem der Vererbungsmodelle ließ sich eine Assoziation zwischen dem GPVI C-154T-Dimorphismus und dem Risiko für eine KHK nachweisen.

3.5.2 Schweregrad der koronaren Herzkrankheit

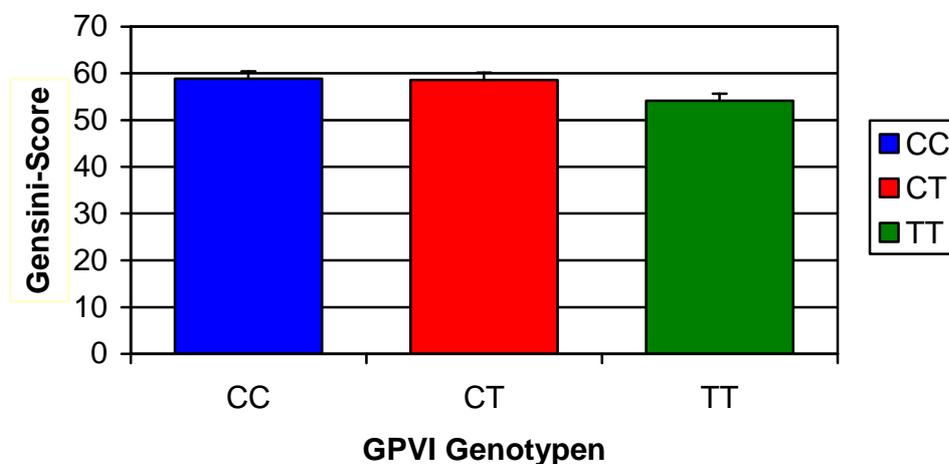
Der Schweregrad der koronaren Herzkrankheit wurde bei der Patientengruppe anhand der Anzahl der stenosierten Koronararterien mittels der Koronarangiographie bestimmt. Dementsprechend wurden die Gruppe der Patienten mit Ein-, Zwei- und Dreigefäßerkrankungen mit der der herzgesunden Kontrollgruppe verglichen. Es zeigte sich ebenfalls keine signifikante Assoziation zwischen dem GPVI C-154T-Polymorphismus und dem Schweregrad der KHK (Tab. 8).

Neben dieser klinischen Definition ließ sich der Schweregrad der KHK zusätzlich mittels Gensini-Score charakterisieren. Dieser Score berücksichtigte nicht nur den Grad der Stenose aller 15 Koronaräste, sondern auch deren Lokalisation und damit auch die klinische Relevanz der Stenosen. Da die Voraussetzung für die Berechnung des Gensini-Scores eine Koronarangiographie ist, konnten diese Analysen nur mit der Patientengruppe durchgeführt werden.

Tab. 9 Vergleich der GPVI-Genotypen mit dem Gensini-Score

GPVI C-154T-Genotypen	n	Gensini-Score
CC	182	58.9 ± 46.4
CT	464	58.6 ± 48.2
TT	253	54.1 ± 43.1

Der Gensini-Score ist als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. Zur Berechnung des Scores wurde zunächst der Grad der Stenose bestimmt und mit Werten von 0 (keine Stenose) bis 32 (100% Stenose) verknüpft. Diese Werte wurden dann je nach Lokalisation der Stenose und somit nach der Bedeutung für die vitale Funktion des Herzens mit 0,5, 1, 1,5, 2,5 oder 5 multipliziert (vgl. 2.1.4 und Tab. 1, S. 23-25). Abkürzungen: n=Anzahl.

**Abb. 23 Vergleich der GPVI-Genotypen mit dem Gensini-Score**

Graphische Darstellung der Mittelwerte der Gensini-Scores ± Standardfehler in Bezug auf den GPVI-Genotypen

Innerhalb dieser Population konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei C-154T-Genotypen des GPVI-Polymorphismus und dem Gensini-Score festgestellt werden ($p=0.414$).

Nicht nur in der Population der Klinikpatienten, sondern auch in den Hoch- und Niedrigrisikogruppen konnte keine signifikante Assoziation zwischen den GPVI-Genotypen und dem Gensini-Score festgestellt werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

3.5.3 Risiko für den Myokardinfarkt

Wie in Tab. 10 angegeben wurde, wurden auch die Patienten ohne bzw. mit Myokardinfarkt (n=899) im Vergleich mit den herzgesunden Probanden (n=530) nach ihrer Genotypverteilung untersucht. Dabei konnte keine Assoziation zwischen dem Genotypen des GPVI C-154T-Genpolymorphismus und dem Myokardinfarkttrisiko nachgewiesen werden.

Tab. 10 GPVI –Verteilung in der Kontroll- (n=530) und der Patientengruppe (n=899)

	n	GPVI C-154T			C/T-Allel	
		n (CC)	n (CT)	n (TT)	C (95%KI)	T (95%KI)
Gesamtpopulation	1429	307	734	388	0.47 (0.45-0.49)	0.53 (0.50-0.55)
Kontrollgruppe	530	125	270	135	0.49 (0.46-0.52)	0.51 (0.48-0.54)
-MI	160	38	69	53	0.88 (0.86-0.89)	0.12 (0.11-0.14)
+MI	739	144	395	200	0.87 (0.86-0.89)	0.13 (0.12-0.14)

Die Kontrollgruppe wurde mit Hilfe des Fragebogens nach Rose etabliert. Abkürzungen: -MI: koronarangiographierte Patienten ohne Myokardinfarkt, +MI: koronarangiographierte Patienten mit Myokardinfarkt, n=Anzahl. Die 95%-Konfidenzintervalle (KI) sind in Klammern angegeben.

Anschließend wurde noch untersucht, ob das Alter beim Erleiden des ersten Myokardinfarktes einen vom Genotyp abhängigen Unterschied aufwies. Bei 694 der 739 Patienten mit MI konnten valide Daten zum jeweiligen Alter beim ersten Herzinfarkt erhoben werden. Es konnte kein Altersunterschied zwischen den verschiedenen Genotypen beobachtet werden (Tab. 11 und Abb. 24, S. 58; $p=0,816$).

Tab. 11 Vergleich der GPVI-Genotypen mit dem Alter beim ersten Myokardinfarkt

GPVI C-154T-Genotypen	n	Alter (Jahre)
CC	136	56.7 ± 9.6
CT	364	56.9 ± 10.42
TT	194	56.3 ± 10.0
Insgesamt	694	56.7 ± 10.1

Das Alter wurde in Jahren als Mittelwert ± Standardabweichungen angegeben. Abkürzungen: n=Anzahl.

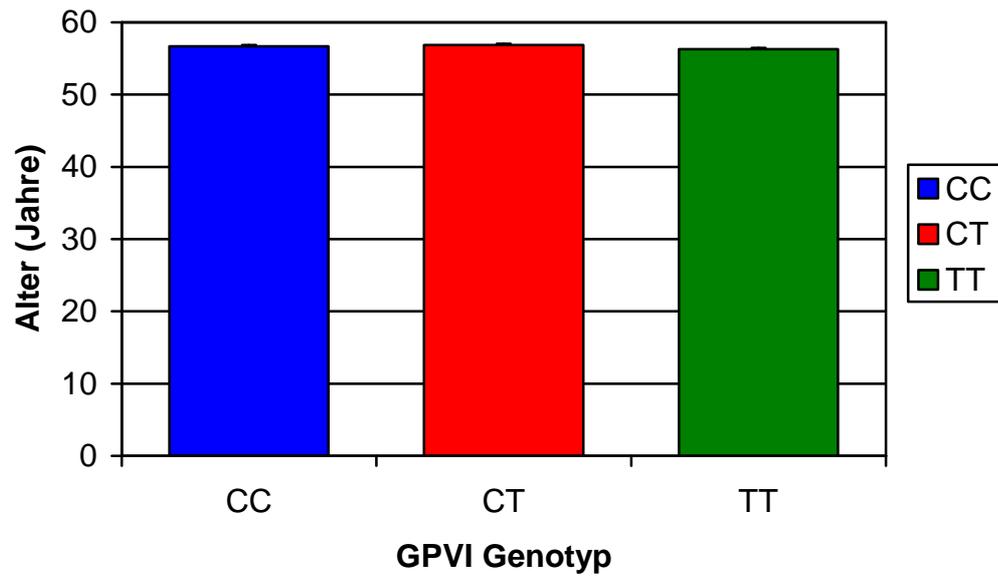


Abb. 24 Vergleich der GPVI-Genotypen mit dem Alter beim ersten Myokardinfarkt

Graphische Darstellung der Mittelwerte des Alters (in Jahren) beim 1. Myokardinfarkt \pm Standardfehler in Bezug auf den GPVI-Genotypen.

4. Diskussion

Die koronare Herzkrankheit (KHK) ist eine der häufigsten Todesursachen in Europa (Clemetson, 2001). In den letzten Jahren hat die Inzidenz immer mehr zugenommen, was auf zugrunde liegende Risikofaktoren wie Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie, Rauchen und auch Adipositas und auf genetische Veränderungen zurückzuführen ist (Santoso und Kunicki, 2001).

4.1 Zur Validität der Studienpopulation

In der vorliegenden Arbeit wurde an einem Untersuchungskollektiv mit 1429 Probanden der Zusammenhang zwischen etablierten Risikofaktoren und der KHK bzw. dem Myokardinfarkt (MI) untersucht. Des Weiteren wurde die Bedeutung des GPVI C-154T-Dimorphismus für das Risiko der Entstehung einer KHK und des Auftretens eines MI analysiert.

Das Gesamtkollektiv bestand dabei aus einer herzgesunden Kontrollgruppe von 530 Probanden und einer Patientengruppe (n=899), die eine Koronarangiographie erhalten hatten. Um hormonelle Einflüsse der Geschlechter auszuschließen, wurde die Studie nur mit männlichen Individuen durchgeführt. Die Gesamtpopulation wurde nach Alter in sieben Untergruppen eingeteilt. Das Alter gehörte dabei zu den nicht beeinflussbaren Risikofaktoren für eine KHK. Je älter die Patienten waren, desto häufiger wiesen sie eine KHK auf. Bei den 41 bis 50-Jährigen hatten nur 73 Patienten (9,3%) eine KHK, bei den 61 bis 70-Jährigen jedoch schon 294 (37,4%; vgl. 3.1.2, S. 37-39). Ebenso nahm der Schweregrad der KHK mit dem Alter zu. Die KHK wurde in eine Ein-, Zwei und Dreifäßerkrankung (1-, 2-, 3-GE) unterteilt. Man konnte erkennen, dass die Dreifäßerkrankung im Vergleich zu der Ein- und Zweifäßerkrankung ab dem 51. Lebensjahr deutlich zunahm. Je älter die Patienten waren, umso stärker war die KHK somit ausgeprägt (vgl. 3.1.2, S. 37-39). Dies ist durch die Tatsache zu erklären, dass Atherosklerose eine fortschreitende Systemerkrankung ist. Beim Überleben eines Akutgeschehens wie z.B. dem Myokardinfarkt nimmt der pathologische Mechanismus weiter zu und greift auf weitere Gefäßabschnitte über. Unabhängig von einer zugrunde liegenden KHK wurde das gesamte Patientenkollektiv auf einen stattgefundenen Myokardinfarkt hin untersucht (vgl.

3.1.3, S. 39-40). Ähnlich wie bei der Altersverteilung der KHK zeigte sich auch hier eine prozentuale Zunahme des MI bis zum 70. Lebensjahr (61-70-Jährige: 273 von 294 Patienten, 92,9%). Auch in der Gruppe der 71 bis 80-Jährigen erlitten noch 144 von 158 Patienten (91,1%) einen MI, ab dem 81. Lebensjahr jedoch nur noch 7 von 10 Patienten (70%). Diese geringere Rate an Myokardinfarkten lässt sich zum einen durch die eingeschränkte physische Belastung im Alter und zum anderen durch das Vorliegen weiterer Nebenerkrankungen erklären. Bei der Untersuchung des Zusammenhanges zwischen KHK und MI wurde deutlich, dass diese beiden Ereignisse signifikant miteinander assoziiert sind ($p < 0,0001$; vgl. 3.1.4, S. 40-42). Zu erwähnen ist allerdings, dass auch 66 Patienten ohne koronarangiographisch nachweisbare KHK einen MI erlitten (7,3%) und dagegen 113 Patienten mit KHK von einem MI (12,6%) verschont blieben. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass die KHK nicht der einzige prädisponierende Faktor für einen MI ist. Libby und Theroux (2005) verwiesen außerdem darauf, dass es nicht-stenosierende Plaques gibt, die über lange Zeit weder Symptome machen noch in einer Koronarangiographie detektiert werden. Eine plötzliche Ruptur kann jedoch eine instabile Angina pectoris oder einen Myokardinfarkt nach sich ziehen.

Zudem spielt auch der Schweregrad der KHK eine Rolle. Bei der Eingefäßerkrankung erlitten 160 der 195 Patienten (82,1%) einen Myokardinfarkt, bei der Dreigefäßerkrankung sogar 89,1%. Damit zeigte sich auch hier eine signifikante Assoziation zwischen dem KHK-Schweregrad und dem Myokardinfarkttrisiko ($p < 0,0001$; Abb. 16, S 42).

Auch die Definition der KHK anhand des Gensini-Scores zeigte eine signifikante Assoziation ($p < 0,001$; vgl. 3.1.5, S. 42-43). Patienten mit einer KHK hatten einen deutlich höheren Gensini-Score als Patienten ohne KHK (54,0 vs. 6,5). Wir konnten ebenfalls zeigen, dass anstatt der herkömmlichen Einteilung der KHK in 1-, 2- und 3-GE der Gensini-Score auch zur Beschreibung des Schweregrades der KHK herangezogen werden kann (vgl. 3.1.6, S. 43-44). Je mehr Gefäße befallen waren, desto höher war der Gensini-Score. Dieser Score lässt eine noch detailliertere Einteilung als die herkömmliche zu. Dabei werden auch Patienten erfasst, deren Koronargefäße um weniger als 50% verengt sind und damit in der herkömmlichen Einteilung als Patienten mit Nullgefäßerkrankung (d.h. ohne KHK) eingestuft werden. Er kann als noch aussagekräftiger eingeschätzt werden, da er auch schon geringere Gefäßveränderungen mit ein bezieht und durch den Bezug

auf Lokalisation der Stenose und auf die distale Gefäßqualität noch mehr klinische Relevanz aufzeigt. Auch für Herzinfarktpatienten ist der Gensini-Score ein signifikanter Parameter ($p < 0,0001$; vgl. 3.1.7, S. 44-45). Auch in Abhängigkeit der Anzahl der erlittenen Myokardinfarkte stieg der Gensini-Score an ($p < 0,001$).

Bei der Untersuchung der etablierten Risikofaktoren in der herzgesunden Kontrollgruppe und der Patientengruppe mit KHK zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der KHK und dem Alter, dem Nikotinabusus, dem Diabetes mellitus, der arteriellen Hypertonie, sowie den Plasmaspiegeln von den Apolipoproteinen A1 (ApoA1) und B (ApoB) und dem Lipoprotein (a) (Lp(a)). Auch in der Literatur wurden diese Risikofaktoren immer wieder untersucht. Wang et al. (2000) konnten den Nikotinabusus als signifikanten Risikofaktor sowohl für das Vorliegen der KHK als auch für deren Schweregrad identifizieren. Auch der Diabetes mellitus bzw. die pathologische Glucosetoleranz gelten als Risikofaktoren für die KHK (Homma, 2004; Carr und Brunzell, 2004). Die antihypertensive Therapie mit z.B. einem ACE-Hemmer oder einem β -Blocker kann das Fortschreiten der KHK bzw. das Risiko für eine MI vermindern. Allerdings spielen hier sowohl die Wahl des Antihypertensivums als auch die zusätzlichen Risikofaktoren eine große Rolle (Libby, 2001).

Das Lp(a) besteht aus einem Apolipoprotein (a) und dem Apolipoprotein B. Die Größe des Apolipoprotein (a) ist sehr variabel und wird mit der Konzentration des Lp(a) im Blut in Verbindung gebracht (Berglund und Ramakrishnan, 2004). Diese ist zumeist von der genetisch regulierten Syntheserate des Apolipoproteins (a) abhängig und somit nicht durch diätetische Maßnahmen oder lipidsenkende Medikamente beeinflussbar. Auch Lp(a) gilt als Risikofaktor für die KHK.

Ein erhöhtes Apolipoprotein B steigert in Zusammenhang mit dem Diabetes mellitus oder der Dyslipidämie das Risiko für eine KHK (Carr und Brunzell, 2004). Homma (2004) beschrieb, dass sowohl ApoB als auch ApoA1 einen höheren Vorraussagewert für die KHK besitzen als das „low density lipoprotein“ (LDL) und das „high density lipoprotein“ (HDL).

Beim Vergleich der Patienten, bei denen in der Koronarangiographie keine KHK detektiert wurde, mit jenen Patienten, bei denen eine KHK nachgewiesen werden konnte, waren bis auf den Diabetes mellitus die gleichen Risikofaktoren (Alter, Nikotinabusus, arterielle Hypertonie, Apolipoproteine A1 und B und Lp(a)) signifikant. Allerdings lag das Signifikanzniveau z.T. deutlich niedriger als bei dem

Vergleich der KHK-Patienten mit der herzgesunden Kontrollgruppe (vgl. Tab. 2, S. 47). Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist, dass die Patienten ohne nachgewiesene KHK (d.h. Stenosen <50%) schon kardiale Beschwerden wie Angina pectoris und ein gewisses koronares Risikoprofil aufwiesen.

Im Gegensatz zur Arbeit von Schunkert (2002) war der Body Mass Index (BMI) in unserer Studie kein signifikanter Risikofaktor. Carr und Brunzell (2004) bezogen sich weniger auf den BMI, sondern eher auf die regionale Fettverteilung. So beschrieben sie die erhöhte abdominelle (viszerale) Fettansammlung mit einem Taillenumfang >102 cm bei Männern und >88 cm bei Frauen als direkten Risikofaktor für die KHK. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Chiba et al. (2007) in zwei Studien mit 106 bzw. 810 Probanden. Auch wenn der BMI als Risikofaktor für die KHK kontrovers diskutiert wird (Schunkert, 2002; Carr und Brunzell, 2004; Chiba et al., 2007), so kann man sicher sagen, dass die Fettleibigkeit zumindest die Prävalenz der meisten kardiovaskulären Risikofaktoren erhöht.

Sowohl die Triglyzeride als auch das Gesamtcholesterin waren in unserer Studie keine signifikanten Risikofaktoren für die KHK. Das könnte daran liegen, dass LDL und HDL aussagekräftiger als das Gesamtcholesterin sind. Auch normale Gesamtcholesterinkonzentrationen können ein Risikofaktor für die KHK sein, je nach der Zusammensetzung von LDL und HDL. Diese beiden Lipoproteine wirken gegensätzlich auf die Atherosklerose (Mertens und Holvoet, 2001). Während ein hohes HDL protektiv wirkt, ist (oxidiertes) LDL atherogen. Zudem kann auch die Größe des LDL eine Rolle spielen. So beschrieben Carr und Brunzell (2004) ein erhöhtes KHK-Risiko bei Patienten mit einer normalen LDL-Konzentration im Blut, bei denen das LDL jedoch aus kleinen dichten Partikeln bestanden.

Die Hypertriglyzerinämie ist als Risikofaktor für Atherosklerose beschrieben worden (Chiba et al., 2007). Diese Aussage konnte mit unserer Studie zwar im Vergleich der herzgesunden Probanden mit den KHK-Patienten nicht bestätigt werden, bei den Myokardinfarkt-Patienten war sie dagegen ein signifikanter Risikofaktor.

Bis auf den Diabetes mellitus waren diese Risikofaktoren auch beim Vergleich der herzgesunden Kontrollgruppe mit den Gruppen der Ein-, Zwei- und Dreifäßerkrankung signifikant (vgl. 3.2.1, S. 46-48). Auch beim Myokardinfarkt waren im Vergleich zu der herzgesunden Kontrollgruppe das Alter, der

Nikotinabusus, der Diabetes mellitus, die arterielle Hypertonie, die Triglyzeride, die Apolipoproteine AI und B und das Lipoprotein (a) signifikante Risikofaktoren (vgl. 3.2.2, S. 48-49). Vergleich man jedoch innerhalb der Patientengruppe die Patienten mit Myokardinfarkt mit denjenigen ohne, so zeigte sich nur noch eine Signifikanz in Bezug auf den Nikotinabusus und den ApoAI-Spiegel. Dem Ergebnis liegt wahrscheinlich zugrunde, dass auch bei den Patienten ohne Myokardinfarkt zumeist eine KHK mit den verschiedenen Grunderkrankungen wie arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und Dyslipidämie vorlag.

4.2 Genpolymorphismen von thrombozytären Glykoproteinen und die koronare Herzkrankheit

In der Entstehung der KHK spielen jedoch nicht nur die oben genannten Risikofaktoren, sondern auch die Thrombozyten eine wesentliche Rolle (vgl. 1.4.1, S. 18-19). Die Freilegung von Kollagen und dem von Willebrand Faktor (vWF) durch eine Plaqueruptur oder Endothelschädigung führt zur Adhäsion der zirkulierenden Thrombozyten durch GPIb-V-IX und GPIa-IIa (Santoso und Kunicki, 2001). Über die Glykoproteine IIb-IIIa und VI erfolgt dann in einem komplexen Ablauf die weitere Aggregation und Aktivierung (Sixma et al., 1997).

Es wird diskutiert, ob genetische Veränderungen dabei ein Risiko für Arteriothrombose oder hämorrhagischer Diathese darstellen können (Santoso et al., 1999; Corral et al., 1999; Clemetson, 2001; Voetsch und Loscalzo, 2004). Die jeweiligen Polymorphismen der Glykoproteine Ib-V-IX, Ia-IIa und IIb-IIIa wurden immer wieder mit dem erhöhten Risiko für Myokardinfarkt (MI) und einen cerebrovaskulären Insult (CVI) in Verbindung gebracht, konnten aber nicht eindeutig als solche nachgewiesen werden (Santoso et al, 1999; Carlsson et al, 1999; Croft et al, 1999; Corral et al, 1999). Während die Rolle der verschiedenen Genotypen dieser Glykoproteine schon von einigen Arbeitsgruppen untersucht wurden (Santoso und Kunicki, 2001; Di Paola et al., 1999; Kritzik et al., 1998), sind die Funktion des GPVI und die Wirkung der dort aufgefundenen Polymorphismen noch nicht aufgeklärt.

Croft et al. (2001) beschrieben zehn Dimorphismen, wovon fünf stumme Mutationen waren (C-154T im Promotor und C10781A, G10804A, G10873A,

G22916C). Bei den weiteren fünf Mutationen (T13254C, A19871G, A21908G, A22630T und C22644A) kam es zu einem Aminosäureaustausch.

Der Polymorphismus T13254C, der den Austausch von Serin gegen Prolin bewirkte (Ser219Pro), wurde in der Arbeit von Croft et al. (2001) bei 525 Patienten und 474 Kontrollpersonen unter 75 Jahren auf das potentielle Myokardinfarktrisiko hin untersucht. Dabei wurde der Genotyp 13254CC in Zusammenhang mit einem erhöhten Myokardinfarktrisiko bei Frauen ($p=0,029$), bei Nichtrauchern ($p=0,048$) und bei Patienten älter als 60 Jahre ($p=0,009$) gebracht. Das Myokardinfarktrisiko war weiter bei Kopplung mit dem -148T-Allel des β -Fibrinogen-Gens um das zehnfache erhöht ($p=0,02$). Auch Ollikainen et al. (2004) untersuchten prospektiv 300 an plötzlichem Herztod verstorbene Männer zwischen 33 und 69 Jahren auf den T13254C-Genotyp. Dabei zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem 13254CC Genotypen und der koronaren Thrombose bzw. der KHK ($p=0,02$). Ein statistischer Zusammenhang mit einem Myokardinfarkt ($p=0,07$) oder dem plötzlichen Herztod ($p=0,3$) konnte nicht gefunden werden. Diese Tatsache könnte ein Hinweis dafür sein, dass dieses C-Allel zumindest als Risikofaktor für die KHK gelten kann. Im Gegensatz dazu zeigten die Studien von Joutsu-Korhonen et al. (2003) und Best et al. (2003), dass das C-Allel mit einer verminderten Expression des GPVI auf der Thrombozytenoberfläche in Verbindung stand und so eher ein Blutungsrisiko nach sich ziehen würde. Best et al. (2003) untersuchten dabei 102 gesunde Probanden, von denen allerdings nur ein Proband homozygot für das 13254C-Allel war. Dieser hatte eine über 90% geringere Expression von GPVI verglichen mit der Normalbevölkerung. Aber auch heterozygote Träger des 13254C-Allels (ca. 22% der Bevölkerung) zeigten eine um 10% verminderte GPVI-Expressionsrate verglichen mit den 13254T-homozygoten Individuen (ca. 77% der Bevölkerung). In einer Studie von Takagi et al. (2002) wurden weitere von Croft et al. (2001) publizierte Dimorphismen untersucht. Bei der Genotypisierung von 376 Patienten mit MI und 1080 Kontrollpersonen auf die beiden Mutationen Thr249Ala und His322Asn zeigte sich eine signifikante Assoziation des homozygoten Thr249-Trägers mit dem Risiko des Myokardinfarktes ($p=0,017$). Auch bei Japanern waren der Diabetes mellitus, das männliches Geschlecht, der Nikotinabusus, das HDL-Cholesterin und der BMI eigenständige Risikofaktoren für das Myokardinfarktrisiko ($p<0,0001$; Takagi et al., 2002). Der Dimorphismus A22630T (Gln317Leu) wurde von Cole et al. (2003) genauer untersucht. In einem relativ begrenzten

Studienkollektiv (180 Patienten mit CVI und 172 Kontrollprobanden) konnte kein Zusammenhang zwischen diesem Dimorphismus und dem Risiko für einen CVI gefunden werden. Allerdings zeigte die Auswertung eine signifikante Interaktion zwischen dem 22630AA Genotypen und der arteriellen Hypertonie. Watson et al. (2006) entdeckten einen weiteren Dimorphismus in der ersten Ig-Domäne, bei dem es zu einem Aminosäureaustausch (Leu83Val) kam. Die klinische Relevanz dieses „Single Nucleotid Polymorphismus“ (SNP) ist jedoch noch nicht geklärt.

Diese Fälle legen die Vermutung nahe, dass nicht nur ein Polymorphismus des GPVI-Gens verantwortlich für das Risiko einer thrombembolischen Erkrankung sein kann, sondern dieses meist in Kombination mit anderen Risikofaktoren erhöht.

Von besonderer Bedeutung sind dabei die Polymorphismen im Promotor des Gens. Wie auch schon bei anderen Glykoproteinen gezeigt werden konnte, wird eine Mutation im Promotor mit einer Veränderung der Genexpression auf der Thrombozytenoberfläche in Verbindung gebracht. So wurden im GPIa-IIa zwei stumme Mutationen, C-52T und C-92G, in der Promotorregion gefunden, die unabhängig voneinander die Transkriptionsrate des Rezeptors vermindern. Eine Kombination beider Allele G-92/T-52 beeinflussten sich gegenseitig negativ (Kunicki, 2001; Holmes et al., 2002; Furihata et al., 2002). Auch im GPIb-V-IX wurde ein Dimorphismus in der Promotorregion gefunden (-5C/T) der die Expression des Rezeptors auf Thrombozyten beeinflussen und damit die Thrombosegefahr erhöhen bzw. erniedrigen sollte (Furihata et al., 2002). Wir stellten somit die Hypothese auf, dass auch der von Croft et al. (2001) beschriebene Dimorphismus C-154T in der Promotorregion des GPVI Einfluss auf die GPVI-Dichte auf der Thrombozytenoberfläche nehmen kann.

Auch Best et al. (2003) und Furihata et al. (2001) nahmen an, dass bestimmte Mutationen mit einer verstärkten Expressionsdichte des GPVI auf der Thrombozytenoberfläche einhergehen und damit eine große Rolle bei thrombotischen Erkrankungen spielen. Die Ursache der unterschiedlich hohen Expressionsrate von GPVI wird immer wieder in der Promotorregion gesucht. Jedoch gibt es in der Literatur konträre Auffassungen hinsichtlich der Bedeutung der Promotorregion. Holmes et al. (2002) untersuchten diese Region und fanden,

dass Mutationen in einem der drei Regulatorregionen (GATA, Ets und Sp1) zu einer verminderten Expression von GPVI auf der Thrombozytenoberfläche führte. Kanaji et al. (2005) zeigten, dass diese Regulatorregionen nicht ausreichen, um die Transkription des GPVI in der Megakaryozytendifferenzierung einzuleiten. Zusätzlich sei noch Thrombopoetin (TPO) notwendig, das die Demethylierung der CG-Sequenz in der Promotorregion initiiert und damit zur Expression des GPVI führt. Auch Best et al. (2003) untersuchten die Promotorregion des GPVI genauer und fanden dort den in dieser Arbeit untersuchten Polymorphismus (C-154T). Sie konnten allerdings keinen Zusammenhang zwischen diesem Polymorphismus und einer unterschiedlichen Expressionsrate dieses Rezeptors feststellen. Eine verstärkte Expression der GPVI wurde unabhängig vom Genotypen bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ II gefunden (Cabeza et al., 2004). Damit scheint das GPVI auch eine wichtige Rolle in der Pathogenese der diabetischen Mikro- und Makroangiopathie zu spielen. Zusätzlich führt das GPVI zu einer Ausschüttung von einem TNF-ähnlichen Zytokin (CD40L), welches die Atherosklerose und Plaquebildung durch Aktivierung der Endothelzellen beschleunigt.

4.2.1 Der C-154T Genpolymorphismus und die koronare Herzkrankheit

In der vorliegenden Arbeit wurde auch der von Croft et al. (2001) bereits beschriebene Dimorphismus C-154T auf einen Zusammenhang mit KHK bzw. Myokardinfarkt hin untersucht. Dazu wurde der GPVI-Genotyp der Patienten- und der Kontrollgruppe mittels sequenzspezifischer Polymerasekettenreaktion (PCR-SSP) ermittelt. Dabei zeigte es sich, dass 307 Probanden CC-homozygot (21,5%), 734 CT-heterozygot (51,4%) und 388 Probanden TT-homozygot (21,5%) waren (vgl. 3.3, S. 49-51). Die drei verschiedenen Genotypen wurden dann jeweils auf ihren Zusammenhang mit den etablierten koronaren Risikofaktoren untersucht. Dabei war keiner der untersuchten Risikofaktoren signifikant mit einem bestimmten C-154T-Genotypen verbunden. Lediglich Individuen mit dem CT-Genotyp hatten einen niedrigeren ApoAI-Werte im Vergleich zu denjenigen mit dem CC- oder TT-Genotypen, wobei ein erniedrigtes ApoAI atherogen wirkt. Ein ähnliches Ergebnis konnte in der Literatur nicht gefunden werden.

Die in der Literatur beschriebenen Unterschiede in der Dichte von GPVI auf der Thrombozytenoberfläche (Best et al, 2003; Furihata et al, 2001) untersuchten wir mittels Durchflußzytometrie und Immunoblot. In der Durchflußzytometrie hatten wir

sehr große Streuungen der Fluoreszenzintensitäten bei den einzelnen Genotypen, so dass keine statistische Auswertung möglich war (vgl. 3.4, S. 51-54). Auch im Immunoblot zeigten sich keine eindeutigen Unterschiede in der Expressionsdichte des GPVI (vgl. 3.4, S. 51-54). Wir führten diese Untersuchung mit unterschiedlichen Konzentrationen des GPVI-Antikörpers durch. Aber auch das führte weder bei geringen noch bei höheren Konzentrationen zu einem Unterschied in der Expressionsdichte. Es sei darauf hingewiesen, dass diese Untersuchungen nur bei neun Individuen durchgeführt wurden. Um unsere Ergebnisse zu überprüfen, müsste man die Untersuchung an einem größeren Kollektiv durchführen. Bigalke et al. (2006) fanden unabhängig von GPVI-Polymorphismen einen Unterschied in der Expressionsdichte auf der Thrombozytenoberfläche. Durch Aktivierung der Thrombozyten im Rahmen eines thrombotischen Geschehens kommt es zur verstärkten Expression des GPVI. Die könnte auch eine Erklärung für den fehlenden Unterschied in der Expressionsdichte in dieser Studie sein. Die hier untersuchten Thrombozyten lagen im Ruhezustand vor, d.h. sie waren nicht aktiviert und zeigten vielleicht deshalb ähnliche Expressionen. Weitere Untersuchungen mit aktivierten und nicht-aktivierten Thrombozyten müssten dieser Hypothese nachgehen.

Der C-154T-Dimorphismus zeigte somit in der vorliegenden Arbeit weder mit dem Risiko für eine KHK bzw. einen MI, noch mit dem KHK-Schweregrad der KHK eine signifikante Assoziation (vgl. 3.5, S. 54-58). Auch das Alter beim Erleiden des 1. Myokardinfarkte zeigte keinen Genotyp abhängigen Unterschied (vgl. 3.5.3, S. 57-58).

4.3 Die klinische Bedeutung des Glykoproteins VI

Auch wenn wir keinen Zusammenhang zwischen dem GPVI C-154T-Polymorphismus und dem Risiko für die KHK bzw. den MI nachweisen konnten, darf man die Rolle des GPVI in der Thrombusformierung nicht unterschätzen. Man sollte zudem bei der Betrachtung dieser Thematik nicht außer acht lassen, dass bei der Thrombozytenanlagerung an Kollagen nicht nur GPVI, sondern auch andere Rezeptoren wie GPIa-IIa, vWF, GPIb-V-IX etc. eine Rolle spielen, die möglicherweise auch das Fehlen von GPVI kompensieren können (Joutsikorhonen, 2003; Snell et al., 2002). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch

Kuijpers et al. (2004). Sie zeigten, dass GPIb und GPIIb-IIIa besonders bei Abwesenheit des GPVI die Freilegung der Phosphatidylserine (PS) bei hoher Scherkraft verstärken. Damit können auch diese beiden Glykoproteine die Thrombusformierung aktivieren. Jarvis et al. (2004) konnten nachweisen, dass es auch unabhängig von GPVI-FcR γ -Komplex zu einer Phosphorylierung kommt, die zusammen mit Thromboxan die Ausschüttung von ADP vermittelt und damit die Aggregation und Aktivierung der Thrombozyten einleitet. Voraussetzung ist dabei jedoch das Vorhandensein des GPIa-IIa. Chen et al. (2002) sahen einen möglichen Zusammenhang zwischen der Expressionsrate der Kollagenrezeptoren GPVI und Ia-IIa. Bei erhöhter Dichte des GPVI auf der Thrombozytenoberfläche spielte GPIa-IIa eine untergeordnete Rolle bei der Adhäsion und Aktivierung der Thrombozyten. War dagegen GPVI reduziert, wurde GPIa-IIa zur normalen Thrombozytenfunktion benötigt. Bei Reduktion oder Fehlen beider Rezeptoren konnte es zu einer ungenügenden Adhäsion der Thrombozyten an Kollagen kommen. Auch Furihata et al. (2002) entdeckten einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Dichte des GPIa-IIa auf der Thrombozytenoberfläche und der GPVI-Expressionsrate. Damit stellten sie die Hypothese auf, dass die genetisch regulierte Expression des GPIa-IIa die unterschiedliche GPVI-Dichte bedingt. Best et al. (2003) sind der Meinung, dass eine verminderte Rezeptordichte erst an Gewicht bekommt, wenn auch andere Hämostase-Faktoren pathologisch verändert sind. Zudem können auch die angesprochenen Risikofaktoren die Neigung zu einer Atherosklerose noch verstärken (Carr und Brunzell, 2004; Homma, 2004). Auch die genetische Varianz der übrigen Glykoproteine, die an der Thrombozytenaktivierung beteiligt sind, ist in Betracht zu ziehen (Furihata et al., 2002; Best et al., 2003; Cole et al., 2003; Siljander et al., 2004).

Des Weiteren ist zu beachten, dass wir in dieser Studie nur einen der bisher gefundenen Polymorphismen im GPVI-Gen untersucht haben. Es ist gut möglich, dass neben dem C-154T-Dimorphismus noch weitere Mutationen für den Unterschied in der Expressionsrate des GPVI auf Thrombozyten mitverantwortlich sind.

Die klinische Bedeutung dieser Studien beruht auf der Erkenntnis einer möglichen neuen antithrombotischen Therapie. Antagonisten gegen GPIIb-IIIa (Clopidogrel,

Ticlopidin) sind in der heutigen Medizin schon etablierte antithrombotische Therapieansätze. Während GPIIb-IIIa Fibrinogen bindet und damit am Ende der Thrombusformierung in das Geschehen eingreift, spielt GPVI schon eine Rolle beim ersten Kontakt zwischen Thrombozyten und Kollagen, wodurch es zu einer Thrombusaktivierung kommt. Ein weiterer Vorteil wäre, dass die Expression von GPVI auf Thrombozyten und Megakaryozyten limitiert ist (Jandrot-Perrus et al., 2000; Smethurst et al., 2004). Die Hemmung der GPVI-Aktivierung durch einen Antagonisten könnte damit also auch eine Alternative in der antithrombotischen Therapie spielen (Moroi und Jung, 2004). So konnte bei einem Versuch an Mäusen durch Gabe eines anti-GPVI Antikörpers die Bildung eines tödlichen Thrombus verhindert werden (Holmes et al., 2002). Besonders interessant erscheint dabei die Tatsache, dass der Mangel oder die Antagonisierung des GPVI nur ein geringes Blutungsrisiko mit sich bringt, aber dennoch die Kollagen-induzierte Aggregation fehlt, so dass keine Thromben an der verletzten Gefäßwand entstehen können (Grüner et al., 2005). Auch Lecut et al. (2004) konnten zeigen, dass die Blockade von GPVI zwar zu einer verminderten Aggregation der Thrombozyten führte, aber die Adhäsion an Kollagen nicht verhindern konnte. Erst bei zusätzlicher Hemmung von Thromboxan/ADP (z.B. durch die Gabe von Aspirin) konnte die Thrombozytenadhäsion vermindert werden (Grüner et al., 2004). Wenn neben dem GPVI auch noch andere Faktoren, wie z.B. das GPIa-IIa, GPIIb-IIIa (Einnahme von Clopidogrel) oder Thromboxan A₂ (Einnahme von Aspirin), die für die Hämostase wichtig sind, vermindert oder funktionslos sind, könnte es zu unkontrollierbaren Blutungen kommen (Grüner et al., 2004). Weiterhin gibt es Hinweise dafür, dass der GPVI-Antikörper zu einer irreversiblen Down-Regulation des Rezeptors auf der Thrombozytenoberfläche führen kann, was einen antithrombotischen Langzeitschutz darstellen könnte (Boylan et al., 2004). In einer weiteren Studie mit dem spezifischen GPVI-Antikörper JAQ1 kam es bei Mäusen (in vivo) zu einem vollständigen Verlust des funktionsfähigen GPVI auf der Thrombozytenoberfläche (Nieswandt et al., 2001). Folglich waren die Mäuse für mindestens zwei Wochen vor thrombembolischen Erkrankungen geschützt, hatten aber dennoch nur ein geringes Blutungsrisiko. Zu dem gleichen Ergebnis kamen auch Gardiner et al. (2004), die bei erneuten Untersuchungen an Mäusen durch Gabe von JAQ1 einen Verlust des GPVI auf der Thrombozytenoberfläche feststellten. Lecut et al. (2003) beschrieben einen

spezifischen monoklonalen Antikörper gegen GPVI (9012.2 Fabs), der die GPVI-Kollagen-Interaktion und damit die Thrombozytenaggregation, die Sekretion der α -Granula und der Tyrosin-Phosphorylierung verhinderte. Zudem hemmt er die prokoagulierende Fähigkeit des GPVI durch Exposition von Phosphatidylserinen (PS), wodurch die Prothrombinaseaktivität herabgesetzt wird (Kuijpers et al., 2003). Auch die neointimale Hyperplasie, die auf eine Gefäßwandverletzung folgt, kann durch eine Abschwächung der GPVI-Funktion verhindert werden (Lecut et al., 2003). Diese Befunde wurden jedoch bisher nur in vitro erhoben.

Neben der direkten Hemmung der Thrombusformierung durch GPVI-Antikörper, wurde auch die Wirkung eines kompetitiven Antagonisten des löslichen GPVI-Fc-Dimers untersucht. Dabei zeigte sich, dass es durch die Gabe des direkten Antiköpers zu einer kompletten Hemmung der Adhäsion und der Thrombusbildung und damit zu einem Schutz vor thrombembolischen Ereignissen mit nur geringgradig erhöhter Blutungsneigung kam. Dagegen zeigte die Gabe des löslichen GPVI zwar auch eine begrenzte antithrombotischen Wirkung, jedoch benötigte man in vivo eine unphysiologisch hohe Dosis von 2mg/kg Körpergewicht, um diese Wirkung zu erzielen (Grüner et al., 2005).

Gardiner et al. (2004) beschrieben eine proteolytische Spaltung des GPVI von der Thrombozytenoberfläche durch Metalloproteinasen nach Kontakt mit Agonisten wie Kollagen, Collagen-related-peptides (C-R-P) und Convulxin. Diesen Vorgang ist als autokriner Mechanismus zur Regulation der Rezeptoraktivität anzusehen. Der Verlust des GPVI konnte aber durch die Bindung von Calmodulin an die zytoplasmatische Kette des GPVI verhindert werden. Bei Gabe eines Calmodulin-Inhibitors wurde auch bei Abwesenheit der Agonisten die Metalloprotease-abhängige Ablösung des GPVI induziert. Die Blockierung der Calmodulin-Bindungsstelle könnte also ein weiterer Ansatzpunkt für eine antithrombotische Therapie sein. Stephens et al. (2005) konnten nachweisen, dass sowohl Agonisten als auch GPVI-spezifische Antagonisten zur Abspaltung des GPVI von der Thrombozytenoberfläche und damit zur Entwicklung eines löslichen GPVI (mit der Molekülmasse von ca. 55 kDa) führen können. Die Thrombozyten mit verringerter Dichte an GPVI reagierten daraufhin schwächer auf Kollagen. Sie betonen dabei die Rolle der Metalloproteinasen in der Rezeptorregulation und damit in der Pathogenese von Thrombosen.

Da die Thrombozytenaktivierung durch Kollagen auf die spezifische Erkennung der Gly-Pro-Hyp-Sequenz durch GPVI beruht, könnte auch diese Sequenz ein Ansatzpunkt für eine antithrombotische Therapie sein, um Thrombosen im Zusammenhang mit Plaqueruptur zu vermeiden (Knight et al, 1999).

Insgesamt lässt sich sagen, dass die Funktion und das Zusammenwirken der verschiedenen Oberflächenrezeptoren auf Thrombozyten noch nicht ganz geklärt sind. Zwar ist man in den vergangenen Jahren zu einem besseren Verständnis der Abläufe der Hämostase gekommen, trotzdem fehlt durch die vielen Faktoren, die darauf Einfluss nehmen, die Kenntnis über das genaue Zusammenspiel aller Komponenten. GPVI ist in letzter Zeit immer mehr in den Vordergrund gerückt worden. Es scheint, dass eine Blockierung dieses Rezeptors ähnlich wie die des GPIIb-IIIa ein wichtiger Bestandteil der antithrombotischen Therapie werden könnte. Da Kollagen der am stärksten thrombogen wirkende Bestandteil der Gefäßwand ist, könnte eine selektive Blockade der Kollagen-induzierten Aktivierung von Thrombozyten (über z.B. GPVI) eine sehr gute Möglichkeit der antithrombotischen Wirkung sein. Damit würde die Bildung von Thrombosen verhindert, dennoch die normale Funktion der Thrombozyten aufrechterhalten werden. Auch könnte man sich vorstellen, dass GPVI als möglicher Screeningfaktor für ein erhöhtes Risiko für thrombembolische Erkrankungen bei bestimmten Subpopulationen eingesetzt werden könnte (Bigalke et al., 2006). So konnte gezeigt werden, dass die GPVI-Expression auf den Thrombozyten bei Patienten mit einem akuten koronaren Herzsyndrom im Vergleich zu Patienten mit einer stabilen Angina pectoris deutlich erhöht war. Die Messung der GPVI-Dichte auf der Thrombozytenoberfläche könnte damit, noch bevor die Herzenzyme Troponin I und Kreatinkinase (CK-MB) ansteigen, auf eine beginnende Myokardischämie hindeuten.

5. Literaturverzeichnis

1. Altruda F., Cervella P., Tarone G., Balzac F., Stefanuto G., Silengo L: A human β_1 integrin subunit with a unique cytoplasmic domain generated by alternative RNA processing. *Gene* Vol 95: 261-266 (1990)
2. Andrews R.K., Shen Y., Gardiner E.E., Berndt M.C.: Platelet adhesion receptors and (patho)physiological thrombus formation (review). *Histol Histopathol* Vol 16: 969-980 (2001)
3. Atkinson B.T., Stafford M.J., Pears C.J., Watson S.P.: Signalling events underlying platelet aggregation induced by the glykoprotein VI agonist Convulxin. *Eur J Biochem* Vol 268: 5242-5248 (2001)
4. Barry F.A., Gibbins J.M.: Protein Kinase B is regulated in platelets by the collagen receptor Glykoprotein VI. *J Biol Chem* Vol 277, No 15: 12874-12878 (2002)
5. Berglund L, Ramakrishnan R.: Lipoprotein(a): an elusive cardiovascular risk factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* Vol 24, No 12: 2219-2226 (2004)
6. Berlanga O., Tulasne D., Bori T., Snell D.C., Miura Y., Jung S., Moroi M., Frampton J., Watson S.P.: The Fc receptor γ -chain is necessary and sufficient to initiate signalling through glykoprotein VI in transfected cells by the snake C-type lectin, convulxin. *Eur J Biochem* Vol 269: 2951-2960 (2002)
7. Best D., Senis Y.A., Jarvis G.E., Eagleton H.J., Roberts D.J., Saito T., Jung S.M., Moroi M., Harrison P., Green F.R., Watson S.P.: GPVI levels in platelets: relationship to platelet function at high shear. *Blood* Vol 102, No 8: 2811-2818 (2003)
8. Bigalke B., Lindeman S., Ehlers R., Seizer P., Daub K., Langer H., Schonberger T., Kremmer E., Siegel-Axel D., May A.E., Gawaz M.: Expression of platelet collagen receptor glykoprotein VI is associated with acute coronary syndrome. *Eur Heart J* Vol 27, No 18: 2165-2169 (2006)
9. Cabeza N., Zhongyan Li, Schulz C., Kremmer E., Massberg S., Bültmann A., Gawanz M.: Surface expression of collagen receptor Fc receptor- γ /Glycoprotein VI is enhanced on platelets in type 2 diabetes and mediates release of CD40 ligand and activation of endothelial cells. *Diabetes* Vol 53: 2117-2121 (2004)

10. Carlsson L.E., Santoso S., Spitzer C., Kessler C., Greinacher A.: The alpha2 gene coding sequence T807/A873 of the platelet collagen receptor integrin alpha2beta1 might be a genetic risk factor for the development of stroke in younger patients. *Blood* Vol 93, No 11: 3583-3586 (1999)
11. Carr M.C., Brunzell J.D.: Abdominal obesity and dyslipidemia in the metabolic syndrom: importance of the type 2 diabetes and familiar combined hyperlipidemia in coronary artery disease risk. *J Clin Endocrinol Metabol* Vol 89, No 6: 2601-2607 (2004)
12. Chen H., Locke D., Liu Y., Liu C., Kahn M.L.: The platelet receptor GP VI mediates both Adhesion and signaling responses to collagen in a receptor density-dependent fashion. *J Biol Chem* Vol 277, No 4: 3011-3019 (2002)
13. Chiba Y., Saitoh S., Takagi S., Ohnishi H., Katoh N., Ohata J., Nakagawa M., Shimamoto K.: Cardiovascular disease risk factors: The Tanno and Sobetsu study. *Hypertens Res* Vol 30: 229-236 (2007)
14. Clemetson K.J.: Platelet activation: signal transduction via membrane receptors. *Thromb and Haemost* Vol 74, No 1: 111 – 116 (1995)
15. Clemetson K.J.: Platelet receptors for adhesion and activation. Variability as a factor in susceptibility to cardiovascular diseases. *Ital Heart J* Vol 2, No 11: 816-818 (2001)
16. Clemetson J.M., Polgar J., Magnenat E., Wells T.N.C., Clemetson K.J.: The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to Fc α R and the natural killer receptors. *J Biol Chem* Vol 274, No 41: 29019-29024 (1999)
17. Cole V.J., Staton J.M., Eikelboom J.W., Hankey G.J., Yi Q., Shen Y., Berndt M.C., Baker R.I.: Collagen platelet receptor polymorphisms integrin $\alpha_2\beta_1$ C807T and GPVI Q317L and risk of ischemic stroke. *Thromb and Haemost* Vol 1: 963-970 (2003)
18. Corral J., Gonzales-Conejero R., Rivera J., Ortuno F., Aparicio P., Vicente V.: Role of the 807 C/T polymorphism of the alpha2 gene in platelet GP Ia collagen receptor expression and function-effect in thromboembolic disease. *Thromb Haemost* Vol 81, No 6: 951-956 (1999)
19. Croft S.A., Samani N.J., Teare M.D., Hampton K.K., Steeds R.P., Channer K.S., Daly M.E.: Novel platelet membrane glycoprotein VI dimporhism is a risk factor for Myocardial infarction. *Circulation* 104: 1459-1463 (2001)

20. Cruz, M.A., Chen J., Whitelock, J.L., Morales, L.D., López, J.A.: The platelet glycoprotein Ib-von Willebrand factor interaction activates the collagen receptor $\alpha_2\beta_1$ to bind collagen: activation-dependent conformational change of the α_2 -I domain. *Blood* Vol 105, No 5:1986-1991 (2005)
21. Deckmyn H., Chew S.L., Vermylen J.: Lack of platelet response to collagen associated with an autoantibody against glycoprotein Ia: a novel cause of acquired qualitative platelet dysfunction. *Thromb Haemost* Vol 64, No 1: 74-79 (1990)
22. Di Paola J., Federici A.B., Mannucci P.M., Canciani M.T., Kritzik M., Kunicki T.J., Nugent D.: Low platelet $\alpha_2\beta_1$ levels in type I von Willebrand disease correlate with impaired platelet function in a high shear stress system. *Blood* Vol 93, No 11: 3578-3582 (1999)
23. Ezumi Y., Kodama K., Uchiyama T., Takayama H.: Constitutive and functional association of the platelet collagen receptor glykoprotein VI-Fc receptor γ -chain complex with membrane rafts. *Blood* Vol 99, No 9: 3250-3256 (2002)
24. Füleßl H.S.: Laboratoriumsdiagnostik und Referenzbereiche, Innere Medizin, MLP Duale Reihe, 1. Auflage, Hippokrates Verlag, 1999.
25. Furihata K., Clemetson K.J., Deguchi H., Kunicki T.J.: Variation in human platelet glycoprotein VI content modulates glycoprotein VI-specific prothrombinase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* Vol 21: 1857-1863 (2001)
26. Furihata K., Kunicki T.J.: Characterization of glycoprotein VI gene 5' regulatory and promoter regions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* Vol 22: 1733-1739 (2002)
27. Furihata K., Nugent D.J., Kunicki T.J.: Influence of platelet collagen receptor polymorphism on risk of arterial thrombosis. *Arch Pathol Lab Med* Vol 126: 305-309 (2002)
28. Gardiner E.E., Arthur J.F., Kahn M.L., Berndt M.C., Andrews R.K.: Regulation of platelet membrane levels of glykoprotein VI by a platelet-derived metalloproteinase. *Blood* Vol 104, No 12: 3611-3617 (2004)
29. Gawaz, Meinrad: Das Blutplättchen. Georg Thieme Verlag (1999)

30. Gawaz M., Langer H, May A.E.: Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest* Vol 115: 3378-3384 (2005)
31. Gensini G.G.: A more meaningful scoring system for determining the severity of coronary heart disease. *Am J Cardiol* Vol 51, No 3: 606 (1983)
32. Gonzales-Conejero R., Lonzano M.L., Rivera J., Corral J., Iniesta J.A., Moraleda J.M., Vicente V.: Polymorphisms of platelet membrane glycoprotein Iba associated with arterial thrombotic disease. *Blood* Vol. 92, No 8: 2771-2776 (1998)
33. Goto S.: Understanding the mechanism of platelet thrombus formation under blood flow conditions and the effect of new antiplatelet agents. *Curr Vasc Pharmacol* Vol 2, No 1: 23-32 (2004)
34. Goto S.: Understanding the mechanism and prevention of arterial occlusive thrombus formation by anti-platelet agents. *Curr Med Chem Cardiovasc Heamtol Agents* Vol 2, No 2: 149-156 (2004)
35. Goto S., Tamura N., Handa S., Arai M., Kodama K., Takayama H.: Involvement of glycoprotein VI in platelet thrombus formation on both collagen and von Willebrand factor surfaces under flow conditions. *Circulation* Vol 106, No 2: 266-72 (2002)
36. Grüner S., Prostedna M., Aktas B., Moers A., Schulte V., Krieg T., Offermanns S., Eckes B., Nieswandt B.: Anti-Glykoprotein VI treatment severely compromise hemostasis in mice with reduced $\alpha_2\beta_1$ levels or concomitant aspirin therapy. *Circulation* Vol 110: 2946-2951 (2004)
37. Grüner S., Prostedna M., Koch M., Miura Y., Schulte V., Jung S.M., Moroi M., Nieswandt B.: Relative antithrombotic effect of soluble GPVI dimer compared with anti-GPVI antibodies in mice. *Blood* Vol 105, No 4: 1492-1499 (2005)
38. Gumina R.J., Kirschbaum N.E., Piotrowski K., Newman P.J.: Characterization of the human platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 promoter (PECAM-1): Identification of a GATA-2 binding element required for optimal transcriptional activity. *Blood* Vol 89, No 4: 1260-1269 (1997)
39. Hausmann D., Mügge A., Daniel W.G. Thiemes Innere Medizin, TIM, 1. Auflage, 1999
40. Holmes M.L., Bartle N., Eisbacher M., Chong B.H.: Cloning and analysis of the thrombopoietin-induced megacaryocyte-specific glycoprotein VI

- promoter and its regulation by GATA-1, Fli-1, and Sp1. *J Biol Chem* Vol 277, No 50: 48333-48341 (2002)
41. Holtkötter O., Nieswandt B., Smyth N., Müller W., Hafner M., Schulte V., Krieg T., Eckes B.: Integrin α_2 – deficient mice develop normally, are fertile but display partially defective platelet interaction with collagen. *J Biol Chem* Vol 277, No 17: 10789-10794 (2002)
 42. Homma Y.: Predictors of atherosclerosis. *J Atheroscl Thromb* Vol 11, No 5: 265-270 (2004)
 43. Ichinohe T., Takayama H., Ezumi Y., Yanagi S., Yamamura H., Okuma M.: Cyclic AMP – Insensitive activation of c-Src and syk protein – tyrosine – kinases through platelet membrane glycoprotein VI. *J Biol Chem* Vol 270, No 47: 28029-28036 (1995)
 44. Ichinohe T., Takayama H., Ezumi Y., Arai M., Yamamoto H., Takahashi H., Okuma M.: Collagen-stimulated activation of syk but not c-src is severely compromised in human platelets lacking membrane glycoprotein VI. *J Biol Chem* Vol 272, No 1: 63-68 (1999)
 45. Inoue K., Ozaki Y., Satoh K. Wu Y., Yatomi Y., Shin Y., Morita T.: Signal transduction pathways mediated by glycoprotein Ia/IIa in human platelets: comparison with those of glycoprotein VI. *Biochem and Biophys Research Commun* Vol 256: 114-120 (1999)
 46. Ishibashi T., Ichinohe T., Sugiyama T., Takayama H., Titani K., Okuma M.: Functional significance of platelet membrane glycoprotein p62 (GPVI), a putative collagen receptor. *Int J Hematol* Vol 62 No 2: 107-115 (1995)
 47. Jandrot-Perrus M., Busfield S., Lagrue A-H., Xiong X., Debili N., Chickering T., Le Couedic J-P., Goodearl A., Dussault B., Fraser C., Vainchenker W., Villeval J-L.: Cloning, characterization, and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the immunoglobulin superfamily. *Blood* Vol 96, No 5: 1798-1807 (2000)
 48. Jarvis G.E., Best D., Watson S.P.: Glycoprotein VI/Fc receptor γ chain-independent tyrosine phosphorylation and activation of murine platelets by collagen. *Biochem J* Vol 383: 581-588 (2004)
 49. Joutsu-Korhonen L., Smethurst P.A., Rankin A., Gray E., Ijsseldijk M., Onley C.M., Watkins N.A., Williamson L.M., Goodall A.H., de Groot P.G., Farndale R.W., Ouwehand W.H.: The low-frequency allele of the platelet collagen

- signaling receptor glycoprotein VI is associated with reduced functional responses and expression. *Blood* Vol 101, No 11: 4372-4379 (2003)
50. Kanaji S., Kanaji T., Jacquelin B., Chang M., Nugent D.J., Komatsu N., Moroi M., Izuhara K., Kunicki T.J.: Thrombopoietin initiates demethylation-based transcription of GP6 during megakaryocyte differentiation. *Blood* Vol 105, No 10: 3888-3892 (2005)
 51. Karlson P., Doenecke D., Koolmann J.: *Kurzes Lehrbuch der Biochemie. Thieme-Verlag, 14. Auflage, 1994*
 52. Kato K., Kanaji T., Russell S., Kunicki T.J., Furihata K., Kanaji S., Marchese P., Reininger A., Ruggeri Z.M., Ware J.: The contribution of glycoprotein VI to stable platelet adhesion and thrombus formation illustrated by targeted gene deletion. *Blood* Vol 102, No 5: 1701-1707 (2003)
 53. Kehrel B. Ph.D.: Platelet-Collagen Interactions. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* Vol 21, No 2: 123-129 (1995)
 54. Kehrel B., Wierwille S., Clemetson K.J., Anders O., Steiner M., Knight C.G., Farndale R.W., Okuma M., Barnes M.J.: Glycoprotein VI is a major collagen receptor for platelet activation: it recognizes the platelet-activating quaternary structure of collagen, whereas CD36, glycoprotein IIb-IIIa, and von Willebrand factor do not. *Blood* Vol 91, No 2: 491-499 (1998)
 55. Knight C.G., Morton L.F., Onley D.J., Peachey A.R., Ichinohe T., Okuma M., Farndale R.W., Barnes M.J.: Collagen-platelet interaction: Gly-Pro-Hyp is uniquely specific for platelet Gp VI and mediates platelet activation by collagen. *Cardiovasc Res* Vol 41, No 2: 450-457 (1999)
 56. Köster R., Stern H., Hamm C.: *Kardiologie aus Innere Medizin / Duale Reihe (Hippokrates Verlag Stuttgart, 1. Auflage, 1999)*
 57. Kritzik M., Savage B., Nugent D.J., Santoso S., Ruggeri Z.M., Kunicki T.J.: Nucleotide polymorphisms in the alpha2 gene define multiple alleles that are associated with differences in platelet alpha2 beta1 density. *Blood* Vol 92, No 7: 2382-2388 (1998)
 58. Kroll H., Gardemann A., Fechter A., Haberbosch W., Santoso S.: The impact of the glycoprotein Ia collagen receptor subunit A1648G gene polymorphism on coronary artery disease and acute myocardial infarction. *Thromb Haemost* Vol 83 No 3: 392-396 (2000)

59. Kuijpers M.J.E., Schulte V., Bergmeier W., Lindhout T., Brakebusch C., Offermanns S., Fässler R., Heemskerk J.W.M., Nieswandt B.: Complementary roles of glycoprotein VI and $\alpha_2\beta_1$ integrin in collagen-induced thrombus formation in flowing whole blood ex vivo. *FASEB J* Vol 17: 685-687 (2003)
60. Kuijpers M.J.E., Schulte V., Oury C., Lindhout T., Broers J., Hoylaerts M.F., Nieswandt B., Heemskerk J.W.M.: Facilitating roles of murine platelet glycoprotein Ib and $\alpha\text{IIb}\beta_3$ in phosphatidylserine exposure during vWF-collagen-induced thrombus formation. *J Physiol* Vol 558 No 2: 403-415 (2004)
61. Kunicki T.J., PhD: The role of platelet Collagen receptor (glycoprotein Ia/IIa; integrin $\alpha_2\beta_1$) polymorphisms in thrombotic disease. *Curr Opin in Hem* Vol 8: 277-285 (2001)
62. Lecut C., Feeney L.A., Kingsbury G., Hopkins J., Lanza F., Gachet C., Villeval J.-L., Jandrut-Perrus M.: Human platelet glycoprotein VI function is antagonized by monoclonal antibody-derived Fab fragments. *J Thromb Haemost* Vol 1: 2653-2662 (2003)
63. Lecut C., Schoolmeester A., Kuijpers M., Broers J., van Zandvoort M., Vanhoorelbeke K., Deckmyn H., Jandrot-Perrus M., Heemskerk J.: Principal role of Glycoprotein VI in $\alpha_2\beta_1$ and $\alpha\text{IIb}\beta_3$ activation during collagen-induced thrombus formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* Vol 24 No 9: 1727-1733 (2004)
64. Li T.-T., Larrucea S., Souza S., Leal S.M., López J.A., Rubin E.M., Nieswandt B., Bray P.F.: Genetic variation responsible for mouse strain differences in integrin α_2 expression is associated with altered platelet responses to collagen. *Blood* Vol 103, No 9: 3396-3401 (2004)
65. Libby P.: The pathogenesis of atherosclerosis, Harisson's Principles of Internal Medicine, McGraw Hill, 15th Edition, 2001.
66. Libby P., Theroux P.: Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation*, Vol 111, No 25: 3481-3488 (2005)
67. Locke D., Liu C., Peng X., Chen H., Kahn M.L.: Fc γ -independent signaling by the platelet collagen receptor glycoprotein VI. *J Biol Chem* Vol 278, No 17: 15441-15448 (2003)

68. Marcus A.J., Safier L.B.: Thromboregulation: multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. *FASEB J* Vol 7: 516-522, 1993
69. Marwick T.H.: Diabetic heart disease. *Heart* Vol 92, No 3: 296-300 (2005)
70. Massberg S., Gawaz M., Grüner S., Schulte V., Konrad I., Zohlnhofer D., Heinzmann U., Nieswandt B.: A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *J Exp Med* Vol 197, No 1:41-49 (2003)
71. Massberg S., Konrad I., Bültmann A., Schulz C., Münch G., Peluso M., Lorenz M., Schneider S., Besta F., Müller I., Bin Hu, Langer H., Kremer E., Rudelius M., Heinzmann U., Ungerer M., Gawaz M.: Soluble glycoprotein VI dimer inhibits platelet adhesion and aggregation to the injured vessel wall in vivo. *FASB J* Vol 18: 397-399 (2004)
72. Matsubara Y., Nurata M., Maruyama T., Handa M., Yamagata N., Watanabe G., Saruta T., Ikeda Y.: Association between diabetic retinopathy and genetic variations in alpha2beta1 integrin, a platelet receptor for collagen. *Blood* Vol 95, No 5: 1560-1564 (2000)
73. Meredith P.A., Östergren J.: From hypertension to heart failure – are there better primary prevention strategies? Review *J RAAS* Vol 7: 64-73 (2006)
74. Mertens A, Holvoet P.: Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *FASEB J* Vol 15, No 12: 2073-2084 (2001)
75. Miura Y., Ohnuma M., Jung S.M., Moroi M.: Cloning and expression of the platelet-specific collagen receptor glycoprotein VI. *Thrombosis Research* Vol 98: 301-309 (2000)
76. Miura Y., Takahashi T., Jung S.M., Moroi M.: Analysis of the interaction of platelet collagen receptor glycoprotein Vi (GP VI) with collagen. *J Biol Chem* Vol 277, No 48: 46197-46204 (2002)
77. Moroi M., Jung S.M., Okuma M., Shinmyozu K.: A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion. *J Clin Invest* Vol 84: 1440-1445 (1989)
78. Moroi M., Jung S.M., Shinmyozu K., Tomiyama Y., Ordinas A., Diaz – Ricart M.: Analysis of platelet adhesion to a collagen – coated surface under flow conditions: the involvement of glycoprotein VI in the platelet adhesion. *Blood* Vol 88, No 6: 2081-2092 (1996)

79. Moroi M., Kung S.M.: Platelet Glycoprotein VI: its structure and function. *Thrombosis Research* Vol 114, No 4: 221-233 (2004)
80. Nabel E.G.: Cardiovascular disease, review article. *NEJM* Vol 349, No 1: 60-72, 2003
81. Nakamura T., Kambayashi J., Okuma M., Tandon N.N.: Activation of the GP IIb-IIIa Complex induced by platelet adhesion to collagen is mediated by both $\alpha_2\beta_1$ integrin and GP VI. *J Biol Chem* Vol 274, No 17: 11897-11903 (1999)
82. Nieswandt B., Bergmeier W., Schulte V. Rackebrandt K., Gessner J.E., Zirngibl H.: Expression and function of the mouse collagen receptor glycoprotein Vi is strictly dependent on its association with the FcR γ chain. *J Biol Chem* Vol 275, No 31: 23998-24002 (2000)
83. Nieswandt B., Schulte V., Bergmeier W., Mokhtari-Nejad R., Rackebrandt K., Cazenave J-P., Ohlmann P., Gachet C., Zirngibel H.: Long-term antithrombotic protection by in vivo depletion of platelet glycoprotein VI in mice. *J Exp Med* Vol 193, No 4: 459-469 (2001)
84. Nieswandt B., Watson S.P.: Platelet-collagen interaction: is glycoprotein VI the central receptor? *Blood*, Vol 102, No 2, 449-461 (2003)
85. Nurden P., Jandrot-Perrus M., Combrié R., Winckler J., Arocas V., Lecut C., Pasquet J-M., Kunicki T.J., Nurden A.T.: Severe deficiency of glycoprotein VI on a patient with gray platelet syndrom. *Blood* Vol 104, No 1: 107-114 (2004)
86. Ollikainen E., Mikkelsen J., Perola M., Penttilä A., Karhunen P.J.: Platelet membrane collagen receptor glycoprotein VI polymorphism is associated with coronary thrombosis and fatal myocardial infarction in middle-aged men. *Atherosclerosis* Vol 176, No 1: 95-99 (2004)
87. Pasquet J-M., Quek L., Pasquet S., Poole A., Matthews J.R., Lowell C., Watson S.P.: Evidence of a role for SHP-1 in platelet activation by the collagen receptor glykoprotein VI *Jour Biol Chem* Vol 275, No 37, 28526-28531 (2000)
88. Quinton T.M., Ozdener F., Dangelmaier C., Daniel J.L., Kunapuli S.P.: Glycoprotein VI -mediated platelet fibrinogen activation occurs through calcium – sensitive and PKC – sensitive pathways without a requirement of secreted ADP. *Blood* Vol 99, No 9: 3228-3234 (2002)

89. Rhoads A.R., Friedberg F.: Sequence motifs for calmodulin recognition. *FASEB J* Vol 11, No 5: 331-340 (1997)
90. Rose G.A.: The diagnosis of ischaemic heart pain and intermittent claudication in field surveys. *Bull World Health Organ.* Vol 27: 645-658 (1962)
91. Sabri S., Jandrot-Perrus M., Bertoglio J., Farndale R.W., Mansat-De Mas V., Debili N., Vainchenker W.: Differential regulation of actin stress fibre assembly and proplatelet formation by $\alpha 2\beta 1$ integrin and GPVI in human megakaryocytes. *Blood* Vol 104, No 10: 3117-3125 (2004)
92. Santoro S.A.: Platelet surface collagen receptor polymorphisms: variable receptor expression and thrombotic/hemorrhagic risk. *Blood* Vol 93, No 11: 3575-3577 (1999)
93. Santoro S.A., Zutter M.M.: The alpha 2 beta 1 integrin: a collagen receptor on platelets and other cells. *Thromb Haemost* Vol 74, No 3: 813-821 (1995)
94. Santoso S., Kalb R., Walka M., Kiefel V., Mueller-Eckhard C., Newman P.J.: The human platelet allo-antigens Br(a) and Brb are associated with single amino acid polymorphism on glycoprotein Ia (integrin subunit alpha 2). *J Clin Invest.* Vol 92, No 5: 2427-2432 (1993)
95. Santoso S., Kunicki T.J., Kroll H., Haberbosch W., Gardemann A.: Association of the platelet glycoprotein Ia C₈₀₇T gene polymorphism with nonfatal myocardial infarction in younger patients. *Blood*, Vol 93, No 8: 2449-2453 (1999)
96. Santoso S., Kunicki T.J.: Platelet receptor polymorphisms and thrombotic risk. *Ital Heart J* Vol 2, No 11: 811-815 (2001)
97. Scheuner M.T.: Genetic predisposition to coronary artery disease. *Curr Opin Cardiol* Vol 16, No 4: 251-260 (2001)
98. Schulte V., Rabie T., Prostedna M., Aktas B., Grüner S., Nieswandt B.: Targeting of the collagen-binding site on glycoprotein VI is not essential for in vivo depletion of the receptor. *Blood* Vol 101, No 10: 3948-52 (2003)
99. Schunkert H.: Obesity and target organ damage: the heart. *Int J Obes* Vol 26, No 4: 15-20 (2002)
100. Shebuski R.J., Kilgore K.S.: Role of inflammatory mediators in thrombogenesis. *JPET* Vol 300, No 3: 729-735 (2002)

101. Siljander P.R.-M., Munnix I.C.A., Smethurst P.A., Deckmyn H., Lindhout T., Ouwehand W.H., Farndale R.W., Heemskerk J.W.M.: Platelet receptor interplay regulates collagen-induced thrombus-formation in flowing human blood. *Blood* Vol 3, No 4: 1333-1341 (2004)
102. Sixma J.J., van Zanten G.H., Huizinga E.G., van der Plas R.M., Verkley M., Wu Y-P., Gros P., de Groot P.G.: Platelet adhesion to collagen: an update *Thromb and Haemost* Vol 78, No 1: 434-438 (1997)
103. Smethurst P.A., Joutsu-Korhonen L., O'Connor M.N., Wilson E., Jennings N.S., Garner S.F., Zhang Y., Knight C.G., Knight C.G., Dafforn T.R., Buckle A., Ijsseldijk M.J.W., de Groot P.G., Watkins N.A., Farndale R.W., Ouwehand W.H.: Identification of the primary collagen-binding surface on human glycoprotein VI by site-directed mutagenesis and by blocking phage antibody. *Blood* Vol 103, No 3: 903-911 (2004)
104. Snell D.C., Schulte V., Jarvis G.E., Arase K., Sakurai D., Saito T., Watson S.P., Nieswandt B.: Differential effect of reduced glycoprotein VI levels on activation of murine platelets by glycoprotein VI ligands. *Biochem J* Vol 368: 293-300 (2002)
105. Stephens G., Yan Y., Jandrot-Perrus M., Villeval J.-L., Clemetson K.J., Philips D.R.: Platelet activation induces metalloproteinase-dependent GPVI cleavage to down-regulate platelet reactivity to collagen. *Blood* Vol 105, No 1: 186-191 (2005)
106. Sugiyama T., Okuma M., Ushikubi F., Sensaki S., Kanaji K., Uchino H.: A novel platelet aggregating factor found in a patient with defective collagen-induced platelet aggregation and autoimmune thrombocytopenia. *Blood* Vol 69, No 6: 1712-1720 (1987)
107. Suzuki H., Murasaki K., Kodama K., Takayama H.: Intracellular localization of glycoprotein VI in human platelets and its surface expression upon activation. *Br J Haematol* Vol 121: 904-912 (2003)
108. Takada Y, Hemler M.E.: The primary structure of the VLA-2/collagen receptor α^2 subunit (GPIa): Homology to other integrins and the presence of a possible collagen binding domain. *J Cell Biol* Vol 109: 397-407 (1989)
109. Takagi S., Iwai N., Baba S., Mannami T., Ono K., Tanaka C., Miyata T., Miyazaki S., Nonogi H., Goto Y.: A GPVI polymorphism is a risk factor for myocardial infarction in Japanese. *Atherosclerosis* Vol 165: 397-398 (2002)

110. Takahashi H., Moroi M.: Antibody against platelet membrane glycoprotein VI in a patient with systemic lupus erythematosus. *Am J Haematol* Vol 67: 262-267 (2001)
111. Tedgui A., Mallat Z.: Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev* Vol 86: 515-581 (2006)
112. Terres W., Hoffmann M., Koschyk D. *Koronare Herzkrankheit, Innere Medizin, MLP Duale Reihe, 1. Auflage, Hippokrates Verlag, 1999.*
113. Voetsch B., Loscalzo J.: Genetic determinants of arterial thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* Vol 24, No 2: 216-229 (2004)
114. Walter D.H., Zeiher A.M.: Genetic risk factors for myocardial infarct. *Herz* Vol 25, No 1: 7-14 (2000)
115. Wang X.L., Cranney G., Wilcken D.E.: Lp(a) and conventional risk profiles predict the severity of coronary stenosis in high-risk hospital-based patients. *Aust N Z J Med* Vol 30, No 3: 333-338 (2000)
116. Watkins N.A., O'Connor M., Rankin A., Jennings N., Wilson E., Harmer I., Davies L., Smethurst P.A., Dudbridge F., Farndale R.W., Ouwehand W.H.: Definition of novel GP6 polymorphisms and major difference in haplotype frequencies between populations by a combination of in-depth exon resequencing and genotyping with tag single nucleotide polymorphisms. *J Thromb Haemost* Vol 4, No 6: 1197-1205 (2006)
117. Watson S.P., Gibbins J.: Collagen receptor signaling in platelets: extending the role of the ITAM. *Immunology Today*, Vol 19, No 6 (1998)
118. Weiss Ch., Jelkmann W.: *Funktion des Blutes aus Physiologie des Menschen / Schmidt R.F., Thews G. (Springer Verlag, 27. Auflage, 1997)*
119. Zhang Y., Saison M., Spaen M., De Strooper B., Van Leuven F., David G., Van den Berghe H., Cassiman J.J.: Mapping of the fibronectin receptor beta subunit gene to chromosom 10. *Somat Cell Mol Genet* Vol 14: 99-104 (1988)

6. Anhang

6.1 Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die 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 sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

6.2 Zusammenfassung

Das Glykoprotein VI (GPVI) nimmt eine zentrale Rolle bei der Interaktion zwischen Kollagen und Thrombozyten ein. Es ist somit sowohl für die physiologische Hämostase als auch für die pathologische Thrombusbildung verantwortlich. Für das GPVI sind mehrere Polymorphismen bekannt, die zu unterschiedlicher Expressionsdichte, Blutungstendenz oder erhöhter Thrombosegefahr führen. Der C-154T-Dimorphismus in der Promotorregion des GPVI wurde in der hier vorliegenden Arbeit auf seinen potentiellen Einfluss auf die koronare Herzkrankheit (KHK), ihren Schweregrad und das Risiko für einen Myokardinfarkt (MI) untersucht.

Das Verhältnis zwischen diesem Genpolymorphismus und dem KHK-Risiko, dem Schweregrad der KHK und dem MI-Risiko wurde in einer Kontrollstudie von 530 herzgesunden Probanden und 899 Patienten, bei denen eine Koronarangiographie durchgeführt wurde, untersucht. Die Genotypisierung erfolgte mittels sequenzspezifischer PCR (PCR-SSP). Zusätzlich wurde untersucht, ob die Expression des GPVI, welche mittels Durchflußzytometrie und Immunoblot bestimmt wurde, vom C-154T-Dimorphismus abhing.

Etablierte Risikofaktoren für die KHK ließen sich in der Patientengruppe nachweisen. Die Genotypen zeigte dabei keine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Die Allelfrequenz lag beim C-Allel bei 0,47 und beim T-Allel bei 0,53. Die Expressionsdichte des GPVI wies keine Genotyp-abhängigen Unterschiede auf. Weiterhin zeigte es sich, dass der C-154T-Dimorphismus weder mit dem Risiko für eine KHK noch mit deren Schweregrad, eingeteilt in Ein-, Zwei- und Dreifäßerkrankung bzw. bei koronarangiographierten Patienten nach dem Gensini-Score, assoziiert war. Der Dimorphismus hatte auch keinen Einfluss auf das MI-Risiko. Diese Befunde wurden nicht nur in der Gesamtpopulation sondern auch in Niedrig- und Hochrisikogruppen erhoben. Schließlich wies auch das Alter beim Erleiden des ersten Myokardinfarktes keine C-154T-Genotyp-abhängigen Unterschiede auf.

Der GPVI C-154T-Dimorphismus beeinflusst damit weder die Expressionsdichte des GPVI, noch ist er ein Risikofaktor für die KHK, deren Schweregrad und den MI.

6.3 Summary

Glycoprotein VI (GPVI) plays a central role in the interaction between collagen and platelets. It may be responsible for the physiological hemostasis and the pathological thrombus formation. Polymorphisms in this glycoprotein may cause different expression levels which lead to a bleeding disorder or an increased risk for thrombosis. It was the aim of this study to investigate whether the C-154T dimorphism, located in the promoter of GPVI, might be a potential risk factor for coronary artery disease (CAD) and myocardial infarction (MI).

The relation of this gene variation to the risk and severity of CAD and the risk of MI was analysed in a case-control study of 530 healthy controls and 899 participants who underwent coronary angiography. Genotyping was performed by sequence specific polymerase chain reaction (PCR). The potential influence of the GPVI C-154T dimorphism on expression levels was investigated by flow cytometry and immunoblot.

Established coronary risk factors could be identified within the study sample. The genotypes showed no deviation from Hardy-Weinberg equilibrium. The allele frequencies were 0,47 (C allele) and 0,53 (T allele), respectively. Genotype dependent differences in GPVI expression levels could not be detected. In addition, the GPVI C-154T promoter polymorphism was not associated with the risk of CAD and MI and also with the extent of CAD defined either by the number of diseased coronary arteries or – in patients with coronary angiography – by a score for coronary heart disease according to Gensini. This observation applied not only to the total sample but also to low- and high-risk groups. Finally, the age at first MI did not differ between GPVI C-154T genotypes.

In conclusion, the GPVI C-154T gene polymorphism does not influence protein expression, is not a risk indicator of CAD and MI and has no impact on severity of CAD.

6.4 Danksagung

Ganz herzlich danken möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Andreas Gardemann, der mir beim Schreiben meiner Doktorarbeit mit viel Geduld und Hilfsbereitschaft zur Seite stand.

Danken möchte ich auch Prof. Dr. med. Gregor Bein für die Überlassung des Themas und ganz besonders für die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeit im Labor und sämtlicher Materialien, die ich für meine Arbeit benötig habe.

Dr. rer. nat. Sentot Santoso danke ich dafür, dass er sowohl während meiner wissenschaftlichen Tätigkeit im Labor als auch beim Schreiben meiner Doktorarbeit immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatte.

Ich bedanke mich bei Dr. med. Ulrich Sachs, der mich zu Beginn meiner Doktorarbeit in die Thematik eingeführt hat.

Ein ganz besonderer Dank geht auch an Silke Werth, Olga Eva und Heike Berghöfer, die mich bei der Durchführung meiner Versuche unterstützten und mir immer zur Seite standen, wenn ich Hilfe brauchte.

Ich bedanke mich bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Zentrallabors des Institutes für Klinische Chemie und Pathobiochemie, welche die klinisch chemischen Routineanalysen durchführten.

Ich danke meiner Familie für Ihre Unterstützung. Ein ganz besonderer Dank geht dabei an meinen Freund René für seine Geduld, sein Verständnis und seine Hilfe bei der Fertigstellung der Arbeit.

6.5 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Karina Reichhardt
Geburtsdatum	24.03.1978
Geburtsort	Lich
Schulbildung	
1984-1988	Grundschule Hungen
1988-1992	Integrierte Gesamtschule Hungen
1992-1997	St.-Lioba-Gymnasium Bad Nauheim
17.06.1997	Schulabschluss: Abitur in den Fächern Biologie, Englisch, Religion, Mathematik
Studium/Universität	
Oktober 1997 bis Mai 2004	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität (JLU) Gießen und an der Ludwig-Maximilians-Universität München
06.09.1999	Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
29.08.2000	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
September 2000 bis Juli 2001	Auslandsstudium an der Universidad de Cádiz (Spanien), Erasmus-Stipendium
31.03.2003	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2003 bis März 2004	Praktisches Jahr: Pädiatrie (Klinikum Rosenheim), Innere Medizin (Spital Schwyz, CH), Chirurgie (Spital Thuis, CH)
10.05.2004	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
01.10.2004	Erlangung der Vollapprobation
Praktika/Famulaturen	
März 2000	Chirurgie, St. Josefskrankenhaus, Gießen
September 2001	Innere Medizin, Praxis Dr. U. Althaus, Gießen
März 2002	Anästhesie, Kerckhoff-Klinik, Bad Nauheim
August 2002	Immunologie und Transfusionsmedizin, JLU Gießen
Studentische Nebentätigkeiten	
Juni 1998 bis April 2003	Studentische Aushilfskraft in der Frauenklinik der JLU Gießen
September 1998 bis März 2003	Studentische Pflegekraft in der Asklepios-Klinik in Lich
Berufliche Laufbahn	
01.10.2004 bis 30.09.2005	Assistenzärztin Chirurgie, Spital des Seebezirkes Murten, CH
01.10.2005 bis 31.12.2007	Assistenzärztin Anästhesie, Kantonsspital Liestal, CH
Seit 1.01.2008	Assistenzärztin Anästhesie, Kantonsspital Aarau, CH

