

Der potentielle Einfluss des Gpl α -T₍₋₅₎C-Genpolymorphismus auf das
Risiko und den Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit

Inauguraldissertation

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

vorgelegt von Zimmermann, Peter
aus Hachenburg

Gießen 2007

Aus dem Klinischen Zentrum für Labordiagnostik und Pathologie (ZLP)

Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin

Direktor: Prof. Dr. G. Bein

des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Gardemann

Gutachter: PD Dr. Berwing

Tag der Disputation: 23.02.2007

Teile dieser Untersuchungen wurden publiziert:

Santoso S, Zimmermann P, Sachs UJ, Gardemann A. The impact of the Kozak sequence polymorphism of the glycoprotein Ib alpha gene on the risk and extent of coronary heart disease. *Thromb Haemost* 2002; 87: 345-346.

Inhaltsverzeichnis

Titelblatt	I
Publikation	III
Abbildungen	VIII
Tabellen	X
Abkürzungen und Symbole	XII
1 Einführung	1
1.1 Koronare Herzkrankheit, Risikofaktoren, thrombozytäre Glykoproteine: eine Einführung	1
1.2 Thrombozytäre Glykoproteine	2
1.2.1 Struktur des Glykoprotein Ib-IX-V-Komplexes	3
1.2.2 Funktion und Interaktion des Gplb-IX-V-Komplexes mit dem von-Willebrand-Faktor	6
1.2.3 Krankheiten bei Fehlen oder Fehlfunktion von Gplb α oder des Gplb-IX-V-Komplexes	8
1.2.3.1 Bernard-Soulier-Syndrome	8
1.2.3.2 Von-Willebrand-Jürgens-Syndrom und Pseudo-von-Willebrand-Jürgens-Syndrom	8
1.3 Bedeutung der Kozak-Sequenz	9
1.4 Polymorphismen thrombozytärer Glykoproteine	10
1.5 Fragestellung der vorliegenden Studie	10
2 Material	11
2.1 Technische Hilfsmittel	11
2.1.1 Kleinmaterial	11
2.1.2 Geräte	11
2.2 Reagenzien	12

2.3	Enzyme	12
2.4	Primer	13
2.5	Software	13
3	Methoden	14
3.1	Studienpopulation	14
3.2	Diagnose der Koronaren Herzkrankheit	15
3.3	Messung von etablierten Risikofaktoren der Koronaren Herzkrankheit	19
3.3.1	Gesamtcholesterin	19
3.3.2	Triglyceride	20
3.3.3	Lipoprotein (a)	21
3.3.4	Apolipoprotein A-I und Apolipoprotein B	22
3.3.4.1	Apolipoprotein A-I	23
3.3.4.2	Apolipoprotein B	23
3.3.5	Fibrinogen	23
3.3.6	DNA-Isolierung aus EDTA-Blut	24
3.7	Genotypisierung der Allele Gpl β -T ₍₋₅₎ und -C ₍₋₅₎ des Gpl β -T ₍₋₅₎ C-Polymorphismus des Gpl β -Gens	25
3.7.1	Prinzip der Polymerasekettenreaktion – PCR	25
3.7.2	Verschachtelte Polymerasekettenreaktion - Nested-PCR	26
3.7.3	Prinzip der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse – RFLP	26
3.7.4	Prinzip der Agarose-Gel-Elektrophorese	26
3.7.5	Durchführung der Polymerasekettenreaktion – PCR	27
3.7.6	Durchführung der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse – RFLP	30
3.7.7	Durchführung der Agarose-Gel-Elektrophorese	30

3.7.8	DNA-Sequenzierung	33
3.8	Definition von Risiko-Gruppen	34
3.9	Statistische Analyse	34
4	Ergebnisse	35
4.1	Charakterisierung der Studienpopulation	35
4.2	Schweregradeinteilung der Koronaren Herzkrankheit mittels Gensini-Score	42
4.3	Verteilung der Risikofaktoren der Koronaren Herzkrankheit und des Myokardinfarkts	48
4.4	Verteilung der Gpl β -T ₍₋₅₎ C-Genotypen	51
4.5	Der potentielle Einfluss des Gpl β -T ₍₋₅₎ C-Genpolymorphismus auf das Risiko und den Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit	54
4.5.1	Risiko der Koronaren Herzkrankheit	55
4.5.2	Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit	55
4.5.2.1	Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit nach klinischer Definition	55
4.5.2.2	Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit nach Definition gemäß Gensini	56
4.5.3	Vergleich der Gensini-Scores zwischen den Gpl β -Genotypen in Niedrig- und Hochrisikogruppen der Klinikpopulation	57
4.5.3.1	Analyse der Subpopulation < 62 Jahre (50. Perzentile)	57
4.5.3.2	Analyse der Subpopulation < 56 Jahre (25. Perzentile)	58
4.6	Der potentielle Einfluss des Gpl β -T ₍₋₅₎ C-Genpolymorphismus auf das Myokardinfarktrisiko	60
5	Diskussion	63
5.1	Der potentielle Einfluss des Gpl β -T ₍₋₅₎ C-Genpolymorphismus auf das Risiko und den Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit: Kurzdarstellung der Studienergebnisse	63

5.2	Der Gplb α -T ₍₋₅₎ C-Genpolymorphismus: Darstellung bisheriger Publikationen	64
5.2.1	Struktur des Glykoproteins Iba	64
5.2.2	Publizierte Untersuchungen zur Oberflächendichte des Gplb α -T ₍₋₅₎ C-Polymorphismus	65
5.3	Publizierte Untersuchungen zur Assoziation des Gplb α -T ₍₋₅₎ C-Polymorphismus mit der ischämischen Herzerkrankung	67
5.3.1	Vergleich der Allelfrequenzen der ₍₋₅₎ C- und ₍₋₅₎ T-Variante des Gplb α -T ₍₋₅₎ C-Polymorphismus mit Allelfrequenzen bisheriger Publikationen	67
5.3.2	Studien in denen keine Assoziation des Gplb α -T ₍₋₅₎ C-Polymorphismus mit der ischämischen Herzerkrankung beobachtet wurde	68
5.3.3	Studien in denen eine Assoziation des Gplb α -T ₍₋₅₎ C-Polymorphismus mit der ischämischen Herzerkrankung beobachtet wurde	71
5.4	Vergleich der Studien über die Assoziation des Gplb α -T ₍₋₅₎ C-Polymorphismus zur ischämischen Herzerkrankung und den Myokardinfarkt	73
5.4.1	Erklärungsansätze für die kontroversen Studienergebnisse	73
5.4.2	Ausblick auf zukünftige Studien	79
6	Zusammenfassung	81
	Der potentielle Einfluss des Gplb α -T ₍₋₅₎ C-Genpolymorphismus auf das Risiko und den Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit	
7	Summary	83
	The Impact of the Gplb α -T ₍₋₅₎ C-Polymorphism (Kozak-Sequence-Polymorphism) on the Risk and Extent of Coronary Heart Disease	
8	Literaturverzeichnis	85

Lebenslauf

Danksagung

Abbildungen

Abb. 1:	Schematische Darstellung des Glykoprotein Ib-IX-V-Komplexes	5
Abb. 2:	Nomenklatur der Koronararteriensegmente	17
Abb. 3:	Anatomie der Koronararterien	19
Abb. 4:	Genotypisierung des Gplb α -T ₍₋₅₎ C-Genpolymorphismus	31
Abb. 5:	Fotographische Dokumentation des Produkts der Nested-PCR / RFLP	32
Abb. 6:	Vergrößerung aus Abb. 5 (s. Rahmen)	32
Abb. 7:	Nukleotid-Sequenz-Analyse von DNA-Proben der drei Genotypen des Gplb α -T ₍₋₅₎ C-Genpolymorphismus	33
Abb. 8:	Anzahl der Probanden der Gesamtpopulation in den jeweiligen Altersgruppen	35
Abb. 9:	Anzahl der Probanden in den jeweiligen Altersgruppen mit oder ohne KHK	36
Abb. 10:	Anzahl der Probanden in den jeweiligen Altersgruppen in Abhängigkeit vom Gefäßstatus	37
Abb. 11:	Anzahl der Probanden in der jeweiligen Altersgruppe mit oder ohne Myokardinfarkt	39
Abb. 12:	Korrelation zwischen Koronarer Herzkrankheit und Myokardinfarkt	40
Abb. 13:	Korrelation zwischen KHK-Schweregrad und Myokardinfarkt	41
Abb. 14:	Gensini-Score der Klinikpopulation in Abhängigkeit von der KHK	43
Abb. 15:	Gensini-Score der Klinikpopulation in Abhängigkeit von der KHK	44
Abb. 16:	Gensini-Scores der Klinikpopulation in Abhängigkeit vom Schweregrad der KHK	45

Abb. 17:	Gensini-Score in der Klinikpopulation in Abhängigkeit vom Schweregrad der KHK	46
Abb. 18:	Gensini-Score in der Klinikpopulation in Abhängigkeit vom Myokardinfarkt	47
Abb. 19:	Gensini-Score in der Klinikpopulation in Abhängigkeit vom Myokardinfarkt	47
Abb. 20:	Genotypenverteilung in der Gesamtpopulation	52
Abb. 21:	Vergleich der Gensini-Scores zwischen den Gplb α -Genotypen in der Klinikpopulation	57
Abb. 22:	Vergleich zwischen den Gensini-Score Mittelwerten der Gplb α -CC-Homozygoten und Trägern des Gplb α -T-Allels (TC- und TT-Genotypen) bei Patienten < 62 Jahre (50. Perzentile)	58
Abb. 23:	Vergleich zwischen den Gensini-Score Mittelwerten der Gplb α -CC-Homozygoten und Trägern des Gplb α -T-Allels (TC- und TT-Genotypen) bei Patienten < 56 Jahre (25. Perzentile)	59
Abb. 24:	Altersabhängigkeit der Assoziation des CC-Genotyps der Gplb α -Genvariation zum Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit bei Klinikpatienten	60
Abb. 25:	Vergleich des Durchschnittsalters beim 1. Myokardinfarkt zwischen den Gplb α -T ₍₋₅₎ C-Genotypen	61

Tabellen

Tab. 1:	Ermittlung des Gensini-Scores	18
Tab. 2:	Nested-PCR: PCR – Reaktionsansatz I	28
Tab. 3:	Nukleotidsequenzen der Primer des PCR – Reaktionsansatz I	28
Tab. 4:	Amplifikationsbedingungen Nested-PCR Reaktionsbedingungen für Ansatz I	28
Tab. 5:	Nested-PCR: PCR – Reaktionsansatz II	29
Tab. 6:	Nukleotidsequenzen der Primer des PCR – Reaktionsansatz II	29
Tab. 7:	Amplifikationsbedingungen Nested-PCR Reaktionsbedingungen für Ansatz II	29
Tab. 8:	RFLP-Ansatz	30
Tab. 9:	Anzahl der Probanden in den jeweiligen Altersgruppen mit oder ohne KHK	36
Tab. 10:	Anzahl der Probanden in den jeweiligen Altersgruppen in Abhängigkeit vom Gefäßstatus	38
Tab. 11:	Anzahl der Probanden in der jeweiligen Altersgruppe mit oder ohne Myokardinfarkt	39
Tab. 12:	Korrelation zwischen Koronarer Herzkrankheit und Myokardinfarkt	41
Tab. 13:	Korrelation zwischen KHK-Schweregrad und Myokardinfarkt	42
Tab. 14:	Gensini-Score in der Klinikpopulation in Abhängigkeit von der KHK	43
Tab. 15:	Gensini-Score in der Klinikpopulation in Abhängigkeit vom Schweregrad der KHK	44
Tab. 16:	Gensini-Score in der Klinikpopulation in Abhängigkeit vom Myokardinfarkt	46
Tab. 17:	Verteilung der Risikofaktoren in der Klinikpopulation	48
Tab. 18:	Verteilung der Risikofaktoren nach KHK-Schweregraden	49

Tab. 19:	Verteilung der Risikofaktoren des Myokardinfarkts	50
Tab. 20:	Etablierte Risikofaktoren der Koronaren Herzkrankheit bzw. des Myokardinfarkts in Abhängigkeit von den Gplb α -Genotypen innerhalb der Gesamtpopulation	53
Tab. 21:	Etablierte Risikofaktoren der Koronaren Herzkrankheit bzw. des Myokardinfarkts in Abhängigkeit von den Gplb α -Genotypen innerhalb der Population der Herzgesunden und KHK-Patienten	53
Tab. 22:	Etablierte Risikofaktoren der Koronaren Herzkrankheit bzw. des Myokardinfarkts in Abhängigkeit von den Gplb α -Genotypen innerhalb der Population der Herzgesunden und Myokardinfarktpatienten	54
Tab. 23:	Verteilung der Gplb α -T ₍₋₅₎ C-Genotypen in Probanden ohne Gefäßerkrankung und in Patienten mit Koronarer Herzkrankheit	55
Tab. 24:	Vergleich der Gensini-Scores zwischen den Gplb α -Genotypen in der Klinikpopulation	56
Tab. 25:	Verteilung der Gplb α -T ₍₋₅₎ C-Genotypen in Probanden ohne Gefäßerkrankung und in Myokardinfarkt-Patienten und Klinikpatienten ohne Myokardinfarkt	61
Tab. 26:	Vergleich des Durchschnittsalters beim 1. Myokardinfarkt zwischen den Gplb α -Genotypen	62

Abkürzungen und Symbole

A	Adenin
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ACB-OP	aortokoronare Bypass-Operation
AP	Angina pectoris
ApoA-I	Apolipoprotein A-I
ApoB	Apolipoprotein B
ATP	Adenosintriphosphat
Aqua dest.	Aqua destillata
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
BMI	Body Mass Index
bp	Basepair, Basenpaar
BSA	Bovines-Serum-Albumin
BSS	Bernard Soulier Syndrom
C	Cytosin
CC	CC-Homozygot
cAMP	cyclo AMP, zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary DNA, komplementäre DNA
Chol	Gesamtcholesterin
CK	Creatin-Kinase
CK-MB	herzmuskelspezifisches Creatin-Kinase-Isoenzym
CT	Computertomographie
CTP	Cytidintriphosphat
C	Kohlenstoff (in C-terminal)
°C	Grad Celsius
d	desoxy (in Kohlenhydraten und Nukleotiden)
D1	First Diagonal, erster Diagonalast, 1. R. lateralis
D2	Second Diagonal, zweiter Diagonalast, 2. R. lateralis
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	double-stranded DNA, doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol

XIII

EDTA	Ethylene-diamine-tetraacetic acid, Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
et al.	et alteri, und andere
g	Erdbeschleunigung, Fallbeschleunigung 9,81 m/sec ²
G	Guanin
Gp	Glykoprotein
GS	Gensini-Score
GTP	Guanosintriphosphat
h	hour, Stunde
HCl	Wasserstoffchlorid
HDL	High Density Lipoprotein
HG	Herzgesund
HI	Herzinfarkt
HPA	Human Platelet Alloantigen
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
J	Jahre
JLU	Justus-Liebig-Universität
Kap.	Kapitel
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo-Dalton
kg	Kilogramm
KHK	Koronare Herzkrankheit
KHK-0-GE	KHK-Nullgefäßerkrankung
KHK-1-GE	KHK-Eingefäßerkrankung
KHK-2-GE	KHK-Zweigegefäßerkrankung
KHK-3-GE	KHK-Dreigegefäßerkrankung
LAD	Left Anterior Descending, R. interventricularis anterior
LAO	linksanterior
LCA	Left Coronary Artery, A. coronaria sinistra
LCAT	Lecithin Cholesterin Acyltransferase
LDL	Low Density Lipoprotein
Lp(a)	Lipoprotein(a)
LV	Linker Ventrikel, linksventrikulär

m	männlich
m	Meter
m ²	Quadratmeter
Met	Methionin
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mg	Milligramm
min	Minute
MI	Myokardinfarkt
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
mRNA	messenger Ribonukleinsäure, Boten-RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
M V	Molekülmarker V
μ	Kurzzeichen des Präfixes Mikro, ein Millionstel, 10 ⁻⁶
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μmol	Mikromol
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
n.s.	nicht signifikant
N	Stickstoff (in N-terminal)
NTP	Nukleosidtriphosphate
OM	Obtuse Marginal, R. marginalis sinister
O ²	Sauerstoff
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polmerasekettenreaktion
PD	Posterior Descending, R. interventricularis posterior
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
pH	potentia Hydrogenii, negativer Logarithmus der Protonenkonzentration
PL	Posterolateral, R. posterior ventriculi sinistri
PO ₄ ²⁻	Phosphat
PTCA	Perkutane transluminale koronare Angioplastie

p-Wert	Überschreitungswahrscheinlichkeit
R.	Ramus
RAO	rechtanterior
RCA	Right Coronary Artery, A. coronaria dextra
RCX	Ramus circumflexus
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolmorphismus
RPD	Right Posterior Descending, R. interventricularis posterior
S	Schwefel
S.	Seite
s.	siehe
s.o.	siehe oben
ssDNA	single-stranded DNA, einzelsträngige DNA
s.u.	siehe unten
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TC	TC-Heterozygot
TE	Tris-EDTA
Thr	Threonin
Trig	Triglyceride
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
tsr	Template Supression Reagent
TT	TT-Homozygot
TTE	transthorakale Echokardiographie
U	Uracil
u. a.	unter anderem
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
U/ml	Units pro Milliliter
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats
vWF	von-Willebrand-Faktor
vWS	von-Willebrand-Jürgens Syndrom
w	weiblich
WHO	World Health Organisation

z.B. zum Beispiel
weitere Abkürzungen und Symbole im Text

Meiner Familie

1 Einführung

1.1 Koronare Herzkrankheit, Risikofaktoren, thrombozytäre Glykoproteine: eine Einführung

Die Koronare Herzkrankheit (KHK) und die cerebrovaskuläre Verschlusskrankheit sind die führenden Ursachen für Morbidität und Mortalität in der westlichen Welt [6, 11, 76]. Männer sind dabei zwei- bis dreimal häufiger betroffen als Frauen. Das Risiko eines 50 Jahre alten gesunden Mannes, innerhalb von 10 Jahren eine Koronare Herzkrankheit zu entwickeln, liegt bei 6% [2, 14]. Im Jahr 2000 lag die Sterbeziffer (Gestorbene/100.000 Einwohner) der KHK bei 113 (m 94 / w 131) und für den akuten Myokardinfarkt bei 82 (m 91 / w 72) [14]. Manifestationsformen der Koronaren Herzkrankheit sind die Angina pectoris, der akute Myokardinfarkt, die Herzinsuffizienz, Herzrhythmusstörung und der plötzlicher Herztod. In 55% der Fälle findet sich die Angina pectoris als Erstmanifestation, der akute Myokardinfarkt in 25%, der plötzliche Herztod in 20% [40]. Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass für die Entstehung der KHK ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Risikofaktoren verantwortlich ist [112]. Es werden beeinflussbare und unbeeinflussbare Risikofaktoren unterschieden. Zu den beeinflussbaren Risikofaktoren zählen Fettstoffwechselstörungen, arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus, Zigarettenkonsum, Hyperhomocysteinämie, Hyperfibrinogenämie. Unbeeinflussbare Risikofaktoren sind die familiäre genetische Disposition, das Lebensalter sowie das männliche Geschlecht. Der Myokardinfarkt ist durch den akuten Verschluss einer Koronararterie mit nachfolgender ischämisch bedingter Myokardnekrose definiert [27, 40]. Die Inzidenz des akuten Myokardinfarkts liegt in Deutschland bei 330 pro 100.000 Personen pro Jahr. Durch die Entwicklung molekularbiologischer Methoden, wie der Polymerasekettenreaktion (PCR) ist es möglich geworden, die multifaktorielle Ätiologie der Koronaren Herzkrankheit genauer zu untersuchen und zu verstehen. Man weiß heute, dass die Entstehung und Progression der KHK sowie die Reaktion auf äußere Risikofaktoren, in hohem Maße von der genetischen Veranlagung, den Genen, bestimmt wird [13, 103]. Es konnten verschiedene Mutationen in der Sequenz der DNA identifiziert werden, welche eine entscheidende Rolle in der Blutdruckregulation, dem Lipidmetabolismus, der Endothelfunktion sowie der Koagulation und Fibrinolyse spielen [15, 12, 83].

Das Aufbrechen oder Unterbluten eines atherosklerotischen Plaques, gefolgt von der Freisetzung thrombogenen Materials, und die Entstehung eines okklusiven Thrombus ist die häufigste Ursache eines akuten Koronargefäßverschlusses. Eine Hauptrolle in diesem dramatischen Geschehen spielen die Blutplättchen, die Thrombozyten [86]. Unter normalen, physiologischen Bedingungen löst eine Verletzung des Gefäßendothels die primäre Hämostase aus, welche zur Bildung eines Gefäßwandthrombus führt. Freilegung von Kollagen, von-Willebrand-Faktor sowie weiteren Faktoren der extrazellulären Matrix bewirkt die Adhäsion von zirkulierenden Blutplättchen an der verletzten Gefäßwand [4, 5, 33]. Durch Aktivierung der adhärennten Thrombozyten kommt es zu komplexen Interaktionen, die zur Thrombusbildung führen [4, 5]. Die Gefäßverletzung wird schließlich mittels fibrinstabiler Thrombozyten versiegelt, der Blutverlust kontrolliert und gestoppt. Unter pathophysiologischen Bedingungen, z.B. im Rahmen einer Plaqueruptur, sind es die gleichen Mechanismen, die zu Thrombosierung und eventuell vollständigem Gefäßverschluss führen. Vermittelt werden diese Interaktionen durch Moleküle auf der Thrombozytenoberfläche – die thrombozytären Glykoproteine (Gp) [17, 61, 81].

In den letzten Jahren konnten die Gene, welche die thrombozytären Membranglykoproteine kodieren, entschlüsselt werden. Die Genanalysen zeigten stabile Variationen innerhalb der DNA-Sequenzen, genetische Polymorphismen, welche die Anzahl und Funktion der Oberflächenmoleküle, und somit auch die komplexen Abläufe der Hämostase und Thrombusbildung beeinflussen können [1, 80, 87, 97, 98]. In weiterführenden Untersuchungen fanden sich Assoziationen zwischen einzelnen Genpolymorphismen thrombozytärer Glykoproteine und dem Risiko für atherosklerotische Erkrankungen, wie der Koronaren Herzkrankheit, dem Myokardinfarkt oder dem Schlaganfall [83, 87, 97, 98, 103].

1.2 Thrombozytäre Glykoproteine

Die Mechanismen der physiologischen Hämostase bzw. pathophysiologischen Thrombusbildung erfordern ein enges Zusammenspiel zwischen Thrombozyten, Endothelzellen, plasmatischen Gerinnungsfaktoren und Strukturen der extrazellulären Matrix der Gefäßwand. Adhäsionsvorgänge, die durch eine Vielzahl von spezifischen Rezeptoren reguliert werden, spielen dabei eine wesentliche Rolle. Thrombozyten weisen membranständige Glykoproteine (Gp) auf, welche die Interaktion von Blutplättchen untereinander (GpIIb-IIIa), mit der subendothelialen

Matrix (von-Willebrand-Faktor-Rezeptor, Gplb-IX-V-Rezeptor, Kollagenrezeptor), mit plasmatischen Gerinnungsfaktoren (vWF-Rezeptor, Faktor VIII:C), Endothelzellen (GpIIb-IIIa) oder Leukozyten (P-Selektin) vermitteln. Gemäß ihrer charakteristischen Molekülstruktur werden die thrombozytären Adhäsionsrezeptoren in Integrine, leucinreiche Glykoproteine, Selektine und Rezeptoren vom Immunglobulintyp unterteilt [33]. Die Adhäsion von Thrombozyten an die verletzte Gefäßwand ist der erste Schritt der Hämostase und findet unter arteriellen Strömungsbedingungen mit hohen Scherkräften statt. Dieser Vorgang wird entscheidend durch den thrombozytären Glykoprotein-Komplex Gplb-IX-V vermittelt [93].

1.2.1 Struktur des Glykoprotein Ib-IX-V-Komplexes

Der Gplb-IX-V-Komplex setzt sich aus den vier transmembranösen Glykoproteinen Gplb α , Gplb β , GpIX und GpV zusammen, welche den leucinreichen Proteinen zuzuordnen sind [10, 68, 94]. Es besteht keine Strukturverwandschaft mit den Gruppen der Integrine, Immunglobuline oder Selektine, welche weitere thrombozytäre Adhäsionsrezeptoren darstellen und ebenfalls die Interaktionen zwischen Thrombozyten und Endothelzellen beeinflussen [33]. Gplb α (135 kDa) und Gplb β (25 kDa) sind kovalent über Disulfidbrücken miteinander verbunden. Ein Gplb-Molekül (Ib α + Ib β) bindet nicht-kovalent ein GpIX-Molekül (22 kDa) im Verhältnis 1:1 [9]. Im Zentrum des Komplexes findet sich ein GpV-Molekül (82 kDa) [41], um welches jeweils zwei nicht-kovalent gebundene Gplb-IX-Komplexe angeordnet sind. Auf jedem Thrombozyt finden sich ca. 25.000 Gplb-IX-Komplexe [64] und ca. 12.500 GpV-Moleküle [74] (s. Abb. 1, S. 5).

Gplb α (135 kDa, 610 Aminosäuren) besteht aus einer N-terminalen extrazellulären Domäne mit sieben strukturgleichen, leucinreichen Aminosäuresegmenten, („tandem-repeats“), einer hochgradig glykosylierten Makroglykopeptid-Domäne sowie aus einer transmembranösen Domäne und einem zytoplasmatischen Anteil [65]. Die leucinreichen „tandem-repeats“ bestehen aus 24 Aminosäuren und sind von einer spezifischen Konsensus-Sequenz flankiert, welche N-terminal und C-terminal über eine Disulfidbrücke verbunden ist. Dies ist charakteristisch für viele leucinreiche Glykoproteine [68]. In röntgen-kristallographischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die N-terminale extrazelluläre Domäne eine fächerartige Struktur aufweist [29]. Zwischen der C-terminalen Konsensus-Sequenz und der Makroglykopeptid-Domäne findet sich eine Aminosäuresequenz mit drei Tyrosinresten,

welche entscheidend an der Bindung des von-Willebrand-Faktor (vWF) und von Thrombin beteiligt ist [23]. Der zytoplasmatische Anteil von Gplb α enthält Bindungsstellen für zwei Proteine, das „actin-binding-protein“ und das „14-3-3 ζ -Protein“. Diese Proteine beeinflussen die funktionelle Aktivität des Gplb-IX-V-Komplexes [3, 25]. Beide Bindungsstellen besitzen jeweils eine einzelne leucinreiche Sequenz mit flankierenden Konsensus-Sequenzen.

Gplb β (25 kDa, 181 Aminosäuren) besitzt einen einzelnen „leucine-rich-repeat“ und ist über eine Disulfidbrücke kovalent mit Gplb α verbunden [66]. Der zytoplasmatische Anteil von Gplb β besitzt eine cAMP-abhängige Phosphorylierungsstelle in Form einer Proteinkinase A, welche nach Stimulation im Rahmen der Thrombozytenaktivierung für die Verformung des Thrombozyten verantwortlich ist [30].

GpIX (22 kDa, 160 Aminosäuren) besitzt wie Gplb β einen einzelnen „leucine-rich-repeat“ und ist nicht-kovalent mit einem Gplb-Molekül (Ib α + Ib β) im Verhältnis 1:1 verbunden [9]. Der kurze zytoplasmatische Anteil von GpIX besteht aus 5 Aminosäuren.

GpV (82 kDa, 544 Aminosäuren) beinhaltet 15 „leucine-rich-repeats“ und einen zytoplasmatischen Anteil aus 16 Aminosäuren [41]. GpV ist von entscheidender Bedeutung für die Bildung des Gplb-IX-V-Komplexes, indem es jeweils zwei Gplb-IX-Komplexe nicht-kovalent bindet [64].

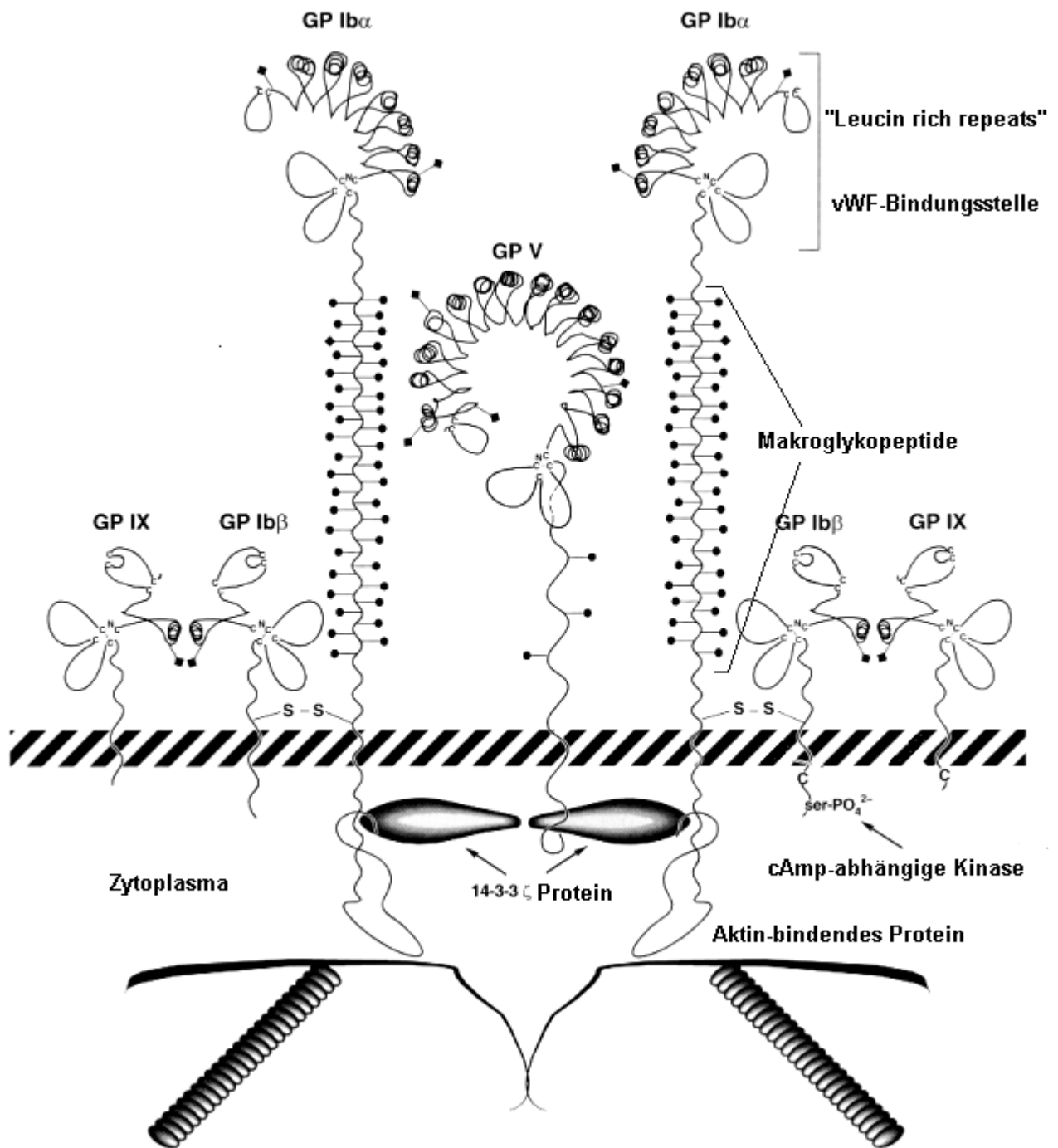


Abb.1: Schematische Darstellung des Glykoprotein Ib-IX-V-Komplexes

Darstellung nach Lopez et al. 1998 [69]. Auf jedem Thrombozyt finden sich ca. 25.000 GpIb-IX-Komplexe und ca. 12.500 GpV-Moleküle. GpIbα mit der N-terminalen extrazellulären Domäne mit sieben „leucine-rich-tandem-repeats“, der vWF-Bindungsstelle und hochgradig glykosylierter Makroglykopeptid-Domäne sowie transmembranösen Domäne und einem zytoplasmatischen Anteil mit Bindungsstellen für das „Aktin-bindende-Protein“ und das „14-3-3ζ-Protein“, welche die funktionelle Aktivität des GpIb-IX-V-Komplexes beeinflussen. GpIbβ ist mit einem einzelnen „leucine-rich-repeat“ und über eine Disulfidbrücke kovalent mit GpIbα verbunden. GpIX ist mit einem „leucine-rich-repeat“ nicht-kovalent mit einem GpIb-Molekül (Ibα + Ibβ) im Verhältnis 1:1 verbunden. GpV mit 15 „leucine-

rich-repeats“ bindet zwei GpIb-IX-Komplexe nicht-kovalent. Abkürzungen: GP = Glycoprotein; vWF = von-Willebrand-Faktor; S = Sulfidbrücke; cAMP = cyclo Adenosin Mono Phosphat.

1.2.2 Funktion und Interaktion des GpIb-IX-V-Komplexes mit dem von-Willebrand-Faktor

Die physiologische Aufgabe des GpIb-IX-V-Komplexes ist es, die initiale Adhäsion von zirkulierenden Thrombozyten an die Gefäßwand einzuleiten [93]. Die vom GpIb-IX-V-Komplex vermittelte Adhäsion ist abhängig vom von-Willebrand-Faktor (vWF) und den Scherkräften. In Gefäßabschnitten mit niedriger Fließgeschwindigkeit und geringen Scherkräften ist die Thrombozytenadhäsion unabhängig von der GpIb-IX-V-Komplex-vWF-Interaktion und wird von den Kollagenrezeptoren GpIa-IIa und GpVI sowie dem Fibrinogenrezeptor GpIIb-IIIa vermittelt [101, 102].

Der von-Willebrand-Faktor ist ein großes multimeres Glykoprotein (20×10^6 kDa / 2050 Aminosäuren). In löslicher Form zirkuliert es im Plasma in einer Konzentration von ca. 10 µg/ml. Zusätzlich findet man den vWF in den α -Granula, den zytoplasmatischen Organellen der Thrombozyten und in den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen. Nach Zellaktivierung wird der vWF sezerniert [95]. Der vWF setzt sich aus verschiedenen Domänen unterschiedlicher Länge zusammen [106]. Die A1 Domäne beinhaltet die Bindungsstelle für den GpIb-IX-V-Komplex [95]. Die Adhäsion von vWF an den GpIb-IX-V-Komplex der Thrombozyten initiiert eine Kaskade, an deren Ende die physiologische Hämostase oder pathophysiologische Thrombusbildung steht. Kommt es im Rahmen einer Gefäßverletzung oder Plaqueruptur zur Freilegung der subendothelialen Matrix, so bindet der im Plasma gelöste vWF an das freigelegte Kollagen. Die Immobilisierung des vWF führt zu einer Konformationsänderung der A1-Domäne, wodurch die Affinität für den GpIb-IX-V-Komplex um ein Vielfaches erhöht wird [73]. Über vWF-Bindungsstellen auf GpIb α kommt es schließlich zur vWF-GpIb-IX-V-Komplex-Interaktion. Für die Bindung zwischen dem von-Willebrand-Faktor und dem vWF-Rezeptor sind die N-terminalen Aminosäuren von GpIb α entscheidend. Hier wurden drei Regionen identifiziert, die entweder direkt mit dem vWF eine Bindung eingehen oder die Affinität für die Interaktion erhöhen [4, 5, 104]. Unter anderem sind dies die „leucine-rich-repeats“ 2-4 [104].

Thrombozyten zirkulieren im Blut nahe der Gefäßwand, wohingegen Erythrozyten und Leukozyten aufgrund ihrer Größe mehr im Zentrum des Gefäßlumens fließen. Im Zentrum ist die Fließgeschwindigkeit am höchsten und nimmt exponentiell zur

Gefäßwand hin ab. Die Thrombozyten unterliegen somit stark den durch die unterschiedlichen Fließgeschwindigkeiten erzeugten Scherkräften [59]. Die Bildung eines Thrombus beginnt mit der Bindung von im Plasma gelöstem vWF an der exponierten subendothelialen Matrix der Gefäßwand. Bei hohen Scherkräften ist die Thrombozytenadhäsion an eine thrombogene Oberfläche von der vWF-Funktion abhängig [96]. Ermöglicht wird dies durch die extrem hohe Assoziationsrate zwischen dem vWF und dem thrombozytären GpIb-IX-V-Komplex. Durch eine ebenso hohe Dissoziationsrate bleibt die initiale Adhäsion zunächst reversibel [101]. Die Interaktion zwischen GpIb α und der vWF-A1-Domäne ermöglicht das Rollen der Thrombozyten („rolling“) auf dem Subendothelium, analog zum Rollen von Leukozyten auf Endothelzellen [71]. Während des Rollvorganges werden die Thrombozyten durch die GpIb-IX-V-Komplex-vWF-Interaktion aktiviert [102]. Die Bindung des Aktin-Bindungs-Proteins und des 14-3-3 ζ -Proteins am zytoplasmatischen Anteil von GpIb α scheinen eine entscheidende Rolle in diesem Aktivierungsprozess zu spielen. Die GpIb-IX-V-Komplex-vWF-Interaktion bewirkt auch einen erhöhten Calciumeinstrom ins Zytoplasma des Thrombozyten [62]. Der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration führt zu einer Formveränderung des thrombozytären Zytoskeletts und Ausbildung von Filopodien, wodurch die Adhäsion weiter verstärkt wird [63]. Schließlich kommen die Plättchen zum Stillstand und bilden eine feste Bindung mit dem Gefäßendothel aus. Das „Spreading“, ein flächenhaftes Ausbreiten zur Vergrößerung der Kontaktfläche der Thrombozyten auf der thrombogenen Oberfläche, verstärkt die Adhäsion zusätzlich. Die zunächst reversible Adhäsion geht dann durch die Bindung von aktiviertem GpIIb-IIIa mit dem vWF in eine irreversible Form über [26].

Während der Thrombozytenadhäsion kommt es zur Aktivierung der Blutplättchen, was eine Freisetzung von intrazellulär gespeicherten Granulainhaltsstoffen und Freilegung von Bindungsstellen für Fibrinogen (GpIIb-IIIa) zur Folge hat. Dadurch wird zusätzlich zur Adhäsion die Aggregation, also die Kohäsion zwischen zwei oder mehreren Thrombozyten, eingeleitet. Eine regelhafte Aggregation ist von Ca^{2+} , Fibrinogen und den vorliegenden Scherkräften abhängig. Fibrinogen und Ca^{2+} sind in ausreichender Menge im Plasma gelöst und werden zusätzlich aus intrazellulären Speichern des aktivierten Thrombozyten freigegeben, hohe Scherkräfte erhöhen die Kontaktwahrscheinlichkeit der Thrombozyten. Von zentraler Bedeutung für die Aggregation ist der Glykoprotein-IIb-IIIa-Komplex (GpIIb-IIIa). Nach der Aktivierung

werden durch den GpIIb-IIIa-Komplex Fibrinogenbindungsstellen freigegeben und über Fibrinogenbrücken wird schließlich ein Plättchenaggregat gebildet [33].

1.2.3 Krankheiten bei Fehlen oder Fehlfunktion von Gplb α oder des Gplb-IX-V-Komplexes

1.2.3.1 Bernard-Soulier-Syndrome

Das Bernard-Soulier-Syndrome (BSS), erstmalig 1948 beschrieben, beruht auf genetischen Defekten der Gene von Gplb α , Gplb β oder GpIX. Defekte oder das Fehlen von GpV führen nicht zum BSS. Die verschiedenen Defekte verursachen eine unzureichende, vollständig fehlende oder fehlerhafte Expression des Gplb-IX-V-Komplexes bzw. seiner einzelnen Untereinheiten. Dies führt zu einer beeinträchtigten Adhäsion von zirkulierenden Thrombozyten an die Gefäßwand. Charakteristisch für das BSS ist die fehlende Agglutination der Thrombozyten nach Zugabe von Ristocetin bzw. vWF. Patienten mit dem BSS weisen eine verlängerte Blutungszeit, eine Thrombozytopenie sowie stark vergrößerte Thrombozyten auf. Als typische Symptome finden sich häufiges Nasenbluten, Schleimhautblutungen, verstärkte Blutungen nach minimalen oberflächlichen Verletzungen, gastrointestinale Blutungen sowie eine erhöhte Hämatomneigung. Im Rahmen von größeren Verletzungen und Operationen können lebensbedrohliche Blutungen auftreten. Auch lebensbedrohliche Menorrhagien bzw. Partalblutungen sind möglich. Die umgehende Transfusion von Thrombozytenkonzentraten und Erythrozytenkonzentraten ist dann erforderlich. Das BSS unterliegt einem autosomal-rezessiven Erbgang. In der Literatur ist bis dato nur ein Fall mit autosomal-dominanten Erbgang beschrieben worden [19, 69].

1.2.3.2 Von-Willebrand-Jürgens-Syndrom und Pseudo-von-Willebrand-Jürgens-Syndrom

Das von-Willebrand-Jürgens-Syndrom (vWS) ist die häufigste angeborene Gerinnungsstörung und beruht auf einer primär verminderten von-Willebrand-Faktor- und Faktor VIII:C-Konzentration (Typ I), bzw. auf einem strukturellen und funktionellem Defekt des vWF (Typ II) oder vollständigem Fehlen des vWF mit gleichzeitig stark verminderter Faktor VIII:C-Konzentration (Typ III). Patienten mit dem vWS weisen eine verlängerte Blutungszeit auf. Die Mehrzahl der Patienten hat keine oder nur diskrete Blutungssymptome. Als typisches Symptom finden sich Schleimhautblutungen. Das von-Willebrand-Jürgens-Syndrom Typ I und Typ II unterliegt einem

autosomal-dominanten, Typ III einem autosomal-rezessiven Erbgang. Das Pseudo-von-Willebrand-Jürgens-Syndrom hat seine Ursache in einer Mutation innerhalb der kodierenden Sequenz des Glykoproteins Gplb α . Es handelt sich um einen so genannten „gain-of-function-phenotype“. Die Mutation des Gplb α -Gens bewirkt eine erhöhte Affinität für den vWF bei nicht aktivierten, ruhenden Thrombozyten. Die unphysiologische Thrombozytenaktivierung führt zur Thrombozytenaggregation. Die Plättchenaggregate werden dann in der Milz aus dem Blutkreislauf herausgefiltert. Bei Patienten mit dem Pseudo-von-Willebrand-Jürgens-Syndrom kommt es somit zu einer periodischen Thrombozytopenie und verminderten vWF-Plasmakonzentration, was eine eingeschränkte Hämostase mit erhöhtem Blutungsrisiko zur Folge hat. Das Pseudo-von-Willebrand-Jürgens-Syndrom unterliegt einem autosomal-dominanten Erbgang [19, 69].

1.3 Bedeutung der Kozak-Sequenz

Die Kozak-Sequenz wurde erstmalig von Marilyn Kozak beschrieben. Ursprünglich wurde die Nukleotidsequenz $A_{(-3)}C_{(-2)}C_{(-1)}\underline{AUGG}_{(+1)}$ als Kozak-Sequenz definiert. Diese Definition basierte auf Studien, in welchen die Effekte einzelner Mutationen der das Initiatorcodon AUG umgebenden Nukleotide auf die Translation in eukaryoten Zellen untersucht wurden. Systematische mutagenetische Studien sowie der Vergleich von mehreren hundert mRNA-Molekülen von Vertebraten zeigten, dass die Nukleotidsequenz, welche das funktionelle Initiatorcodon AUG (für DNA: ATG) umgibt, keine zufällige Abfolge darstellt. 95% aller bekannten mRNA-Sequenzen besitzen die Purinbase Adenin (A) in Position -3. Die Purinbase Guanin (G) dominiert die Position +4. Funktionelle Untersuchungen der Translation des Preproinsulin-Gens und des Alpha-Globulin-Gens in eukaryotischen Zellen zeigten, dass die Purinbase (A) in Position -3 von entscheidender Bedeutung für eine effiziente Initiation der Translation ist. Wenn die Purinbase (A) in Position -3 fehlt, wird die Purinbase Guanin (G) in Position +4 essentiell für die Translation. Die aktuelle Definition der Kozak-Sequenz lautet $G_{(-9)}C_{(-8)}C_{(-7)}G_{(-6)}C_{(-5)}C_{(-4)}A_{(-3)}C_{(-2)}C_{(-1)}\underline{AUGG}_{(+1)}$. Polymorphismen der Kozak-Sequenz besitzen Einfluss auf die Translation und damit auf die Synthese von Proteinen [54, 55, 56, 57, 58].

1.4 Polymorphismen thrombozytärer Glykoproteine

Polymorphismen sind stabile Variationen von DNA-Sequenzen. Sie können zu Änderungen in Aminosäuresequenzen, also Proteinmolekülen führen, können aber auch „still“, d.h. ohne strukturelle oder funktionelle Auswirkung bleiben. Für das Glykoprotein Gplb α sind verschiedene stabile polymorphe Variationen bekannt [60, 67, 75]. Der Thr₁₄₅Met-Polymorphismus, ein „single nucleotide polymorphism“, ein einzelner Nukleotidaustausch innerhalb der Gplb α -cDNA, beeinflusst die alloantigenen Eigenschaften des „Human-Platelet-Alloantigen“ (HPA) HPA-2a/2b [60]. HPA-2 spielt eine Rolle in der Pathogenese der neonatalen Alloimmunthrombozytopenie sowie bei dem Phänomen des Refraktärzustandes gegenüber Thrombozytentransfusionen [60]. Vom Glykoprotein Gplb α gibt es vier Variationen von unterschiedlichem Molekulargewicht [75]. Diese Variationen sind Folge des VNTR-Polymorphismus („Variable-Number-of-Tandem-Repeats“-Polymorphismus), einer variablen Wiederholung einer Sequenz von 39 Basenpaaren in dem Abschnitt des Gplb α -Gens, welcher die Makroglykopeptid-Region kodiert. Abhängig vom jeweiligen VNTR-Polymorphismus enthält das Protein eine (Variante D), zwei (Variante C), drei (Variante B) oder vier (Variante A) Wiederholungen der aus 13 Aminosäuren bestehenden Sequenz [67].

Innerhalb der Kozak-Sequenz des Gplb α -Gens wurde an Position -5 vor dem Initiatorcodon ATG ein T₍₋₅₎C-Dimorphismus entdeckt [47]. Variationen innerhalb der Kozak-Sequenz bei Eukaryoten können Einfluss auf die Proteintranslation besitzen [54]. Der Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus des Gplb α -Gens basiert auf dem Vorliegen von Thymin (T) oder Cytosin (C) an Position -5 vor dem ATG-Initiatorcodon [47].

1.5 Fragestellung der vorliegenden Studie

In der vorliegenden Studie wurde untersucht ob der Gplb α -T₍₋₅₎C-Genpolymorphismus (Kozak-Sequenz-Polymorphismus) einen potentiellen Einfluss auf das Risiko und den Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit (KHK) besitzt. Es wurde versucht, die klinische Relevanz des Gplb α -T₍₋₅₎C-Genpolymorphismus für die Koronare Herzkrankheit und den Myokardinfarkt zu erfassen.

2 Material

2.1 Technische Hilfsmittel

2.1.1 Kleinmaterial

Mikroreaktionsgefäße (Ultra-Tubes), 0,65 ml, silikonisiert, Fa. Roth[®], Karlsruhe

Mikroreaktionsgefäße (Ultra-Tubes), 1,7 ml, silikonisiert, Fa. Roth[®], Karlsruhe

Parafilm, Fa. American Can[®], Greenwich, USA

Pipettenspitzen, weiß, Fa. Sarstedt[®], Nümbrecht

Pipettenspitzen, gelb, Fa. Sarstedt[®], Nümbrecht

Polaroidfilm, Typ 667 Professional, Fa. Polaroid[®], St. Albans/Hertfordshire, U.K.

2.1.2 Geräte

Autoklav, Fa. Melag GmbH[®], Berlin

Behring-Nephelometer, Fa. Behring AG[®], Marburg

BM/Hitachi System 717, Fa. Boehringer[®], Mannheim

DNA-Thermocycler Gene-Amp PCR System 9600, Fa. Perkin Elmer[®], Vaterstetten

Elektrophorese-Kammern, Fa. Biometra[®], Göttingen

Feinwaage, Fa. Mettler-Toledo[®], Giessen

Grobwaage, Fa. Sartorius[®], Göttingen

Kamera, Sofortbildkamera Quick Shooter QSP 46400, Fa. Polaroid[®], St. Albans/
Hertfordshire U.K.

Mikrowelle, Fa. Bosch[®], München

Netzgerät, Fa. Shandon[®], Frankfurt

pH-Meter CG 840, Fa. Schott[®], Hofheim a. Taunus

Pipette, 0,5-10 µl, (Gilson), Fa. Abimed[®], Langenfeld

Pipette, 10-100 µl, (Gilson), Fa. Abimed[®], Langenfeld

Pipette, 100-1000 µl, (Gilson), Fa. Abimed[®], Langenfeld

Sequenzierung, ABI PRISM™ 373 DNA Sequencer, Fa. Applied Biosystems[®],
Weiterstadt

UV-Tisch (DNA-Transluminator), Fa. Renner[®], Darmstadt

Vortex-Schüttler IKA-VIBRO-FIX VF2, Fa. IKA[®], Staufen

Wasserbad, Fa. Julabo[®], Seelbach

Zentrifuge (Biofuge 13), Fa. Heraeus[®], Osterode

2.2 Reagenzien

Agarose NuSieve, Fa. FMC/Biozym[®], Hessisch Oldendorf

Agarose Biozym, Fa. FMC/Biozym[®], Hessisch Oldendorf

Apolipoprotein-Kontroll-Serum CHD (human), Behringwerke AG[®], Marburg

Aqua dest, Fa. Braun[®], Melsungen

Bromphenolblau, Firma Sigma Chemie GmbH[®], Deisenhofen

Ethidiumbromid, Fa. Sigma Chemie GmbH[®], Deisenhofen

Testkit zur Cholesterin-Bestimmung, Fa. Boehringer GmbH[®], Mannheim

Desoxynukleotide (dNTPs), Fa. Pharmacia[®], Freiburg

DNA-Molekülmarker V, Fa. Boehringer[®], Mannheim

Lysis Puffer K: Gelatine, Fa. Merck[®], Darmstadt

KCl, Fa. Merck[®], Darmstadt

MgCl₂, Fa. Merck[®], Darmstadt

Tris-HCl, Fa. USB[®], Bad Homburg

Tween 20, Fa. Sigma Chemie GmbH[®], Deisenhofen

N Antiserum gegen Human-Apolipoprotein A-I, Behringwerke AG[®], Marburg

N Antiserum gegen Human-Apolipoprotein B, Behringwerke AG[®], Marburg

N Apolipoprotein-Standard-Serum (human), Behringwerke AG[®], Marburg

PIPES-Puffer, Fa. Boehringer GmbH[®], Mannheim

Sequenzierungs-Kit, Fa. Perkin Elmer[®], Vaterstetten

Testkit zur Cholesterin-Bestimmung, Fa. Boehringer[®], Mannheim

TAE-Puffer: EDTA, Fa. Merck[®], Darmstadt

Tris-Acetat, Fa. USB[®], Bad Homburg

TE-Puffer: EDTA, Fa. Merck[®], Darmstadt

TRIS-HCl, Fa. USB[®], Bad Homburg

Triglycerid-Reaktionsgemisch, Fa. Boehringer GmbH[®], Mannheim

2.3 Enzyme

Taq-Gold-Polymerase, Fa. Perkin Elmer[®], Vaterstetten

Restriktions-Endonuklease PpuMi, Fa. New England Biolabs Inc.[®], Ipswich, USA

2.4 Primer

spezifische Primer, Fa. MWG Biotech AG[®], Ebersberg

2.5 Software

SPSS[®] Inc. Version 9.0, Fa. SPSS Inc.[®], Chicago, USA

Microsoft[®] Word 2002, Fa. Microsoft Corporation[®], Redmond, USA

Microsoft[®] Excel 2002, Fa. Microsoft Corporation[®], Redmond, USA

CorelDRAW[®] Graphics Suite 12, Fa. Corel Corporation[®], Ontario, Kanada

Open Office[®].org 2.0, Fa. Sun Microsystems Inc.[®], Santa Clara, USA

Agfa Scan Wise[®] 2.0, Fa. Agfa-Gevaert[®], Mortsel, Belgien

3 Methoden

3.1 Studienpopulation

Das potentielle Risiko des Gpl β -T₍₋₅₎C-Polymorphismus des Gpl β -Gens (Kozak-Sequenz-Polymorphismus) für das Risiko und den Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit (KHK) wurde in den *Instituten für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin* und *für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Justus-Liebig-Universität Gießen* bei 3015 männlichen Patienten analysiert. 2492 Studienteilnehmer wurden einer Koronarangiographie unterzogen, welche in den *Kardiologischen Abteilungen der Medizinischen Klinik der Justus-Liebig-Universität Gießen bzw. der Kerckhoff-Klinik Bad Nauheim* durchgeführt wurde. In 80% der Fälle erfolgte die Koronarangiographie aufgrund des Verdachts auf eine Koronare Herzkrankheit, in 20% der Fälle wurde die Koronarangiographie zur Klärung einer reduzierten linksventrikulären Pumpfunktion (LV-Funktion) durchgeführt. Bei 98% der Patienten mit reduzierter LV-Funktion wurde eine KHK, bei 2% eine dilatative Kardiomyopathie diagnostiziert. Die Kontrollgruppe bestand aus 523 Probanden ohne Erkrankungen des Herzens und der arteriellen Gefäße mit vergleichbarem ethnischen und demographischen Hintergrund. Die gefäßgesunden Probanden der Kontrollgruppe wurden mit Hilfe des „Rose Questionnaire“ identifiziert [90]. Probanden mit Verdacht auf eine Gefäß-erkrankung wurden ausgeschlossen. Die Anamnese der Kontrollindividuen durfte keine Hinweise auf Angina pectoris, Apoplex, Myokardinfarkt oder andere vaskuläre Ereignisse besitzen. Voraussetzung zur Teilnahme an der Studie war das Einverständnis der Probanden. Jeder Studienteilnehmer wurde einer detaillierten, standardisierten Befragung bezüglich Gefäßerkrankungen, Angina pectoris, Herzinfarkt, nicht-kardiovaskulären Vorerkrankungen, Zigarettenkonsum, arteriellem Hypertonus, Diabetes mellitus und Medikamenten unterzogen. Die anamnestisch erhobenen Angaben wurden durch Daten und Befunde aus den Patientenakten ergänzt, bzw. verifiziert (Arztbriefe, EKG-, Labor-, Echokardiographie-, Koronarangiographie-, Szintigraphie-Befunde etc.). Abgelaufene Herzinfarkte wurden in Anzahl, Zeitpunkt (Lebensalter) und Lokalisation ermittelt. Bereits durchgeführte therapeutische Interventionen wie z.B. eine PTCA (perkutane transluminale koronare Angioplastie) oder eine ACB-OP (aortokoronare Bypassoperation), wurden ebenfalls in Anzahl und Zeitpunkt der Durchführung in die Datensammlung mit aufgenommen. Der Zigarettenkonsum wurde quantitativ in „pack years“ angegeben (1 pack year =

20 Zigaretten pro Tag für ein Jahr). Arterielle Hypertonie und Diabetes mellitus wurden als binäre Variablen definiert. Körpergröße (in m = Meter) und Körpergewicht (in kg = Kilogramm) der Patienten wurden zur Berechnung des Body-mass-index (BMI) bestimmt ($BMI = \text{Körpergewicht (kg)} / [\text{Körpergröße}]^2 \text{ (m}^2\text{)}$); (Norm: BMI 20-25 kg/m²; Adipositas Grad 1: BMI > 25-30 kg/m²; Adipositas Grad 2: BMI > 30-40 kg/m²; Adipositas Grad 3: BMI > 40 kg/m²).

3.2 Diagnose der Koronaren Herzkrankheit

Die Koronare Herzkrankheit ist eine durch Atherosklerose der Herzkranzgefäße bedingte Erkrankung, welche ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffverbrauch des Herzmuskels, dem Myokard, zur Folge hat [92]. Die Hauptrisikofaktoren für die Entstehung der Koronaren Herzkrankheit sind arterieller Hypertonus, Hyperlipidämie, Diabetes mellitus und Zigarettenkonsum [92]. Als weitere gesicherte Risikofaktoren sind Alter, familiäre genetische Disposition, Adipositas, Hyperfibrinogenämie, Bewegungsmangel, männliches Geschlecht, terminale Niereninsuffizienz und Hyperhomocysteinämie anzusehen [109].

Die Atherosklerose unterliegt einer multifaktoriellen Genese. Als weitestgehend anerkannt gilt die von Ross et al. postulierte „Response to injury“ Hypothese [92]. Nach Ross et al. führt eine Endothelläsion einer Arterie zu einer Monozytenaktivierung, was Lipidablagerungen im Bereich der Endothelläsion zur Folge hat. Eine zusätzliche Aktivierung von Thrombozyten mit Freisetzung verschiedener Mediatoren bewirkt eine Migration von glatten Muskelzellen zum Läsionsort mit konsekutiver Proliferation. Schließlich entsteht ein atherosklerotischer Plaque [92]. Dieser Prozess kann bereits im ersten Lebensjahrzehnt beginnen und sich in den so genannten „fatty streaks“, Fettstreifen, in der Aortenwand widerspiegeln [92]. Führen die atherosklerotischen Plaques zu einer Lumeneinengung von $\geq 50\%$, so wird die Atherosklerose klinisch manifest [52]. An den Herzkranzgefäßen findet sich die Atherosklerose bevorzugt in den proximalen Gefäßabschnitten und an Aufzweigungsstellen [85]. Die wichtigsten klinischen Manifestationsformen sind die Angina pectoris, der Myokardinfarkt sowie Herzrhythmusstörungen bis hin zum plötzlichen Herztod [6, 37]. Klinisch findet sich ein Druck- oder Engegefühl hinter dem Brustbein, das häufig in den linken Arm ausstrahlt. Die Ausstrahlung der Schmerzen kann auch in den rechten Arm, in das Epigastrium, in den Hals oder zwischen die Schultern erfolgen. Typisch für die einfache, stabile Angina pectoris ist ein

belastungsabhängiges Auftreten und eine Besserung oder Sistieren der Symptomatik in Ruhe sowie auf Gabe von Glycerolnitraten. Häufig klagen die Patienten auch über Belastungsdyspnoe und eine reduzierte körperliche Belastbarkeit. Die Diagnose der Angina pectoris, bzw. der Koronaren Herzkrankheit ist bei alleiniger Verwendung klinischer Kriterien schwierig, da differentialdiagnostisch auch Erkrankungen anderer thorakaler Organe zu berücksichtigen sind [37].

Die Diagnostik der Koronaren Herzkrankheit besteht neben der Anamnese und klinischen Untersuchung aus nicht-invasiven und invasiven diagnostischen Verfahren. Zu den nicht-invasiven Diagnoseverfahren gehören das Ruhe-Elektrokardiogramm (Ruhe-EKG), laborchemische Analysen (Bestimmung von CK, CK-MB, Troponin), das Belastungs-Elektrokardiogramm (Belastungs-EKG) und die transthorakale Echokardiographie (TTE). Ergänzende Verfahren sind die Stressechokardiographie, die Myokardperfusionsszintigraphie, die Positronenemissionstomographie (PET) sowie die Kardio-Magnetresonanztomographie (Kardio-MRT) und Kardio-Computertomographie (Kardio-CT) [27, 37, 40]. Die invasive Diagnostikmethode und zugleich der diagnostische Goldstandard zur Sicherung der Verdachtsdiagnose KHK ist die Koronarangiographie. Die Koronarangiographie ermöglicht eine selektive Darstellung der Koronararterien und Beurteilung von Ausmaß und Lokalisation koronarer Gefäßverengungen [6, 27, 37, 40].

Die Koronarangiographien der 2492 Patienten wurden in den *Abteilungen für Kardiologie und Angiologie der JLU-Gießen bzw. der Kerckhoff-Klinik Bad Nauheim* durchgeführt. Nach Vorbereitung und Aufklärung der Patienten erfolgte die Koronarangiographie in Seldinger-Technik perkutan über die rechte Arteria femoralis [7]. In Ausnahmefällen wurde die rechte Arteria brachialis oder linke Arteria femoralis punktiert. Über eine Einführschleuse und einen Führungsdraht wurde ein Angiographiekatheter unter Durchleuchtungskontrolle bis vor die Abgänge der beiden Nierenarterien vorgeschoben. Nach Aspiration und Spülung mit Heparin wurde der Katheter unter Durchleuchtungskontrolle und kontinuierlicher Überwachung des arteriellen Blutdrucks und des EKG zunächst in die linke Koronararterie vorgeschoben. Nach Injektion von Kontrastmittel ließ sich die Lokalisation und Ausprägung der Koronarstenosen beurteilen. Die Koronararterien wurden in mehreren rechtsanterioren (RAO), linksanterioren (LAO), axialen und hemiaxialen Ebenen dargestellt und mittels Filmkamera aufgenommen. Die Darstellung der rechten Koronararterie erfolgte in analoger Vorgehensweise. Neben der angio-

graphischen Darstellung der Koronararterien erfolgte eine Messung des linksventrikulären Drucks und eine Ventrikulographie des linken Ventrikels mittels Kontrastmittelinjektion. Hierdurch konnte die enddiastolische und endsystolische Größe des linken Ventrikels, die globale und regionale Myokardkontraktion sowie die Mitralklappe beurteilt werden. Nach Beendigung der Untersuchung und Entfernung der Katheter und der Einführschleuse wurde ein Kompressionsverband angelegt. Koronargefäße mit einem Stenosierungsgrad von $\geq 50\%$ wurden als erkrankt definiert. Je nach Lokalisation der Stenose bzw. Stenosen wurde die Koronare Herzkrankheit in eine Null-, Eins-, Zwei- oder Dreifäßerkrankung eingeteilt. Eine genauere Schweregradeinteilung der KHK erfolgte durch Verwendung des Gensini-Score (GS) [35, 36]. Dieses Scoring-System berücksichtigt die unterschiedliche funktionelle Signifikanz einer Koronarstenose, welche durch das jeweils vermindert perfundierte Myokardareal bestimmt wird. Je nach Stenosegrad und Segmentlokalisierung der Stenose wird ein Wert von 1 bis 32 zugeteilt (Severity-Score), der dann in Abhängigkeit von der vitalen Bedeutung des betroffenen Segments mit einem Faktor multipliziert wird (s. Abb. 2, S. 17 und Tab. 1, S. 18). Beispiel: Für das distale Segment der RCA (3) ergibt sich bei einer 75%igen Stenose ein Gensini-Score (GS) von $4 \times 1 = 4$, wohingegen eine 75%ige Stenose des proximalen Segments der LAD (6) einen GS von $4 \times 2,5 = 10$ ergibt.

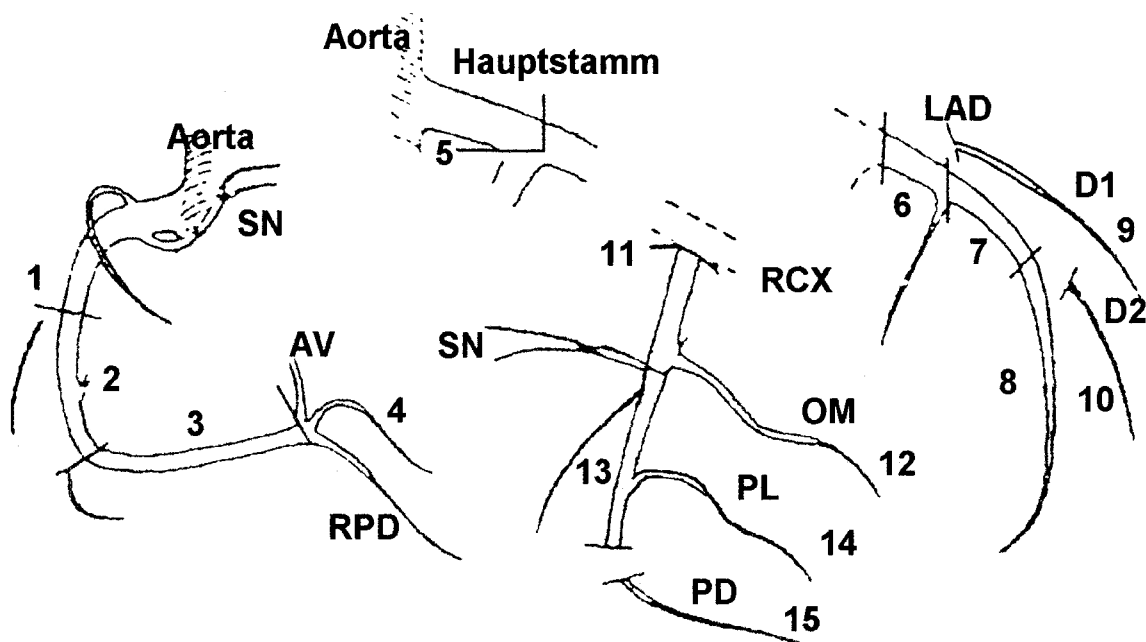


Abb. 2 : Nomenklatur der Koronararteriensegmente

RCA Right Coronary Artery / A. coronaria dextra: 1: proximales Segment, 2: mittleres Segment, 3: distales Segment, 4: RPD Right Posterior Descending; 5: LCA Left Coronary Artery / A. coronaria sinistra; LAD Left Anterior Descending: 6: proximales Segment, 7: mittleres Segment, 8: distales Segment, 9: D1, First Diagonal / Erster Diagonalast, 10: D2, Second Diagonal / Zweiter Diagonalast; RCX Ramus circumflexus: 11: proximales Segment, 12: OM Obtuse Marginal / R. marginalis sinister, 13: distales Segment, 14: PL, Posterolateral / R. posterior ventriculi sinistri, 15: PD, Posterior Descending, R. interventricularis posterior (wenn R. interventricularis posterior aus der A. coronaria sinistra entspringt / Linksversorgertyp). Abkürzungen: A. = Arteria; R. = Ramus.

Tab. 1: Ermittlung des Gensini-Scores

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

Koronararteriensegmente	Faktor
RCA Right Coronary Artery / A. coronaria dextra	
1. proximales Segment	X 1,0
2. mittleres Segment	X 1,0
3. distales Segment	X 1,0
4. RPD Right Posterior Descending / R. interventricularis posterior	X 1,0
5. LCA Left Coronary Artery / A. coronaria sinistra	X 5,0
LAD Left Anterior Descending / R. interventricularis anterior	
6. proximales Segment	X 2,5
7. mittleres Segment	X 1,5
8. distales Segment	X 1,0
9. D1 First Diagonal / 1. R. lateralis	X 1,0
10. D2 Second Diagonal / 2. R. lateralis	X 0,5
RCX Ramus circumflexus	
11. proximales Segment	X 1,0
12. OM Obtuse Marginal / R. marginalis sinister	X 1,0
13. distales Segment	X 1,0
14. PL Posterolateral / R. posterior ventriculi sinistri	X 0,5

Koronararteriensegmente	Faktor
15. PD Posterior Descending / R. Interventricularis posterior (Linksversorgertyp)	X 1,0

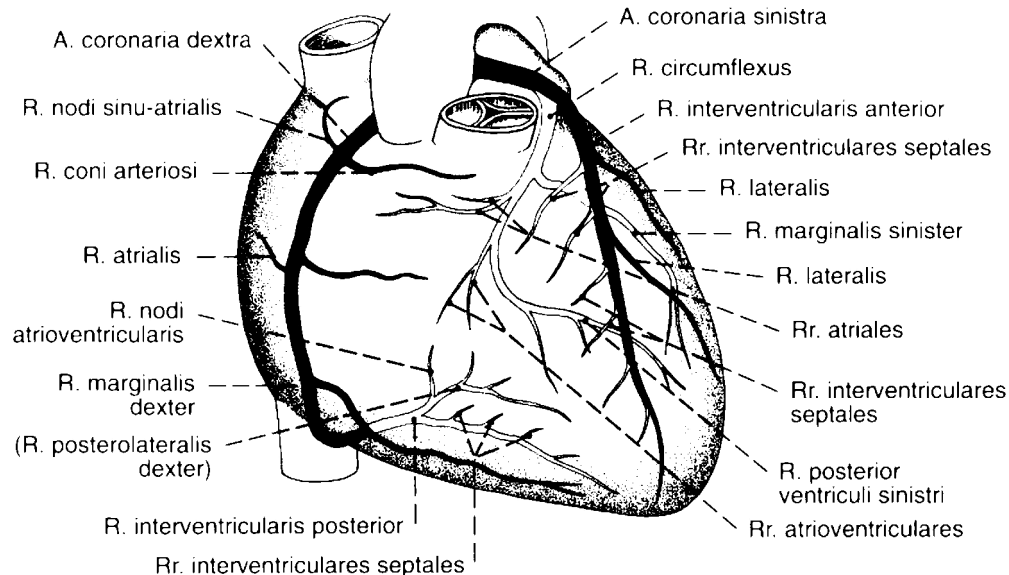


Abb. 3: Anatomie der Koronararterien

Modifiziert nach Sobotta, Atlas der Anatomie des Menschen, Band 2; 20 Auflage, 1993.

3.3 Messung von etablierten Risikofaktoren der Koronaren Herzkrankheit

Vor der Durchführung der Koronarangiographie wurde jedem Patienten eine EDTA-, Serum- sowie Plasma-Blutprobe abgenommen. Aus den EDTA-Blutproben wurde das Blutbild bestimmt und die DNA isoliert [s. Kap 3.3.6, S. 24]. Die nachfolgend näher beschriebene Messung von Gesamtcholesterin [48], Apolipoprotein B (ApoB) [28], Apolipoprotein A-I (ApoA-I) [28], Lipoprotein (a) (Lp(a)) [43], Fibrinogen [18] sowie von klinisch-chemischen Parametern wie C-reaktives-Protein, Transaminasen u.a. erfolgte aus den Serum-, bzw. Plasma-Blutproben.

3.3.1 Gesamtcholesterin

Die Bestimmung des Gesamtcholesterins erfolgt in der Regel zur Beurteilung des Atherosklerose-Risikos, bzw. zur Therapiekontrolle bei Hypercholesterinämie [48].

Der präventivmedizinische Zielwert liegt bei Herzgesunden unterhalb von 200 mg/dl. Oberhalb von 200 mg/dl steigt die Infarktmorbidität steil an und zeigt bei 250 mg/dl eine Verdopplung, bei 300 mg/dl sogar eine Vervierfachung im Vergleich zum Risiko bei 200 mg/dl. Bei einer atherogenen Konstellation der Cholesterinfraktionen (HDL-Cholesterin < 35 mg/dl bzw. LDL-Cholesterin >150 mg/dl) ist auch bei normalem Gesamtcholesterin das Herzinfarkttrisiko erhöht. Gleiches gilt bei erhöhten Triglyceriden in Kombination mit erniedrigten HDL-Cholesterin. Eine Hypercholesterinämie ist meistens sekundärer Genese: alimentär bedingt, bei Diabetes mellitus, bei Nephropathien, bei Hypothyreose u. a. Ursachen [40, 103, 108]. Nur in 1 von 500 Fällen findet sich eine familiäre Hypercholesterinämie.

Bestimmungsmethode:

Die Serumkonzentration von Cholesterin wurde am klinisch-chemischen Analysator Hitachi 717 der Fa. Boehringer® gemessen. Es wurden 3 µl Probevolumen mit 250 µl Cholesterin-Reagenz (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; Fettalkoholpolyglykoether: 1%; Cholesterin-Esterase: 0,5 U/ml; Cholesterin-Oxidase: 0,15 U/ml; Peroxidase: 0,25 U/ml) versetzt und basierend auf der nachfolgend aufgeführten Reaktionsgleichung bei einer Temperatur von 37 °C und einer Wellenlänge von 700 nm photometrisch gemessen.

Cholesterinester + H₂O ►

Cholesterinesterase ► Cholesterin + RCOOH

Cholesterin + O₂ ►

Cholesterinoxidase ► Δ⁴-Cholestenon + H₂O

2H₂O₂ + 4-Aminophenazon + Phenol ►

Peroxidase ► 4-(p-Benzochinonmonoimino)-phenazon + 4H₂O

3.3.2 Triglyceride

Die Bestimmung der Triglyceride erfolgt in der Regel zur Beurteilung des Atherosklerose-Risikos, bzw. zur Klassifikation und Therapiekontrolle von Hyperlipo-

proteinämien. Der präventivmedizinische Zielwert liegt bei Herzgesunden < 150 mg/dl. Oberhalb von 200 mg/dl liegt definitionsgemäß eine Hypertriglyceridämie vor [6, 11, 34]

Bestimmungsmethode:

Die Triglycerid-Serumkonzentration wurde mit dem klinisch-chemischen Analysator Hitachi 717 der Fa. Boehringer[®] gemessen. Der Test beruht auf der enzymatischen Spaltung der Triglyceride mit nachfolgender Bestimmung des entstandenen Glycerin-3-Phosphats mittels enzymatischer Farbreaktion. Dazu wurden 3 μ l Probevolumen und 300 μ l Reaktionsgemisch (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%; Kaliumhexacyanoferrat(II): 6 mmol/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: 0,15 U/ml) verwendet und basierend auf der nachfolgend aufgeführten Reaktionsgleichung bei einer Temperatur von 37 °C und einer Wellenlänge von 700 nm photometrisch gemessen.

Triglyceride + 3 H₂O ►

Lipase ► Glycerin + RCOOH

Glycerin + ATP ►

Glycerokinase ► Glycerin-3-phosphat + ADP

Glycerin-3-phosphat + O₂ ►

Glycerinphosphatoxidase ► Dihydroxyacetonphosphat + H₂O₂

H₂O₂ + 4-Aminophenazon + 4-Chlorphenol ►

Peroxidase ► 4-(p-Benzochinonmonoimino)-phenazon + 2 H₂O + HCl

3.3.3 Lipoprotein (a)

Lipoprotein (a) (Lp(a), „Lipoprotein-assoziiertes Antigen“) besteht aus einem LDL-Partikel, an dessen Hauptproteinbestandteil ApoB-100 ein weiteres Apoprotein, das Apo(a)-Antigen, über Disulfidbrücken gebunden ist [107]. Der Apo(a)-Anteil weist

eine hohe Strukturähnlichkeit mit Plasminogen auf [70]. Erhöhte Lp(a)-Serumspiegel sind ein unabhängiger genetischer Risikofaktor für die Atherosklerose und den Herzinfarkt, wobei Prävalenz und Schweregrad mit der Höhe des Serumspiegels von Lp(a) korrelieren [40, 42, 100]. Die atherogenen Mechanismen von Lp(a) beruhen sehr wahrscheinlich auf der hohen Plasminogen-Strukturhomologie [70]. Durch die Bindung an Plasminrezeptoren von Endothelzellen kommt es zur gesteigerten Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-Expression und gesteigerten α_2 -Antiplasmin-Aktivität. Dies führt zur Hemmung der lokalen Thrombolyse im Endothelbereich, wodurch eine Plaquebildung begünstigt wird. Bei einer Lp(a)-Serumkonzentrationen > 30 mg/dl besteht ein zweifach erhöhtes, bei gleichzeitig erhöhtem LDL-Cholesterin ein fünffach erhöhtes relatives Atherosklerose-Risiko [103]. Da die Lp(a)-Serumkonzentration durch Diät und lipidsenkende Medikamente kaum zu beeinflussen ist, ist eine Senkung der übrigen Risikofaktoren, insbesondere des LDL-Cholesterins, anzustreben [111].

Bestimmungsmethode:

Das Prinzip der quantitativen Bestimmung von Lp(a) in Humanserum mittels Nephelometrie am Nephelometer der Fa. Behring® beruht auf der Agglutination von Lp(a) im Probenmaterial mit Polysterolpartikel-gebundenen Antikörpern gegen Human-Lp(a). Aus patentrechtlichen Gründen können die Konzentrationen, Reaktionspartner sowie die Zusammensetzungen der Reaktionspuffer nicht angegeben werden.

3.3.4 Apolipoprotein A-I und Apolipoprotein B

Die kombinierte Bestimmung der Apolipoproteine A-I (ApoA-I) und B (ApoB) ergänzt die konventionelle Lipidbestimmung und erhöht die prognostische Aussagekraft bezüglich des Atherosklerose-Risikos im Vergleich zur alleinigen Bestimmung des HDL- und LDL-Cholesterins [53, 100, 103]. Der Quotient aus ApoB/ApoA-I gilt als wichtiger Parameter. Die Bestimmung von ApoB ermöglicht die Diagnose genetisch bedingter Fettstoffwechselstörungen, welche mit einem erhöhten Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen einhergehen, da hierbei die LDL-Cholesterinkonzentrationen und die Triglyceridekonzentrationen im Serum im Normalbereich liegen können.

3.3.4.1 Apolipoprotein A-I

Apolipoprotein A-I bildet die Hauptproteinkomponente (ca. 65%) am Gesamtprotein der antiatherogenen HDL (high density lipoprotein) [89, 103] und aktiviert die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT), welche die Veresterung von Cholesterin aus peripheren Zellen und Gefäßwänden katalysiert [38]. Das veresterte Cholesterin wird durch die HDL-Partikel zur Leber transportiert und verstoffwechselt. Erniedrigte ApoA-I-Konzentrationen bzw. Erhöhungen des Quotienten ApoB/ApoA-I sind ein Risikofaktor für atherosklerotische Prozesse [88, 103].

3.3.4.2 Apolipoprotein B

Apolipoprotein B bildet die Hauptproteinkomponente (ca. 95%) am Gesamtprotein des atherogenen LDL (low density lipoprotein) [89, 103]. ApoB ist für die Interaktion mit LDL-Rezeptoren in der Leber und an Zellwänden notwendig und am Transport von Cholesterin in Zellen der Gefäßwand beteiligt. Erhöhte ApoB-Konzentrationen sind ein Risikofaktor für die Atherosklerose.

Bestimmungsmethoden:

In einer immunochemischen Reaktion zwischen den im Serum enthaltenen Apolipoproteinen und spezifischen Antikörpern entstehen Immunkomplexe, an denen eingestrahktes Licht in einem Nephelometer der Fa. Behring® gestreut wird. Die Konzentration des jeweiligen Apolipoproteins in der Probe bestimmt die Intensität des Streulichts und kann durch Vergleich mit einem Standard bekannter Konzentration ermittelt werden. Aus patentrechtlichen Gründen können die Konzentrationen, Reaktionspartner sowie die Zusammensetzungen der Reaktionspuffer nicht angegeben werden.

3.3.5 Fibrinogen

Das in der Leber gebildete Fibrinogen ist das Substrat des Thrombins, Plasmins und der Elastase. Fibrinogen gehört zur Gruppe der Akute-Phase-Proteine und steigt bei entzündlichen Reaktionen mit einer Verzögerung von 24 - 48 Stunden auf abnorm hohe Konzentrationen an. Nach Aktivierung der Gerinnungskaskade und der thrombin-katalysierten Abspaltung der Fibrinpeptide A und B von Fibrinogen erfolgt

die Polymerisation zum Fibrin. Die anschließende Faktor-XIII-katalysierte Quervernetzung des Fibrinpolymerisats bewirkt die Ausbildung eines Fibringerinnsels, das wesentlich zur Blutstillung durch Verschluss des Gefäßes beiträgt. Fibrinogen ist ein Risikofaktor für atherosklerotische Erkrankungen [22]. Die Bestimmung des Fibrinogens erfolgt in der Regel bei Verdacht auf eine Blutgerinnungsstörung, zur Überwachung fibrinolytischer Therapien, als präoperatives Screening, als Verlaufskontrolle bei Verbrauchskoagulopathie und Lebererkrankungen sowie zur Abschätzung des Atheroskleroserisikos. Der Referenzbereich im Plasma liegt bei 150 – 450 mg/l.

Bestimmungsmethode:

Die Fibrinogenkonzentration wurde nach der Clauss-Methode [18] mit dem klinisch-chemischen Analysator KC 40 der Fa. Amelung® bestimmt. Die Fibrinogenmessung ist eine Variante der Thrombinzeit-Bestimmung. Citratplasma wurde zunächst soweit verdünnt, dass die Fibrinogenkonzentration 0,1 – 0,5 g/l betrug. In diesem Bereich korreliert die Fibrinogenkonzentration mit der gemessenen Gerinnungszeit. Das verdünnte Citratplasma wurde mit einer hohen Thrombinkonzentration versetzt und die Gerinnungszeit in Sekunden gemessen. Die Fibrinogenkonzentration ist unter definierten Bedingungen zur Bildungsgeschwindigkeit eines Thrombus proportional.

3.3.6 DNA-Isolierung aus EDTA-Blut

Die DNA-Isolierung erfolgte nach der durch Kawasaki et al. beschriebenen Standardmethode aus mit EDTA antikoagulierten Vollblut [49]. Zu jeweils 100 µl EDTA-Vollblut wurde 500 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA) hinzugegeben und anschließend bei 13.000 g für 10 Sekunden zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500 µl TE-Puffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation und nochmaligem Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 100 µl Lysis-Puffer K (100 mM Tris-HCl (pH 8,3); 500 mM KCl; 15 mM MgCl₂; 0,1 % Gelatine; 5% Tween 20; 10 µl frische Proteinase K) resuspendiert und leicht anzentrifugiert. Eine anschließende Inkubation bei 56°C für 45 min bewirkte den Abbau der Proteine durch die Proteinase K. Durch Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 95°C für 10 min wurde die Proteinase K inaktiviert. Nach leichtem

Anzentrifugieren wurde das entstandene Kern-Lysat, die DNA, bei einer Temperatur von -20°C aufbewahrt.

3.7 Genotypisierung der Allele Gpl α -T₍₋₅₎ und -C₍₋₅₎ des Gpl α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus des Gpl α -Gens

3.7.1 Prinzip der Polymerasekettenreaktion - PCR

Die Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ermöglicht es, DNA-Abschnitte eines Genoms gezielt zu vervielfältigen und einzelne Allele einer genauen Analyse zu unterziehen. Voraussetzung für diese Vervielfältigung ist, dass man die DNA-Sequenzen, welche die zu untersuchende Region umgeben, kennt [79]. Die PCR-Methode wurde im Jahre 1985 von K. B. Mullis entwickelt [77, 78]. Als Grundprinzip liegt der PCR ein dreistufiger Temperaturzyklus aus Denaturierung, Annealing und Elongation zugrunde. Eine doppelsträngige DNA-Matrize (dsDNA, DNA-template) wird bei einer Temperatur von 95°C zu einsträngiger DNA (ssDNA) denaturiert. Nach einer Temperaturabsenkung auf 60°C bis 40°C lagern sich am 5'-Ende und am 3'-Ende des zu amplifizierenden Bereichs spezifische Oligonukleotidmoleküle, die Primer, an. Dabei handelt es sich um kurze, einzelsträngige DNA-Moleküle, die komplementär zu den Enden einer definierten Sequenz der DNA-Matrize sind. Die Primeranlagerung an die komplementären Sequenzen der DNA-Matrize bezeichnet man als Annealing. In der folgenden Elongationsphase bei 65°C bis 75°C werden die Primer in Anwesenheit freier Desoxynukleosid-Triphosphate (dNTP) von einer DNA-abhängigen thermostabilen DNA-Polymerase in 5'-3'-Richtung verlängert. Die DNA-Polymerase elongiert den entstehenden DNA-Doppelstrang solange, bis sie von der DNA abfällt oder die Reaktion unterbrochen wird. Hierbei wird der Reaktionsabbruch durch eine Erhöhung der Inkubationstemperatur auf z.B. 95°C erreicht. Bei diesen hohen Temperaturen kommt es auch zur erneuten Denaturierung der entstanden doppelsträngigen DNA. Wird der Ansatz in Anwesenheit freier Primer wieder auf 60°C bis 40°C abgekühlt, so binden die Primer erneut an die komplementären Sequenzen der DNA-Matrize und die Synthese eines weiteren Doppelstranges kann erfolgen. Nach dem zweiten Zyklus entstehen Fragmente, die genau der Länge des zu amplifizierenden Bereichs entsprechen. Diese Fragmente werden in weiteren PCR-Zyklen exponentiell vermehrt, bis sich

durch die Akkumulation von PCR-Produkten, durch eine verminderte Aktivität der Polymerase sowie durch den Verbrauch von Reaktionskomponenten ein „Plateau-Effekt“ einstellt. Ein Zyklus (Denaturierung, Annealing, Elongation) wird zwanzig- bis vierzigmal wiederholt. Das amplifizierte PCR-Produkt (Amplikon) kann mit Hilfe der Gelelektrophorese (s. Abb. 5, Abb. 6, S. 32) aufgetrennt und dargestellt werden.

3.7.2 Verschachtelte Polymerasekettenreaktion - Nested-PCR

Die Nested-PCR-Methode ermöglicht es, die Sensitivität und Spezifität der DNA-Amplifizierung zu erhöhen. Das in einer ersten PCR gewonnene PCR-Produkt wird als Matrize für eine weitere PCR verwendet. Die Nested-PCR-Primer hybridisieren innerhalb des Abschnitts, welcher durch die in der ersten PCR verwendeten Primer vorgegeben wird. Es ist auch möglich, nur einen Nested-PCR-Primer zu verwenden und einen Primer der ersten PCR beizubehalten. Der Vorteil der Nested-PCR Methode liegt darin, dass fehlerhafte Kopien unberücksichtigt bleiben, da die Anzahl ihrer komplementären Sequenzen für die Nested-PCR-Primer stark vermindert ist, und sie somit nicht mehr als Matrize verwendet werden. Die Spezifität für die Zielsequenz wird hierdurch um ein Vielfaches erhöht [39, 79].

3.7.3 Prinzip der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse - RFLP

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen, die an spezifischen Erkennungssequenzen die jeweilige DNA spalten. Das nach Durchführung einer PCR gewonnene Amplifikat wird mit einem entsprechenden Restriktionsenzym versetzt und nach einer bestimmten Inkubationszeit mittels elektrophoretischer Auftrennung analysiert [82].

3.7.4 Prinzip der Agarose-Gel-Elektrophorese

Bei der Gelelektrophorese handelt es sich um eine analytische Methode, welche es ermöglicht, Moleküle voneinander zu trennen. Die zu trennenden Moleküle wandern unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes durch ein Gel, welches in einer ionischen Pufferlösung liegt. Die Wanderungsgeschwindigkeit v ist dabei proportional

der Feldstärke E und der Ionenladung Q und umgekehrt proportional dem Teilchenradius r und der Viskosität η der Suspension: $v = QW / 6\pi r\eta$.

Agarose-Gele sind relativ großporig und eignen sich gut zur Trennung von DNA. Aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen wandern DNA-Fragmente im elektrischen Feld zur Anode. Die Molekülgröße, die Form der Moleküle, die Porengröße des Gels sowie die angelegte Spannung bestimmen die Wanderungsgeschwindigkeit. Kleine DNA-Fragmente wandern weiter als große DNA-Fragmente. Gleiche Moleküle laufen in diskreten Zonen, den Banden. Durch Vergleich mit Banden von Molekülen bekannter Größe lässt sich die Größe der untersuchten Moleküle bestimmen.

3.7.5 Durchführung der Polymerasekettenreaktion - PCR

Sämtliche PCR wurden mit dem DNA-Thermocycler Gene-Amp PCR System 9600 der Fa. Perkin Elmer® durchgeführt. Basierend auf der publizierten Gplb α -Gen Sequenz [110] wurden die Gplb α -spezifischen Primer (s. Tab. 3, S. 28 und Tab. 6, S. 29) konstruiert. 5 μ l genomische DNA (400-600 ng) wurden zusammen mit 5 μ l Gene-Amp 10x PCR-Puffer (10mM Tris-HCl (pH8,3); 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,01 mg/ml Gelatine), 8 μ l dNTP (Desoxyribonukleosid-Triphosphate dATP, dGTP, dCTP, dTTP; je 200 μ mol/l), 5 μ l Vorwärtsprimer, *Primer #1* (3369-ATAGATCC-AGGGTCCCCAGCACT-3347; 5mM), 5 μ l Rückwärtsprimer, *Primer #2* (2761-GAGA-GAAGGACGGAGTCGAG-2780; 5mM), 0,6 μ l Taq-Gold-Polymerase (1U / 50 μ l) und Aqua bidest. ad 50 μ l angesetzt. Als Negativ-Kontrolle wurden 50 μ l destilliertes, autoklaviertes Wasser verwendet (s. Tab. 2, S. 28). Nach initialer Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 95°C für 10 Minuten erfolgte die Amplifikationsphase mit 25 Zyklen Denaturierung bei 95°C für 1 Minute, Annealing bei 62°C für 1 Minute und Elongation bei 72°C für 1 Minute. Nach Ablauf der 25 Zyklen folgte eine abschließende Elongation bei 72°C für 10 Minuten, um alle Stränge bis zum Ende zu synthetisieren. Nach Abschluss der PCR wurde ein Produkt der Länge 608 bp (bp: Basenpaare) erhalten. Anschließend wurde die Probe auf 4°C abgekühlt (s. Tab. 4, S. 28). 1 μ l des so erzeugten Amplifikats wurde dann in einem zweiten PCR-Lauf, im Sinne einer Nested-PCR, amplifiziert. Anstelle des *Primer #1* wurde nun der *Primer #3* (3218-GGTTGTGTCTTTTCGGCAGG-3200; 5 mM) verwendet. Der *Primer #2* sowie die übrigen Reagenzien des ersten PCR-Ansatzes wurden in gleicher

Konzentration und gleichem Volumen eingesetzt. Das Volumen des Aqua bidest. wurde entsprechend angepasst (s. Tab. 5, S. 29). Nach initialer Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 95°C für 10 Minuten erfolgte die Amplifikationsphase innerhalb von 32 Zyklen mit Denaturierung bei 95°C für 1 Minute, Annealing bei 60°C für 1 Minute und Elongation bei 72°C für 1 Minute. Nach Ablauf der 32 Zyklen und der abschließenden Elongation bei 72°C für 10 Minuten wurde die Probe auf 4°C abgekühlt (s. Tab. 7, S. 29). Durch die zweistufige PCR erhielt man ein PCR-Produkt mit einer Länge von 457 bp. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte bei einer Temperatur von -20°C.

Tab. 2: Nested-PCR: PCR – Reaktionsansatz I

5 µl Gene-Amp 10x PCR-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl ₂ , 0,01 mg/ml Gelatine
8 µl dNTP	dATP, dGTP, dCTP, dTTP, je 200 µmol/l
5 µl Primer #1	0,3 µmol/l
5 µl Primer #2	0,3 µmol/l
0,6 µl Taq-Gold Polymerase	1 U/50 µl
5 µl genomische DNA	400-600 ng
21,4 µl Aqua bidest.	
Nested-PCR Negativkontrolle	5 µl destilliertes, autoklaviertes Wasser

Tab. 3: Nukleotidsequenzen der Primer des PCR – Reaktionsansatz I

<i>Primer #1</i>	5´-3369-ATAGATCCAGGGTCCCCAGCACT-3347-3´
<i>Primer #2</i>	5´-2761-GAGAGAAGGACGGAGTCGAG-2780-3´

**Tab. 4: Amplifikationsbedingungen Nested-PCR:
Reaktionsbedingungen für Ansatz I**

initiale Denaturierung	95°C für 10 Minuten
Amplifikationsphase mit 25 Zyklen	
Denaturierung	95°C für 1 Minute
Annealing	62°C für 1 Minute

Elongation	72 °C für 1 Minute
nach Ablauf der 25 Zyklen	
Polymerisationsschritt	72 °C für 10 Minuten
Abkühlung	auf 4 °C

Tab. 5: Nested-PCR: PCR – Reaktionsansatz II

5 µl Gene-Amp 10x PCR-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl ₂ , 0,01 mg/ml Gelatine
8 µl dNTP	dATP, dGTP, dCTP, dTTP, je 200 µmol/l
5 µl Primer #2	0,3 µmol/l
5 µl Primer #3	0,3 µmol/l
0,6 µl Taq Gold Polymerase	1 U/ 50 µl
1 µl PCR-Produkt aus PCR – Reaktionsansatz I	
25,4 µl Aqua bidest.	
Nested-PCR Negativkontrolle	5 µl destilliertes, autoklaviertes Wasser

Tab. 6: Nukleotidsequenzen der Primer des PCR – Reaktionsansatz II

<i>Primer #2</i>	5´-2761-GAGAGAAGGACGGAGTCGAG-2780-3´
<i>Primer #3</i>	5´-3218-GGTTGTGTCTTTCGGCAGG-3200-3´

**Tab. 7: Amplifikationsbedingungen Nested-PCR:
Reaktionsbedingungen für Ansatz II**

initiale Denaturierung	95 °C für 10 Minuten
Amplifikationsphase mit 32 Zyklen	
Denaturierung	95 °C für 1 Minute
Annealing	60 °C für 1 Minute
Elongation	72 °C für 1 Minute
nach Ablauf der 32 Zyklen	
Polymerisationsschritt	72 °C für 10 Minuten
Abkühlung	auf 4 °C

3.7.6 Durchführung der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse - RFLP

Das nach Ablauf der Nested-PCR gewonnene PCR-Produkt wurde einer RFLP-Behandlung unterzogen. Hierfür wurde ein Aliquot von 3 µl PCR-Produkt mit 1 µl NEB Puffer (50 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl (pH 7,4); 0,1 mM EDTA; 1 mM DTT; 200 µg/ml BSA; 50% Glycerol), 5 µl H₂O und 1 µl Restriktions-Endonuklease PpuMi angesetzt (s. Tab. 8, S. 30) und für 6 h bei 37°C inkubiert [1]. Die Analyse des RFLP-Produkts erfolgte mittels Gel-Elektrophorese (s. Abb. 5, S. 32). Das Restriktionsenzym PpuMi schneidet (▼/▲) an folgenden DNA-Sequenzen: 5'..G▼G(A/T)CC..-3', 3'..CC(A/T)G▲G..-5'. Das durch die Nested-PCR gewonnene Amplifikat enthält bei Gplβ-C₍₋₅₎-Allelen des Gplβ-T₍₋₅₎C-Polymorphismus zwei Schnittstellen für die Endonuklease PpuMi. Durch den Basenaustausch von Cytosin (C) durch Thymin (T) (Gplβ-T₍₋₅₎-Allel) wird eine weitere Schnittstelle geschaffen. Die Behandlung des Amplifikats mit dem Restriktionsenzym PpuMi führt damit bei den unterschiedlichen Genotypen zu folgenden DNA-Fragmenten (s. Abb. 5, Abb. 6, S. 32): CC-Homozygote: 125bp + 332bp; TT-Homozygote: 125bp + 175bp + 157bp; TC-Heterozygote: 125bp + 332bp + 125bp + 175bp + 157bp.

Tab. 8: RFLP-Ansatz

5 µl H ₂ O	
3 µl PCR-Produkt aus PCR – Reaktionsansatz II	
1 µl NEB Puffer 4	50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, pH 7,9
1 µl Restriktions-Endonuklease PpuMi	

3.7.7 Durchführung der Agarose-Gel-Elektrophorese

Die Analyse der nach Nested-PCR und RFLP-Behandlung gewonnenen PCR-Produkte erfolgte mittels Elektrophorese in 3%igen Agarose-Gelen. Zunächst wurden 750 mg Agarose in 25 ml TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat; 1mM EDTA; pH 8,4) durch

Erhitzen auf dem Magnetrührer gelöst. Nach dem Aufkochen wurden 2,5 µl Ethidiumbromid-Lösung hinzu gegeben (2 µg/ml Ethidiumbromid). Nach Abkühlung auf ca. 50°C wurde das Gel in einen entsprechenden Schlitten gegossen und mit einem Kamm versehen. Nach ca. 30 Minuten war das Gel verfestigt, der Kamm wurde entfernt und die Gelplatte in eine entsprechende mit TAE-Puffer gefüllte Kammer gelegt. Jeweils 5 µl des PCR/RFLP-Produkts wurden mit 2 µl Probenpuffer (900 µl einer 40%igen Saccharoselösung mit 0,25%igem Bromphenol in Aqua bidest und 100 µl 0,5 M EDTA, pH 8,0) vermischt und in die Geltaschen pipettiert. Als Molekulargewichtsstandard wurde der DNA-Molekülmarker V der Fa. Boehringer® verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte über 25 Minuten bei einer Spannung von 100 Volt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die DNA-Banden mit Hilfe eines Transluminators unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotodokumentiert. Der Gplba-T₍₋₅₎C-Polymorphismus stellte sich als homozygoter CC-Genotyp mit 125bp, 332bp dar, als homozygoter TT-Genotyp mit 125bp, 157bp, 175bp und als heterozygoter TC-Genotyp mit den Banden 125bp, 157bp, 175bp, 332bp (s. Abb. 5, Abb. 6, S. 32).

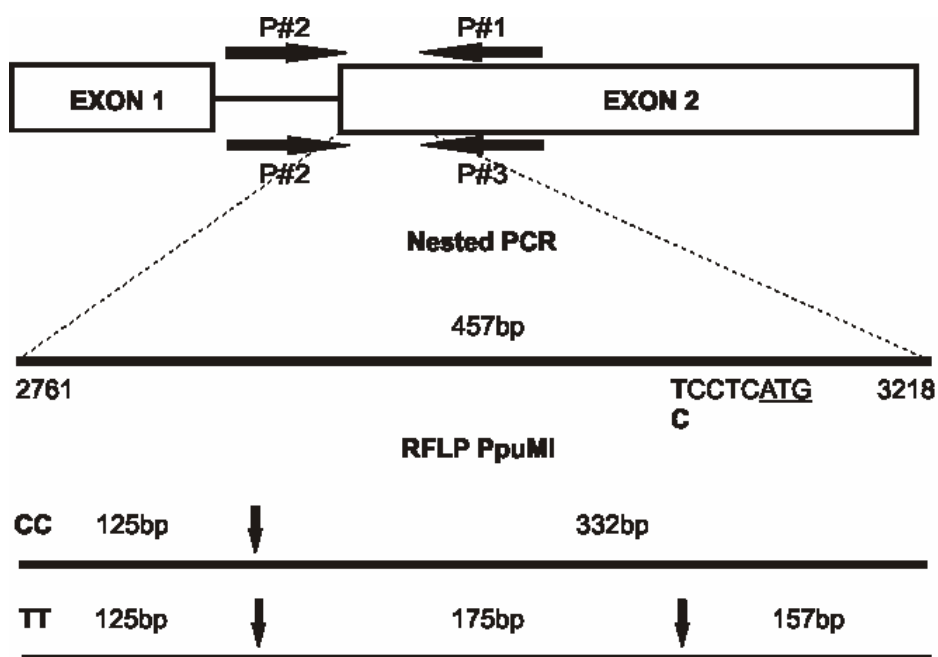


Abb. 4: Genotypisierung des Gplba-T₍₋₅₎C-Genpolymorphismus

Basierend auf der Gplba-Gensequenz wurden die spezifischen Primer (P#1, P#2, P#3) konstruiert. Im PCR-Reaktionsansatz I wurde durch den Einsatz der Primer P#1 und P#2 ein den Gplba-T₍₋₅₎C-Polymorphismus enthaltendes Produkt der Länge 608 bp aus dem Gplba-Gen amplifiziert. In einer zweiten PCR mit Reaktionsansatz II und den Primern P#2 und P#3 wurde ein Produkt der Länge 457

bp erzeugt. Es folgte eine Restriktionsbehandlung mit der Endonuklease PpuMi. Das Gpl β -T₍₋₅₎-Allel welches an Position -5 in Bezug auf das ATG-Startercodon ein T trägt, besitzt eine Schnittstelle für die Endonuklease PpuMi, die sich an der Position -5 im Gpl β -C₍₋₅₎-Allel nicht findet. Nach elektrophoretischer Auftrennung finden sich für den homozygoten CC-Genotyp 2 Banden (125bp, 332bp), für den homozygoten TT-Genotyp 3 Banden (125bp, 157bp, 175bp) und für den heterozygoten TC-Genotyp 4 Banden (125bp, 157bp, 175bp, 332bp).

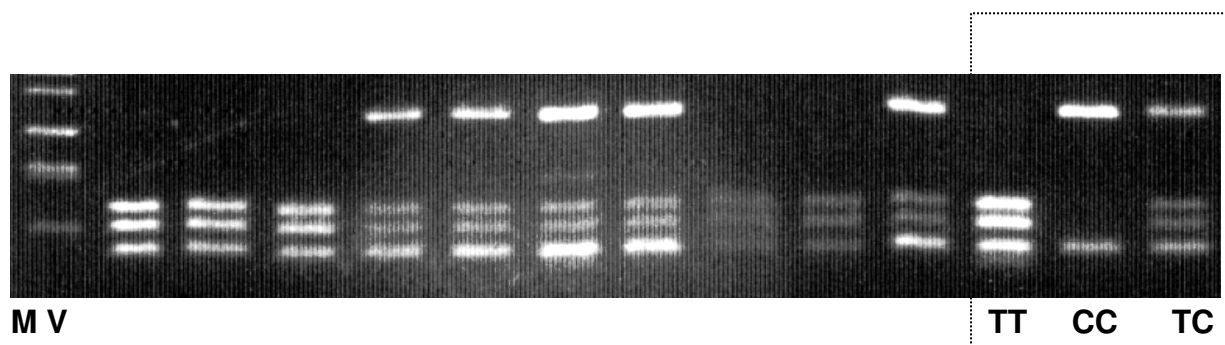


Abb. 5: Fotografische Dokumentation des Produkts der Nested-PCR / RFLP

Genotypen des Gpl β -T₍₋₅₎C-Polymorphismus: TT-Homozygote: 125bp + 157bp + 175bp; CC-Homozygote: 125bp + 332bp; TC-Heterozygote: 125bp + 157bp + 175bp + 332bp; M V: DNA-Molekülmarker V, Fa. Boehringer®.

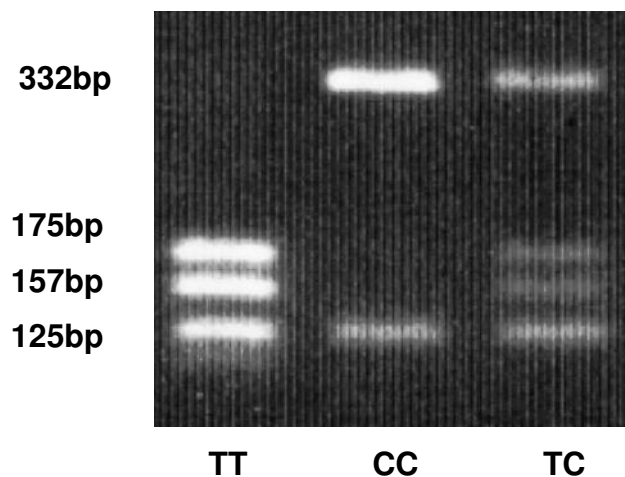


Abb. 6: Vergrößerung aus Abb. 5. (s. Rahmen)

Genotypen des Gpl β -T₍₋₅₎C-Polymorphismus: TT-Homozygote: 125bp + 157bp + 175bp; CC-Homozygote: 125bp + 332bp; TC-Heterozygote: 125bp + 157bp + 175bp + 332bp.

3.7.8 DNA-Sequenzierung

Zur Validierung der Nested-PCR/RFLP-Analyseergebnisse wurde eine Nukleotid-Sequenz-Analyse von DNA-Proben des jeweiligen Genotyps durchgeführt (s. Abb. 7, S. 33). Die Sequenzierungsreaktion erfolgte mit dem Sequenzierungs-Kit der Fa. Perkin Elmer®. Die Analyse wurde mit dem ABI PRISM™ 373 DNA Sequencer der Fa. Applied Biosystems®, Weiterstadt, durchgeführt. 20 ng des Nested-PCR Produkts wurden mit 8 µl des Terminator-Ready-Reaction-Mix (Nukleotide; DNA Polymerase AmpliTaq; Abbruch-Nukleotide; MgCl₂) und 5 mM *Primer #1* (3369-ATAGAT-CCAGGGTCCCCAGCACT-3347) sowie Aqua bidest. ad 20 µl angesetzt. Die Sequenzierungsreaktion bestand aus 25 Zyklen mit Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 96°C für 10 Sekunden, Annealing bei 50°C für 5 Sekunden und Elongation bei 60°C für 4 Minuten. Das durch die Sequenzierungsreaktion gewonnene Produkt wurde mittels Natriumacetat-Präzipitation aufgereinigt. 2 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,6) und 55 µl absoluter Ethylalkohol wurden mit dem Ansatz versetzt und 16 Minuten bei 15.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet nach Waschen in 75%igem Ethylalkohol und Trocknen in der Vakuumzentrifuge (5 min, 15.000 g) in 25 µl TSR-Puffer (template-suppression-reagent) aufgenommen. Der so gewonnene Ansatz wurde bei 90°C für 2 Minuten denaturiert, abgekühlt und dann der Sequenzanalyse unterzogen (s. Abb. 7, S. 33).

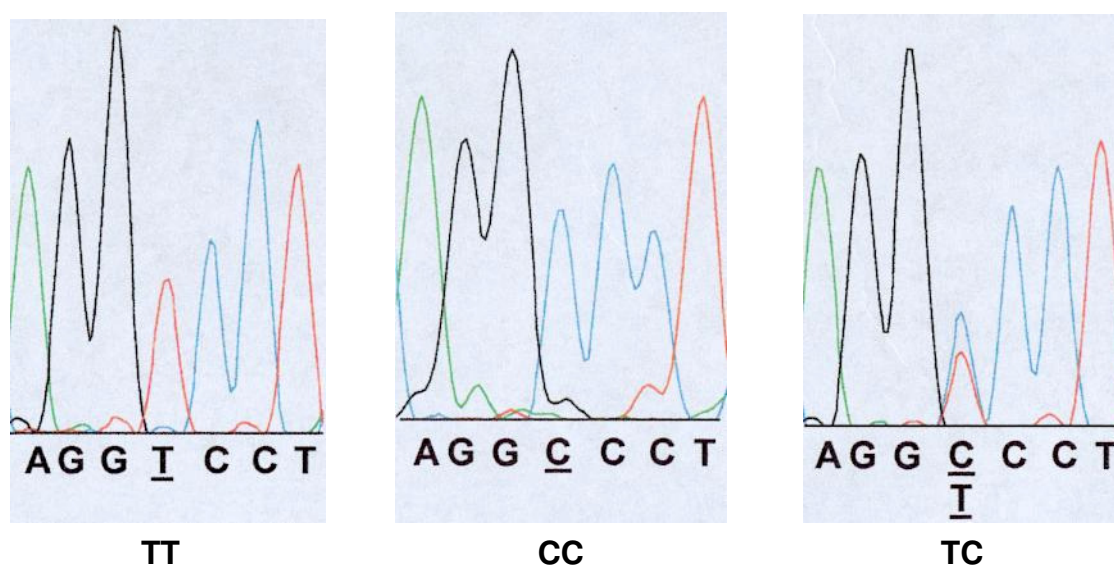


Abb. 7: Nukleotid-Sequenz-Analyse von DNA-Proben der drei Genotypen des Gpl α -T₍₋₅₎C-Genpolymorphismus

3.8 Definition von Risiko-Gruppen

Die Studienpopulation wurde aufgrund der ermittelten Parameter der etablierten Risikofaktoren der Koronaren Herzkrankheit in Risikogruppen unterteilt. Die Mittelwerte oder Mediane der Serumkonzentrationen von Cholesterin, Triglyceriden, Fibrinogen, ApoA-I, ApoB, Lp(a), ApoA-I/ApoB-Ratio, Gensini-Score, Alter, BMI, Vorliegen oder Fehlen von Diabetes und/oder arterieller Hypertension sowie die Anzahl der Pack-years bestimmten die Einteilung in Hoch- oder Niedrigrisiko-Gruppen.

3.9 Statistische Analyse

Die statistische Analyse der erhobenen Daten erfolgte mittels SPSS[®] Inc. Version 9.0, Fa. SPSS Inc.[®]. Mit dem *Chi-Quadrat-Test* wurde auf eine Abweichung der Genotypverteilung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht getestet. Um die etablierten Risikofaktoren der Koronaren Herzkrankheit zwischen den T₍₋₅₎C-Genotypen vergleichen zu können, wurde das Verhältnis des Gpl α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus zu den kontinuierlichen Parametern mittels des *Kruksal-Wallis 1-Way Anova Test* errechnet und das Verhältnis zu Diabetes mellitus und arterieller Hypertension mittels des Chi-Quadrat-Tests bestimmt. Risikofaktoren der KHK und des Myokardinfarkt wurden durch eine *multiple Regressionsanalyse* (Schweregrad der KHK) bzw. eine *multiple logistische Regression* (Vorliegen/Fehlen von KHK/MI) ermittelt. Die Beziehung zwischen dem Gpl α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus und dem Schweregrad der KHK wurde mittels multipler Regressionsanalysen unter Berücksichtigung der koronaren Risikofaktoren untersucht. Odds-Ratios mit 95%-Konfidenzintervallen zur Abschätzung des relativen Risikos von KHK und MI sowie zweiseitige Wahrscheinlichkeitswerte wurden durch multiple logistische Regression nach Anpassung für die nachgewiesenen KHK-Risikofaktoren berechnet. Ein zweiseitiger p-Wert kleiner als 0,05 ($p < 0,05$) wurde als signifikant angesehen. Die Analysen basierten auf dem Modell der rezessiven, kodominanten und dominanten Vererbung.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der Studienpopulation

Die untersuchte Gesamtpopulation ($n = 3015$) setzte sich aus den koronarangiographierten Patienten der Klinikpopulation ($n = 2492$) und den Herzgesunden der Kontrollgruppe ($n = 523$) zusammen. Der Altersgipfel lag zwischen dem 61. und 70. Lebensjahr (s. Abb. 8, S. 35).

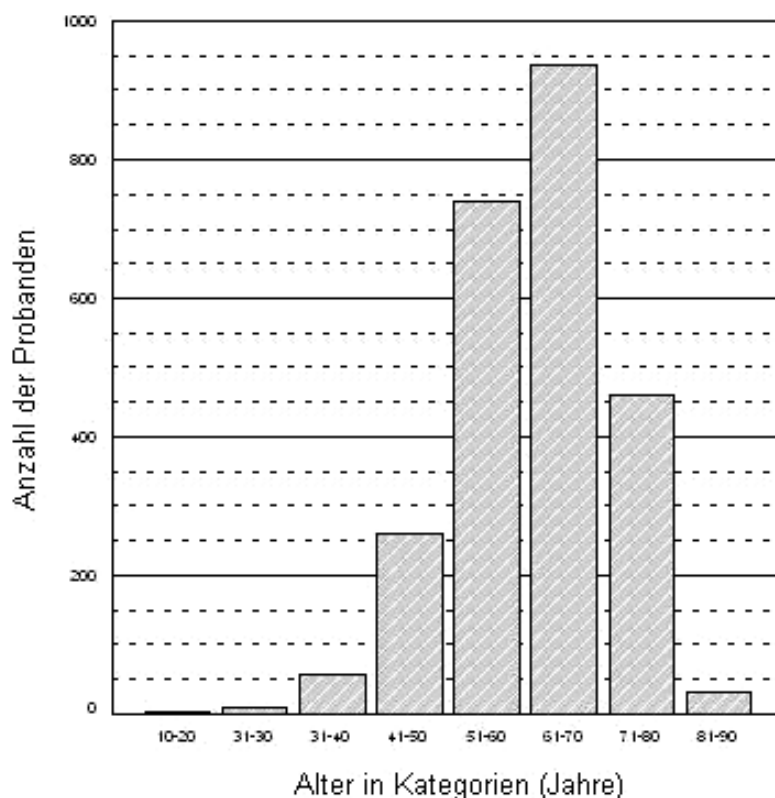


Abb. 8: Anzahl der Probanden der Gesamtpopulation in den jeweiligen Altersgruppen

Anzahl der Probanden in absoluten Zahlen, Alterskategorien in Jahren.

Die herzgesunden Probanden (Kontrollgruppe, $n = 523$) und KHK-Patienten ($n = 1918$) wurden miteinander verglichen. Als KHK Patienten wurden Patienten mit 1-, 2- oder 3-Gefäßkrankung definiert. Koronarangiographierte Patienten mit 0-Gefäßkrankung haben definitionsgemäß keine KHK (Stenose $< 50\%$), sind aber aufgrund einer spezifischen thorakalen Symptomatik mit Indikation zur Koronarangiographie nicht als Herzgesunde anzusehen. Durch den Ausschluss der Patienten mit Null-

Gefäßerkrankung wurde gewährleistet, dass nur Herzgesunde mit KHK-Patienten verglichen wurden.

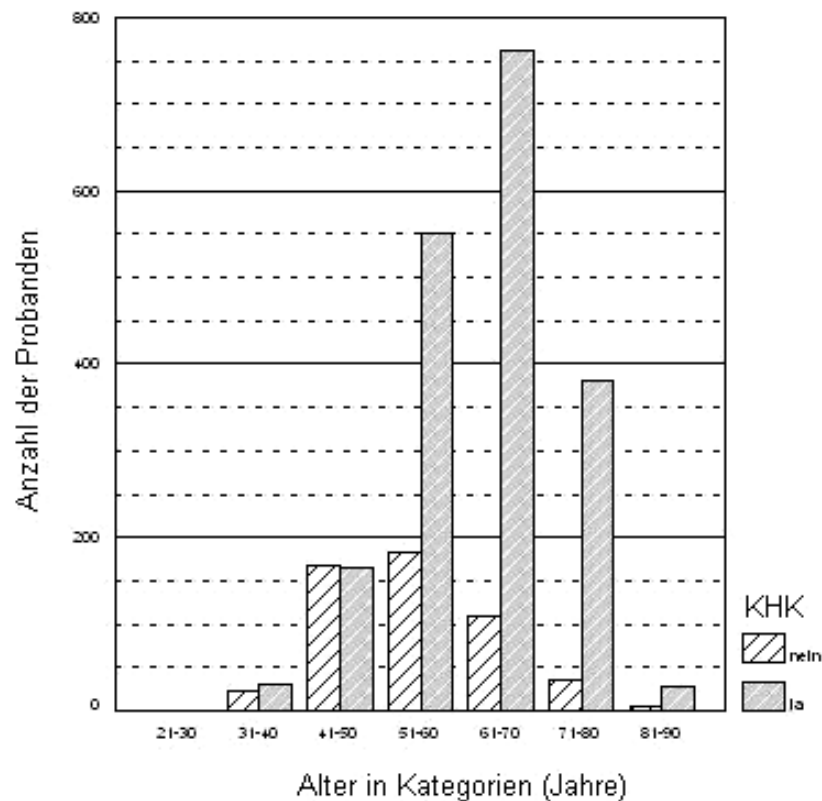


Abb. 9: Anzahl der Probanden in den jeweiligen Altersgruppen mit oder ohne KHK

Studienpopulation: Population aus Herzgesunden (Kontrollgruppe) und KHK-Patienten (1-, 2-, 3-Gefäßerkrankung; ohne O-Gefäßerkrankung). Anzahl der Probanden in absoluten Zahlen, Alterskategorien in Jahren. Abkürzungen: KHK = Koronare Herzkrankheit.

Tab. 9: Anzahl der Probanden in den jeweiligen Altersgruppen mit oder ohne KHK

Alter in Kategorien	KHK -	KHK +	Gesamt
21-30		1	1
31-40	22	30	52
41-50	168	166	334
51-60	183	551	734
61-70	109	763	872
71-80	35	380	415
81-90	6	27	33
Gesamt	523	1918	2441

Studienpopulation: Population aus Herzgesunden (Kontrollgruppe) und KHK-Patienten (1-, 2-, 3-Gefäßerkrankung, ohne O-Gefäßerkrankung). Anzahl der Probanden in absoluten Zahlen, Alters-

kategorien in Jahren. Abkürzungen: KHK = Koronare Herzkrankheit; KHK - = Kontrollgruppe; KHK + = KHK-Patienten.

Die Klinikpopulation (n = 2492) wurde entsprechend den Koronarangiographiebefunden in vier Gruppen aufgeteilt: Gruppe I: Patienten ohne so genannte signifikante Koronare Gefäßerkrankung (0-Gefäßerkrankung) mit radiologisch nicht nachweisbaren Stenosen oder Koronarstenosen < 50% (n = 574), Gruppe II: Eingefäßerkrankung (n = 512), Gruppe III: Zweigefäßerkrankung (n = 538), Gruppe IV: Dreigefäßerkrankung (n = 868) mit Koronarstenosen \geq 50% an allen drei Gefäßhauptstämmen des Herzkranzsystems (RCA, LCA, CX). Das Durchschnittsalter der Patienten ohne signifikante Gefäßerkrankung lag bei $58,5 \pm 11,0$ Jahren, bei Patienten mit 1-Gefäßerkrankung bei $60,9 \pm 9,7$ Jahren, bei Patienten mit 2-Gefäßerkrankung sowie 3-Gefäßerkrankung bei $62,5 \pm 9,6$ Jahren bzw. $63,9 \pm 8,6$ Jahren. In den Abb. 9 (S. 36) und 10 (S. 37), sowie den Tab. 9 (S. 36) und 10 (S. 38) wird die Anzahl der Probanden der Studienpopulation aus Herzgesunden (Kontrollgruppe) und KHK-Patienten in den jeweiligen Altersgruppen in Abhängigkeit vom Gefäßstatus dargestellt. Man erkennt, dass der relative Anteil an Patienten mit KHK mit steigendem Alter zunahm.

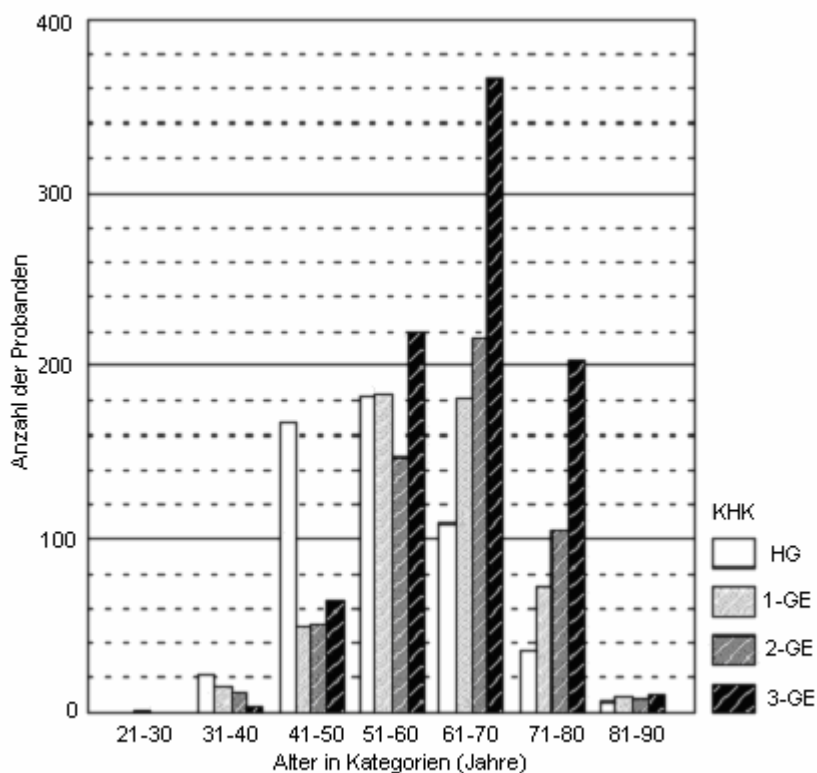


Abb. 10: Anzahl der Probanden in den jeweiligen Altersgruppen in Abhängigkeit vom Gefäßstatus

Studienpopulation: Population aus Herzgesunden (Kontrollgruppe) und KHK-Patienten (1-, 2-, 3-Gefäßerkrankung, ohne O-Gefäßerkrankung). Anzahl der Probanden in absoluten Zahlen, Alterskategorien in Jahren. Abkürzungen: KHK = Koronare Herzkrankheit; HG = Herzgesund; 1-GE = Eingefäßerkrankung; 2-GE = Zweigefäßerkrankung; 3-GE = Dreigefäßerkrankung.

Tab. 10: Anzahl der Probanden in den jeweiligen Altersgruppen in Abhängigkeit vom Gefäßstatus

Alter in Kategorien	Herzgesund	1-GE	2-GE	3-GE	Gesamt
21-30		1			1
31-40	22	15	11	4	52
41-50	168	50	51	65	334
51-60	183	184	147	220	734
61-70	109	181	216	366	872
71-80	35	72	105	203	415
81-90	6	9	8	10	33
Gesamt	523	512	538	868	2441

Studienpopulation: Population aus Herzgesunden (Kontrollgruppe) und KHK-Patienten (1-, 2-, 3-Gefäßerkrankung, ohne O-Gefäßerkrankung); Anzahl der Probanden in absoluten Zahlen, Alterskategorien in Jahren. Abkürzungen: 1-GE = Eingefäßerkrankung; 2-GE = Zweigefäßerkrankung; 3-GE = Dreigefäßerkrankung

Zusätzlich wurde die Gesamtpopulation ($n = 3015$) in Patienten mit abgelaufenem Myokardinfarkt ($n = 1180$) und herzgesunde Probanden (Kontrollgruppe, $n = 523$) aufgeteilt. Das mittlere Alter der Myokardinfarktpatienten lag bei $62,2 \pm 9,6$ Jahren, das mittlere Alter der Herzgesunden bei $55,2 \pm 10,2$ Jahren. Auch für den Myokardinfarkt zeigte sich eine deutliche Altersabhängigkeit. Der relative Anteil der Patienten mit Herzinfarkt stieg, analog zum altersabhängigen Anstieg der KHK, mit zunehmenden Alter deutlich an (s. Abb. 11 und Tab 11, S. 39).

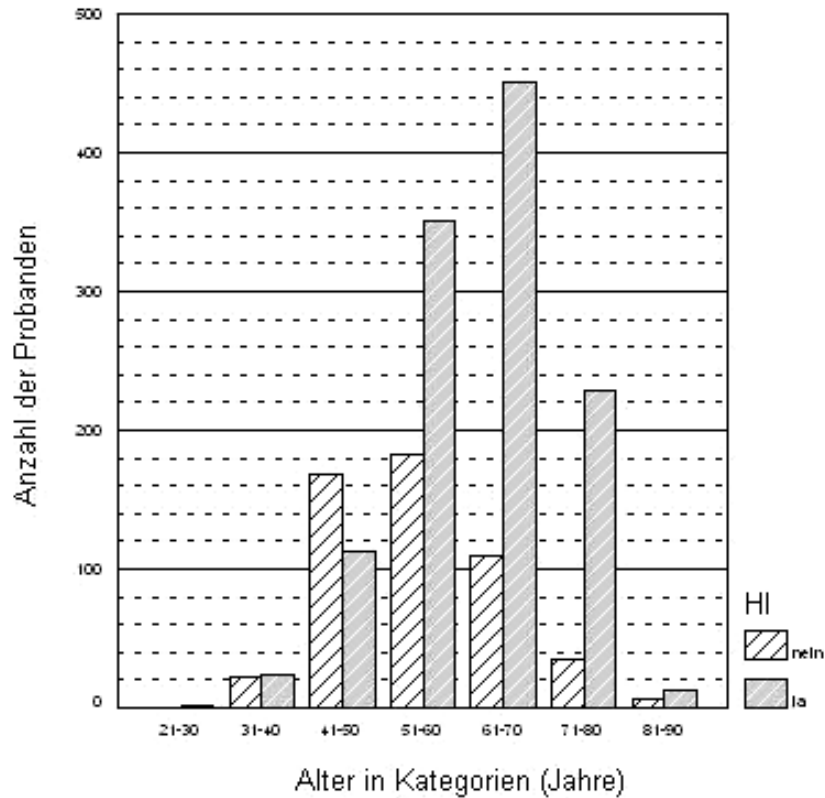


Abb. 11: Anzahl der Probanden in der jeweiligen Altersgruppe mit oder ohne Myokardinfarkt

Vergleich zwischen Herzgesunden (Kontrollgruppe) und Myokardinfarktpatienten. Anzahl der Probanden in absoluten Zahlen, Alterskategorien in Jahren. Abkürzungen: HI = Herzinfarkt.

Tab. 11: Anzahl der Probanden in der jeweiligen Altersgruppe mit oder ohne Myokardinfarkt

Alter in Kategorien	MI -	MI +	Gesamt
21-30		2	2
31-40	22	24	46
41-50	168	112	280
51-60	183	351	534
61-70	109	450	559
71-80	35	229	264
81-90	6	12	18
Gesamt	523	1180	1703

Vergleich zwischen Herzgesunden (Kontrollgruppe) und Myokardinfarktpatienten. Anzahl der Probanden in absoluten Zahlen, Alterskategorien in Jahren. Abkürzungen: MI - = kein Myokardinfarkt
MI + = abgelaufener Myokardinfarkt.

Der allgemein anerkannte Zusammenhang zwischen Koronarer Herzkrankheit und Myokardinfarkt konnte auch in der vorliegenden Studienpopulation nachgewiesen werden ($p < 0,0001$). In der Gruppe der Patienten mit 0-Gefäßerkrankung ($n = 574$) fanden sich lediglich 87 Patienten mit abgelaufenem Myokardinfarkt. Innerhalb der Gruppe der KHK-Patienten ($n = 1918$) lag der Anteil der Herzinfarktpatienten dagegen bei 1093 (s. Abb. 12, S. 40 und Tab. 12, S. 41). Die gleiche ausgeprägte Korrelation ($p < 0,0001$) wurde auch nach Aufteilung der Gruppe der KHK-Patienten in Patienten mit Ein-, Zwei- und Dreigefäßerkrankung beobachtet (s. Abb. 13, S 41 und Tab. 13, S. 42). Der deutliche Zusammenhang zwischen der Koronaren Herzkrankheit und dem Myokardinfarkt zeigte sich auch dann, (1) wenn an Stelle der Patienten ohne signifikante Stenosen (0-Gefäßerkrankung) die Herzgesunden als Kontrollgruppe gewählt wurde, oder (2) wenn die Herzgesunden und Patienten ohne signifikante KHK zu einer Kontrollgruppe zusammengefasst wurden (jeweils $p < 0,0001$; Ergebnisse nicht dargestellt).

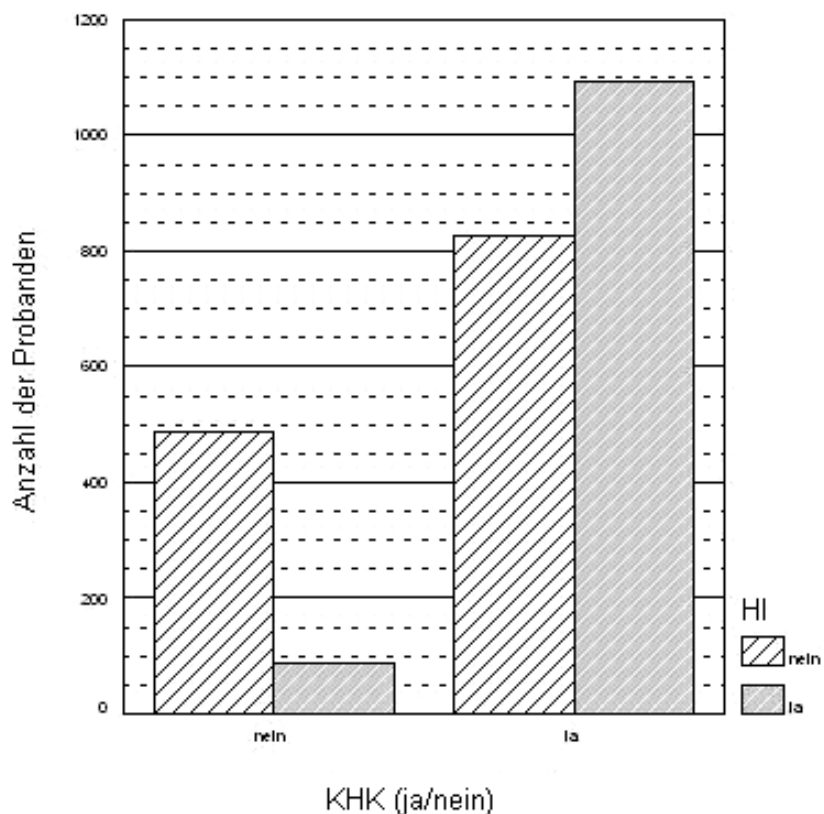


Abb. 12: Korrelation zwischen Koronarer Herzkrankheit und Myokardinfarkt

Die statistische Beziehung zwischen Koronarer Herzkrankheit und Myokardinfarkt wurde in der Klinikpatientenpopulation untersucht ($n = 2492$), die zur koronarangiographischen Diagnostik stationär auf-

genommen wurden. Koronargefäße ab einem Stenosegrad von $\geq 50\%$ wurden als erkrankt definiert. Die Diagnose des Herzinfarktes erfolgte nach WHO-Kriterien. Abkürzungen: KHK = Koronare Herzkrankheit; HI = Herzinfarkt.

Tab. 12: Korrelation zwischen Koronarer Herzkrankheit und Myokardinfarkt

	MI -	MI +	Gesamt
KHK -	487	87	574
KHK +	825	1093	1918
Gesamt	1312	1180	2492

In der Tabelle werden die in Abb. 11 dargestellten Daten in tabellarischer Form zusammengefasst. Abkürzungen: KHK - = Kontrollgruppe; KHK + = KHK-Patienten; MI - = kein Myokardinfarkt; MI + = abgelaufener Myokardinfarkt.

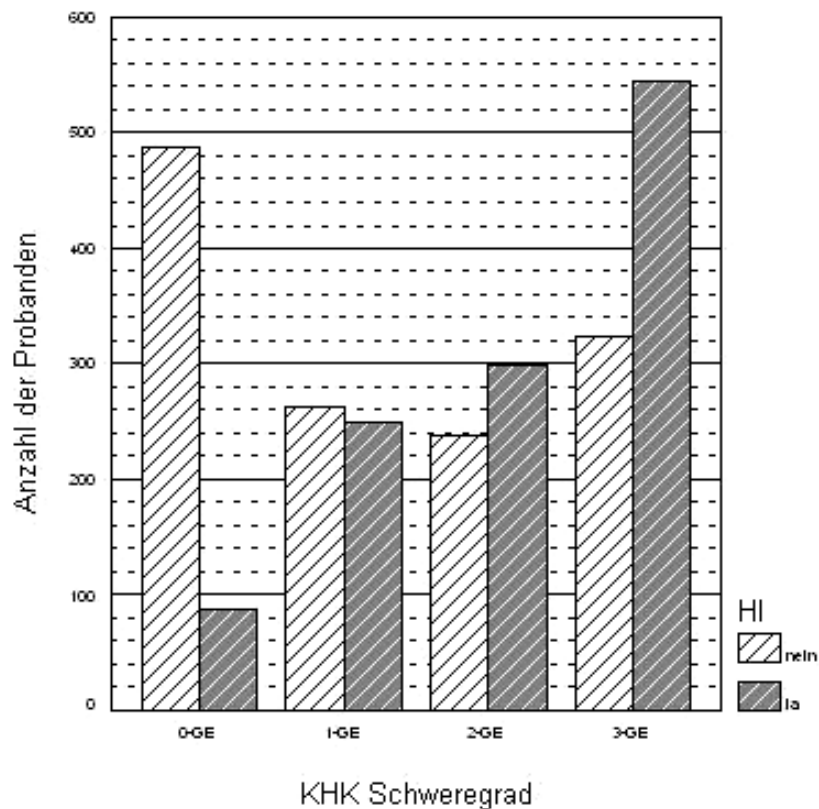


Abb. 13: Korrelation zwischen KHK-Schweregrad und Myokardinfarkt

Die Population setzte sich aus 2492 Patienten zusammen, die zur Durchführung einer Koronarangiographie stationär aufgenommen wurden. Koronargefäße ab einem Stenosegrad $\geq 50\%$ wurden als erkrankt definiert und je nach Lokalisation der Stenosen in Ein- oder Mehrgefäßerkrankung eingeteilt. Die Diagnose des Herzinfarktes erfolgte nach WHO-Kriterien. Abkürzungen: KHK = Koronare Herzkrankheit; 0-GE = Patienten ohne sichtbare Stenosen oder mit Koronarstenosen $< 50\%$; 1-GE = Eingefäßerkrankung; 2-GE = Zweigefäßerkrankung; 3-GE = Dreigefäßerkrankung.

Tab. 13: Korrelation zwischen KHK-Schweregrad und Myokardinfarkt

	MI -	MI +	Gesamt
KHK 0-GE	487	87	574
KHK 1-GE	263	249	512
KHK 2-GE	239	299	538
KHK 3-GE	323	545	868
Gesamt	1312	1180	2492

In der Tabelle werden die in Abb. 13 dargestellten Daten in tabellarischer Form zusammengefasst. Abkürzungen: KHK = Koronare Herzkrankheit; 0-GE = Patienten mit Koronarstenosen < 50%; 1-GE = Eingefäßerkrankung; 2-GE = Zweigefäßerkrankung; 3-GE = Dreigefäßerkrankung. MI - = kein Myokardinfarkt; MI + = abgelaufener Myokardinfarkt.

In der Gruppe der koronarangiographierten Patienten mit Nullgefäßerkrankung (n = 574) fanden sich 87 Patienten mit abgelaufenem Myokardinfarkt (s. Abb. 13, S. 41 und Tab. 13, S. 42). Diesbezüglich ist noch einmal darauf hinzuweisen, dass Patienten mit Nullgefäßerkrankung zwar definitionsgemäß nicht an einer Koronaren Herzkrankheit leiden, aber aufgrund einer abgelaufenen thorakalen Symptomatik mit Indikation zur Koronarangiographie nicht mit den Herzgesunden der Kontrollgruppe gleichzusetzen sind. Koronarangiographisch zeigten sich bei den Patienten mit 0-Gefäßerkrankung Koronarstenosen mit < 50% Lumeneinengung. Eine Lumeneinengung < 50% gilt zwar noch nicht als signifikante Stenose (Stenosegrad $\geq 50\%$), jedoch besteht trotzdem die Möglichkeit einer Plaqueruptur mit anschließender Thrombusbildung und Koronararterienverschluss. Weitere mögliche Ursachen für die Ausbildung eines Myokardinfarkts sind z.B. die Panarteritis nodosa oder die Mikroangiopathie („small-vessel-disease“), welche bevorzugt die intramuralen Koronararterien betrifft und insbesondere bei gleichzeitig vorliegender Myokardhypertrophie zu einer Myokardinnenschichtischämie führen kann

4.2 Schweregradeinteilung der Koronaren Herzkrankheit mittels Gensini-Score

Im Folgenden wurde der Gensini-Score der Klinikpopulation in Abhängigkeit von dem Vorliegen (1-GE, 2-GE, 3GE) oder Fehlen (0-GE) der koronaren Herzkrankung untersucht. Da die Berechnung des Gensini-Scores einen koronarangiographischen Befund voraussetzt, konnten die Korrelationsanalysen zwischen dem Gensini-Score und der KHK bzw. dem Myokardinfarkt ausschließlich mit der

Klinikpopulation durchgeführt werden. Entsprechend dem Nachweis bzw. dem Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit fand sich ein signifikanter Anstieg des Gensini-Score ($p < 0,0001$) (s. Abb. 14, S. 43, Abb. 15, S. 44, Abb. 16, S. 45 und Tab 14, S. 43, Tab. 15, S. 44).

Tab. 14: Gensini-Score in der Klinikpopulation in Abhängigkeit von der KHK

	Mittelwert	n	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
KHK -	5,127	574	5,8224	0,2430
KHK +	61,776	1918	44,573	1,0178
Gesamt	48,728	2492	45,89	0,9193

In der Tabelle werden die Gensini-Scores zwischen den koronarangiographierten Patienten ohne KHK (Koronarstenose $< 50\%$) und KHK-Patienten untersucht. Abkürzungen: KHK - = Patienten ohne KHK, Nullgefäßerkrankung; KHK + = KHK-Patienten; n = Anzahl.

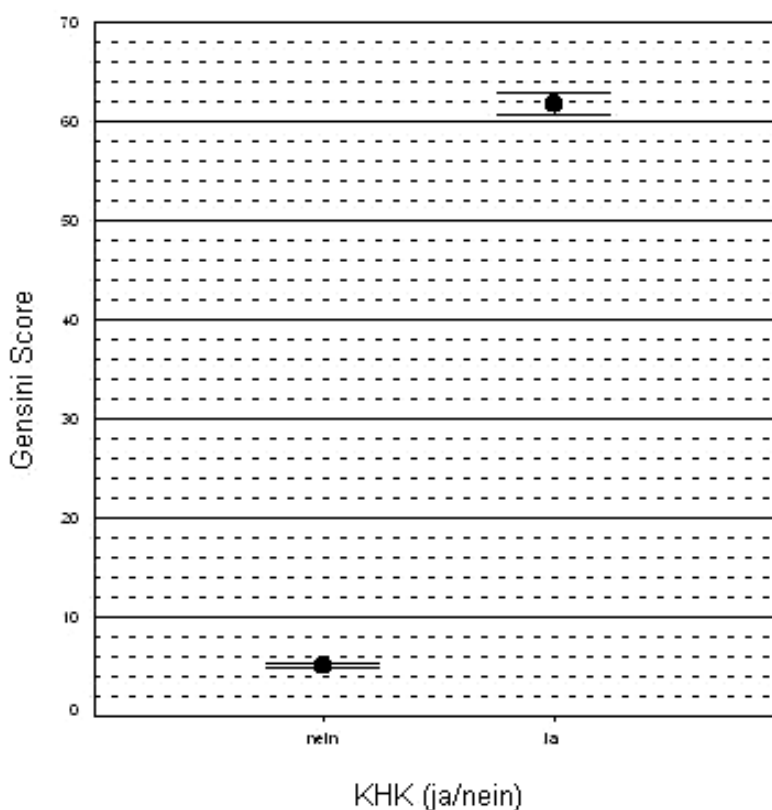


Abb. 14: Gensini-Score in der Klinikpopulation in Abhängigkeit von der KHK

Graphische Darstellung der Mittelwerte der Gensini-Scores \pm Standardfehler zwischen den Patienten ohne signifikante KHK („KHK nein“) und KHK-Patienten („KHK ja“). Abkürzungen: KHK = Koronare Herzkrankheit.

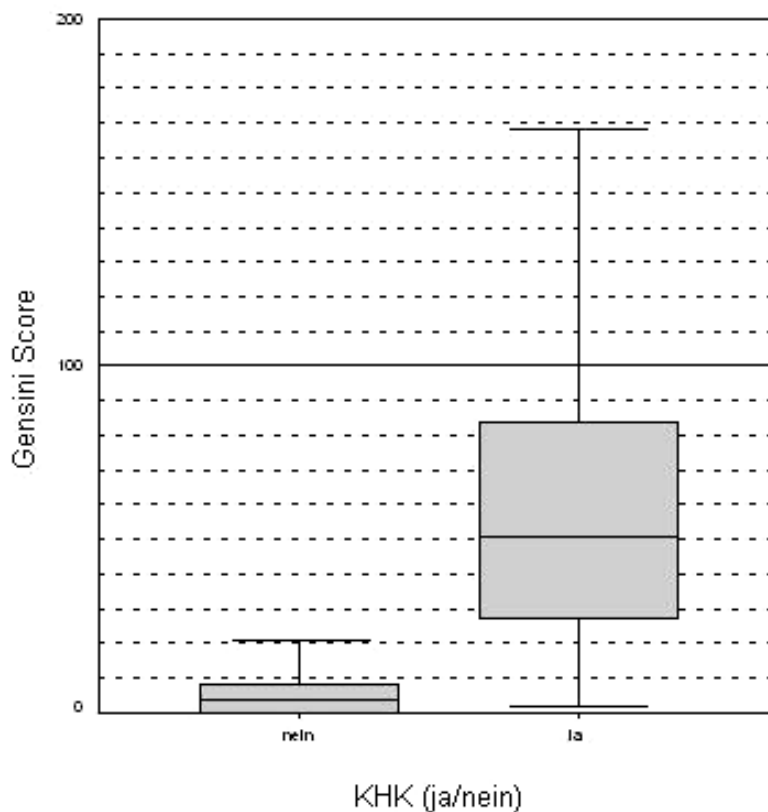


Abb. 15: Gensini-Score in der Klinikpopulation in Abhängigkeit von der KHK

Graphische Darstellung als Boxplot. Der Median des Gensini-Scores wurde als Querstrich im hellgrau unterlegten Kasten dargestellt. Die 25%- und 75%-Perzentile bilden den unteren und oberen Rand des grauen Kastens. Ausreißer und Extremwerte wurden nicht dargestellt. Abkürzungen: KHK = Koronare Herzkrankheit.

Tab. 15: Gensini-Score in der Klinikpopulation in Abhängigkeit vom Schweregrad der KHK

	Mittelwert	n	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
0-GE	5,127	574	5,8224	0,2430
1-GE	29,295	512	19,7238	0,8717
2-GE	49,599	538	29,6871	1,2799
3-GE	88,484	868	46,7816	1,5879
Gesamt	48,728	2492	45,8900	0,9193

Tabellarische Zusammenfassung der Mittelwerte der Gensini-Scores \pm Standardabweichung bzw. Standardfehler. Abkürzungen: 0-GE = Nullgefäßkrankung; 1-GE = Eingefäßkrankung; 2-GE = Zweigefäßkrankung; 3-GE = Dreigefäßkrankung; n = Anzahl.

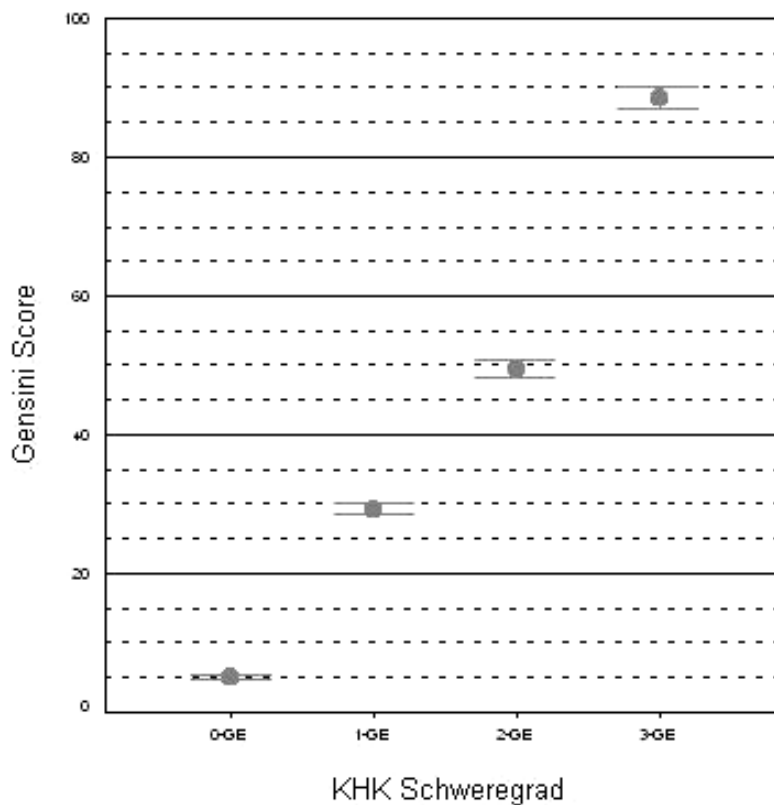


Abb. 16: Gensini-Score in der Klinikpopulation in Abhängigkeit vom Schweregrad der KHK

Graphische Darstellung der Mittelwerte der Gensini-Scores \pm Standardfehler. Abkürzungen: KHK = Koronare Herzkrankheit; 0-GE = Nullgefäßerkrankung; 1-GE = Eingefäßerkrankung; 2-GE = Zweigefäßerkrankung; 3-GE = Dreigefäßerkrankung.

Nicht nur zwischen dem KHK-Risiko und dem Gensini-Score, sondern auch zwischen dem KHK-Schweregrad und dem Gensini-Score zeigte sich eine signifikante Korrelation ($p < 0,0001$). Dieser Zusammenhang wurde bei Darstellung der Mittelwerte des Gensini-Scores in tabellarischer Form (s. Tab. 15, S. 44) und graphischer Darstellung (s. Abb. 16, S. 45) sowie des Medians im Box Plot (s. Abb. 17, S. 46) deutlich.

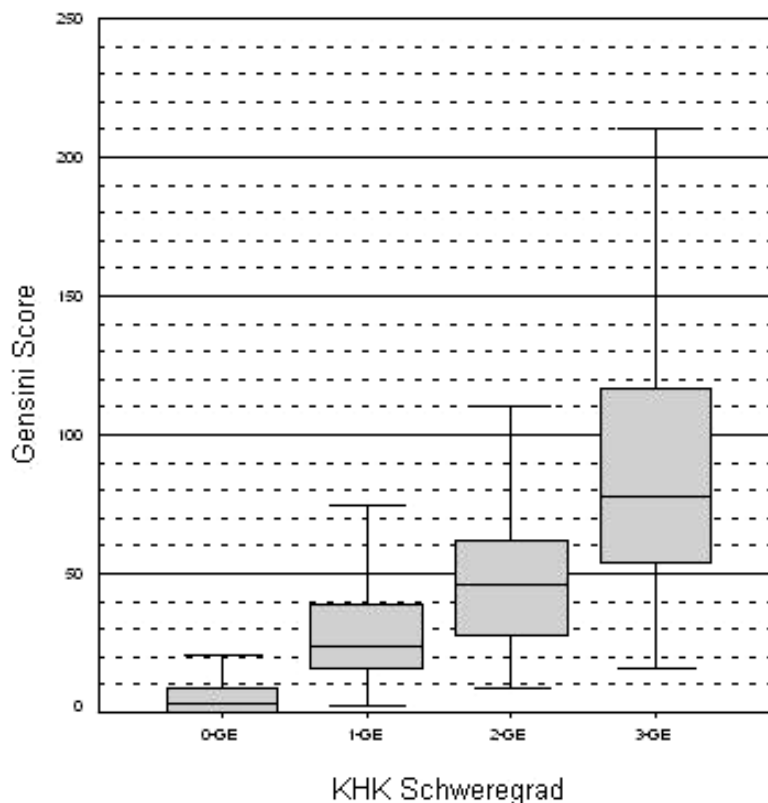


Abb. 17: Gensini-Score in der Klinikpopulation in Abhängigkeit vom Schweregrad der KHK

Graphische Darstellung als Boxplot. Der Median in den jeweiligen Gruppen wurde als Querstrich im hellgrau unterlegten Kasten dargestellt. Die 25- und 75 % Perzentile bilden den unteren und oberen Rand des grauen Kastens. Ausreißer und Extremwerte wurden nicht dargestellt. Abkürzungen: KHK = Koronare Herzkrankheit; 0-GE = Nullgefäßerkrankung; 1-GE = Eingefäßerkrankung; 2-GE = Zweigefäßerkrankung; 3-GE = Dreigefäßerkrankung.

Ermittelte man den Gensini-Score in Abhängigkeit vom Myokardinfarkt, so fand sich ein Anstieg des GS-Mittelwertes in der Gruppe der Infarktpatienten im Vergleich zu den Patienten ohne Myokardinfarkt (s. Abb. 18, Abb. 19, S. 47 und Tab. 16, S. 46). Dies entsprach dem steigenden Mittelwert des GS mit Zunahme des Schweregrades der KHK und der damit verbundenen Zunahme des Anteils der Myokardinfarktpatienten (s.o.).

Tab. 16: Gensini-Score in der Klinikpopulation in Abhängigkeit vom Myokardinfarkt

	Mittelwert	n	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
MI -	34,974	1312	39,2467	1,0835
MI +	64,020	1180	47,8754	1,3937
Gesamt	48,728	2492	45,8900	0,9193

Tabellarische Darstellung der Mittelwerte der Gensini-Scores \pm Standardabweichung bzw. \pm Standardfehler bei den Gruppen von Patienten ohne Myokardinfarkt und Patienten mit Myokardinfarkt. Abkürzungen: MI - = kein Myokardinfarkt; MI + = abgelaufener Myokardinfarkt; n = Anzahl.

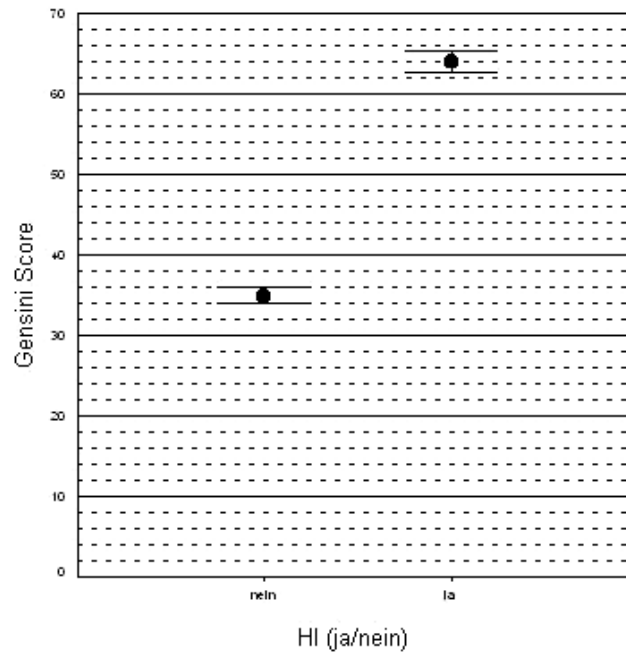


Abb. 18: Gensini-Score in der Klinikpopulation in Abhängigkeit vom Myokardinfarkt

Graphische Darstellung der Mittelwerte der Gensini-Scores \pm Standardfehler in Abhängigkeit vom Herzinfarkt. Abkürzungen: HI = Herzinfarkt.

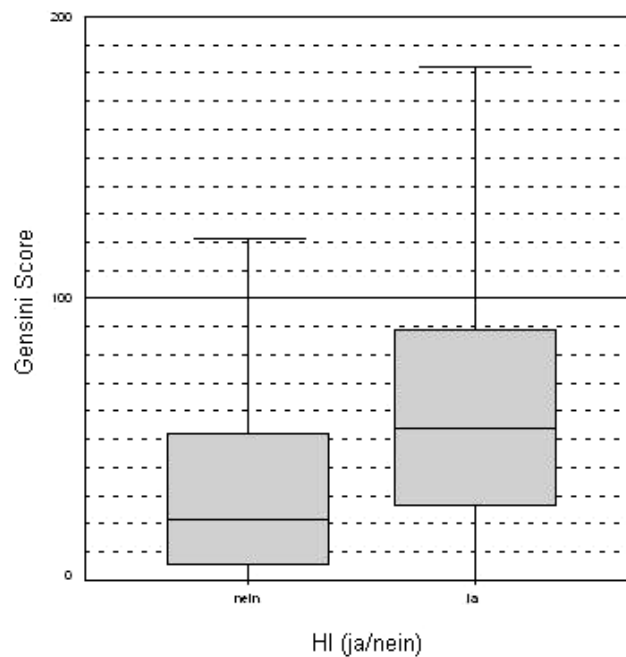


Abb. 19: Gensini-Score in der Klinikpopulation in Abhängigkeit vom Myokardinfarkt

Graphische Darstellung als Boxplot. Die Population konnte unterteilt werden in Probanden ohne Myokardinfarkt (n = 1312) und in Patienten mit mindestens einem Herzinfarkt (n = 1180). Der Median des Gensini-Scores in beiden Gruppen wurde als Linie im grau unterlegten Kasten dargestellt. Die 25- und 75 % Perzentile bilden den unteren und oberen Rand des grauen Kastens. Ausreißer und Extremwerte wurden nicht dargestellt. Abkürzungen: HI = Herzinfarkt.

4.3 Verteilung der Risikofaktoren der Koronaren Herzkrankheit und des Myokardinfarkts

Tab. 17: Verteilung der Risikofaktoren in der Klinikpopulation

Risikofaktoren	-KHK ⁽¹⁾ (n = 523)	-KHK ⁽²⁾ (n = 574)	+KHK (n = 1918)	2p ⁽¹⁾	2p ⁽²⁾
Alter (Jahre)	55,2 ± 10,2	58,5 ± 11,0	62,7 ± 9,3	0,00001	0,00001
BMI (kg/m ²)	26,3 ± 3,3	27,1 ± 3,7	26,9 ± 3,4	n. s.	n. s.
Pack-years	16,0 ± 28	19,0 ± 24	23,3 ± 27	0,0028	0,035
% Diabetes	7	12	21	0,0004	0,00001
% art. Hypertonus	16	54	65	0,00001	0,00001
Chol (mg/dl)	212 ± 43	206 ± 44	210 ± 42	n. s.	n. s.
Trig (mg/dl)	140 ± 53	143 ± 92	155 ± 92	n. s.	n. s.
ApoA-I (g/l)	1,47 ± 0,25	1,47 ± 0,31	1,42 ± 0,30	0,0001	0,00001
ApoB (g/l)	1,11 ± 0,25	1,21 ± 0,31	1,29 ± 0,34	0,00001	0,00001
ApoA-I/ApoB	1,39 ± 0,43	1,29 ± 0,46	1,18 ± 0,44	0,00001	0,00001
Lp(a) (mg/l)	19 ± 25	21 ± 29	30 ± 38	0,00001	0,00001

Die ermittelten Werte sind Durchschnittswerte ± Standardabweichung bzw. prozentuale Anteile. Die Beziehung zwischen den Risikofaktoren und der KHK wurden mittels multipler logistischer Regression ermittelt. Abkürzungen: n.s. = nicht signifikant; BMI = Body Mass Index; Chol = Gesamtcholesterin; Trig = Triglyceride; Apo = Apolipoprotein; -KHK⁽¹⁾ = Herzgesunde (Kontrollgruppe); +KHK = KHK-Patienten; -KHK⁽²⁾ = koronarangiographierte Patienten ohne signifikante KHK (< 50% Stenose); 2p⁽¹⁾, zweiseitige p-Werte für den statistischen Vergleich zwischen KHK-Patienten (+KHK) versus Herzgesunde (-KHK⁽¹⁾); 2p⁽²⁾, zweiseitige p-Werte für den statistischen Vergleich zwischen KHK-Patienten (+KHK) versus koronarangiographierte Patienten ohne KHK (-KHK⁽²⁾).

Im statistischen Vergleich zwischen KHK-Patienten (+KHK, n = 1918) versus Herzgesunde (-KHK⁽¹⁾, Kontrollgruppe, n = 523) zeigten sich der Zigarettenkonsum (Pack-years, p = 0,0028), Diabetes mellitus (p = 0,0004), arterieller Hypertonus (p = 0,00001), erniedrigte ApoA-I Konzentrationen (p = 0,0001), erhöhte ApoB Konzentrationen (p = 0,00001), ein erniedrigter ApoA-I/ApoB Quotient (p = 0,00001) und ein erhöhtes Lp(a) (p = 0,00001) als Risikofaktoren für die Koronare

Herzkrankheit. Hohe ApoA-I Konzentrationen und eine hoher ApoA-I/ApoB Quotient wiesen sich als protektive Faktoren aus. Der Body Mass Index (BMI), die Gesamtcholesterinkonzentration und die Triglyceridkonzentration zeigten sich nicht als signifikante KHK-Risikofaktoren. (s. Tab. 17, S. 48).

Im Vergleich zwischen KHK-Patienten (+KHK, n = 1918) versus koronarangiographierte Patienten ohne KHK (-KHK⁽²⁾, Koronarstenosen <50%, n = 574) fanden sich der Zigarettenkonsum (Pack-years, p = 0,035), Diabetes mellitus (p = 0,00001), arterieller Hypertonus (p = 0,00001), erhöhtes ApoB (p = 0,00001), ein erniedrigter ApoA-I/ApoB Quotient (p = 0,00001) und eine erhöhtes Lp(a) (p = 0,00001) als Risikofaktoren für die Koronare Herzkrankheit. Hohe ApoA-I Konzentrationen (p = 0,00001) und eine hoher ApoA-I/ApoB Quotient wiesen sich wiederum als protektive Faktoren aus. Der Body Mass Index (BMI), die Gesamtcholesterinkonzentration und die Triglyceridkonzentration zeigten sich nicht als signifikante KHK-Risikofaktoren (s. Tab. 17, S. 48).

Durch Unterteilung der KHK-Patienten nach KHK-Schweregraden (Null-, Ein-, Zwei-, Dreifäßerkrankung) wurde der statistische Vergleich von KHK-Patienten (+KHK) versus Herzgesunden (-KHK⁽¹⁾) weiter spezifiziert. Auch hier fanden sich der Zigarettenkonsum (p⁽¹⁾ = 0,018), Diabetes mellitus (p = 0,0001), arterieller Hypertonus (p = 0,0001), ein erhöhtes Lp(a) (p = 0,0001) und ApoB (p = 0,0001) als Risikofaktoren, ApoA-I (p = 0,0001) und eine hohe ApoA-I/ApoB Ratio (p = 0,0001) als protektive Faktoren. Für den BMI, das Gesamtcholesterin und die Triglyceridkonzentration zeigten sich wiederum keine signifikanten Unterschiede (s. Tab.18. S. 49).

Tab. 18: Verteilung der Risikofaktoren nach KHK-Schweregraden

Risikofaktoren	-KHK ⁽¹⁾ (n = 523)	-KHK ⁽²⁾ / 0-GE (n = 574)	+KHK ⁽²⁾ / 1-GE (n = 512)	+KHK ⁽²⁾ / 2-GE (n = 538)	+KHK ⁽²⁾ / 3-GE (n = 868)	2p
Alter (Jahre)	55,2 ± 10,2	58,5 ± 11,0	60,9 ± 9,7	62,5 ± 9,6	63,9 ± 8,6	< 0,0001
BMI (kg/m ²)	26,3 ± 3,3	27,1 ± 3,7	27,0 ± 3,5	26,9 ± 3,6	26,9 ± 3,1	n. s.
Pack-years	16 ± 28	15 ± 21	25 ± 28	23 ± 27	23 ± 26	0,018
% Diabetes	7	12	13	22	24	< 0,0001
% art. Hypert.	16	54	63	65	67	< 0,0001
Chol. (mg/dl)	212 ± 43	206 ± 44	206 ± 44	210 ± 43	213 ± 43	n. s.
Trig. (mg/dl)	140 ± 53	142 ± 92	153 ± 94	156 ± 95	155 ± 89	n. s.
ApoAI (g/l)	1,47 ± 0,25	1,47 ± 0,31	1,43 ± 0,29	1,43 ± 0,29	1,41 ± 0,31	< 0,0001
ApoB (g/l)	1,11 ± 0,25	1,21 ± 0,31	1,23 ± 0,33	1,28 ± 0,34	1,32 ± 0,34	< 0,0001
Lp(a) (mg/l)	20 ± 25	21 ± 29	29 ± 36	31 ± 38	31 ± 39	< 0,0001

Die ermittelten Werte sind Durchschnittswerte \pm Standardabweichung bzw. prozentuale Anteile. Die Beziehung zwischen den Risikofaktoren und den KHK-Schweregraden wurden mittels multipler logistischer Regression ermittelt. Abkürzungen: n.s. = nicht signifikant; BMI = Body Mass Index; Chol = Gesamtcholesterin; Trig = Triglyceride; Apo = Apolipoprotein; -KHK⁽¹⁾ = Herzgesunde (Kontrollgruppe); -KHK⁽²⁾ / 0-GE = koronarangiographierte Patienten ohne KHK (KHK-Nullgefäßerkrankung); +KHK⁽²⁾ / 1-GE = Patienten mit KHK-Eingefäßerkrankung; +KHK⁽²⁾ / 2-GE = Patienten mit KHK-Zweigegefäßerkrankung; +KHK⁽²⁾ / 3-GE = Patienten mit KHK-Dreigegefäßerkrankung; 2p = zweiseitige p-Werte für den statistischen Vergleich von Herzgesunden (-KHK⁽¹⁾) versus koronarangiographierte Patienten ohne KHK (-KHK⁽²⁾ / 0-GE), mit KHK-Eingefäßerkrankung (+KHK⁽²⁾ / 1-GE), mit KHK-Zweigegefäßerkrankung (+KHK⁽²⁾ / 2-GE), mit KHK-Dreigegefäßerkrankung (+KHK⁽²⁾ / 3-GE).

Tab. 19: Verteilung der Risikofaktoren des Myokardinfarkts

Risikofaktoren	-MI ⁽¹⁾ (n = 523)	-MI ⁽²⁾ (n = 1312)	+MI (n = 1180)	2p ⁽¹⁾	2p ⁽²⁾
Alter (Jahre)	55,2 \pm 10,2	62,2 \pm 9,6	62,2 \pm 9,6	0,00001	0,0022
BMI (kg/m ²)	26,3 \pm 3,3	27,0 \pm 3,5	26,9 \pm 3,4	n. s.	n. s.
Pack-years	16,0 \pm 28	19,9 \pm 25	25,0 \pm 27	0,0008	0,0311
% Diabetes	7	17	20	0,0001	n. s.
% art. Hypertonus	16	63	61	0,00001	n. s.
Chol (mg/dl)	212 \pm 43	210 \pm 43	207 \pm 43	n. s.	n. s.
Trig (mg/dl)	140 \pm 53	151 \pm 96	154 \pm 87	n. s.	n. s.
ApoA-I (g/l)	1,47 \pm 0,25	1,46 \pm 0,29	1,41 \pm 0,30	0,00001	0,0002
ApoB (g/l)	1,11 \pm 0,25	1,26 \pm 0,33	1,28 \pm 0,34	0,00001	0,0394
ApoA-I/ApoB	1,39 \pm 0,43	1,22 \pm 0,41	1,18 \pm 0,49	0,00001	0,0180
Lp(a) (mg/l)	19 \pm 25	27 \pm 37	30 \pm 36	0,00001	0,0585

Die ermittelten Werte sind Durchschnittswerte \pm Standardabweichung bzw. prozentuale Anteile. Die Beziehung zwischen den Risikofaktoren und dem Myokardinfarkt wurden mittels multipler logistischer Regression ermittelt. Abkürzungen: n.s. = nicht signifikant; BMI = Body Mass Index; Chol = Gesamtcholesterin; Trig = Triglyceride; Apo = Apolipoprotein; -MI⁽¹⁾ = Herzgesunde (Kontrollgruppe); +MI = Myokardinfarktpatienten; -MI⁽²⁾, koronarangiographierte Patienten ohne Myokardinfarkt; 2p⁽¹⁾, zweiseitige p-Werte für den statistischen Vergleich zwischen Myokardinfarkt-Patienten (+MI) versus Herzgesunde (-MI⁽¹⁾); 2p⁽²⁾, zweiseitige p-Werte für den statistischen Vergleich zwischen Myokardinfarkt-Patienten (+MI) versus koronarangiographierte Patienten ohne Myokardinfarkt (-MI⁽²⁾).

Im statistischen Vergleich zwischen Myokardinfarkt-Patienten (+MI, n = 1180) versus Herzgesunde (-MI⁽¹⁾, Kontrollgruppe, n = 523) zeigten sich der Zigarettenkonsum (Pack-years, p = 0,0008), Diabetes mellitus (p = 0,0001), arterieller Hypertonus (p = 0,00001), erniedrigte ApoA-I Konzentrationen (p = 0,00001), erhöhte ApoB Konzentrationen (p = 0,00001), ein erniedrigter ApoA-I/ApoB Quotient (p = 0,00001)

und eine erhöhte Lp(a) Konzentration ($p = 0,00001$) als Risikofaktoren für den Myokardinfarkt. Hohe ApoA-I Konzentrationen und ein hoher ApoA-I/ApoB Quotient wiesen sich als protektive Faktoren aus. Der Body Mass Index (BMI), die Gesamtcholesterinkonzentration und die Triglyceridkonzentration zeigten sich nicht als signifikante Risikofaktoren für den Myokardinfarkt (s. Tab. 18, S. 49). Im Vergleich zwischen Myokardinfarkt-Patienten (+MI, $n = 1180$) versus koronarangiographierte Patienten ohne Myokardinfarkt (-MI, $n = 1312$) waren der Zigarettenkonsum (Pack-years, $p = 0,0311$), erniedrigte ApoA-I Konzentrationen ($p = 0,0002$), erhöhte ApoB Konzentrationen ($p = 0,0394$), ein erniedrigter ApoA-I/ApoB Quotient ($p = 0,0180$) und eine erhöhte Lp(a) Konzentration ($p = 0,0585$) signifikante Myokardinfarkt-Risikofaktoren. Hohe ApoA-I Konzentrationen und ein hoher ApoA-I/ApoB Quotient wiesen sich als protektive Faktoren aus. Der Body Mass Index (BMI), Diabetes mellitus, arterieller Hypertonus, die Gesamtcholesterinkonzentration und die Triglyceridkonzentration zeigten sich im statistischen Vergleich nicht als signifikante Risikofaktoren für den Myokardinfarkt (s. Tab. 18, S. 49).

4.4 Verteilung der Gplba-T₍₋₅₎C-Genotypen

Der Gplba-T₍₋₅₎C-Polymorphismus des Gplba-Gens ist in die drei Genotypen TT, TC und CC unterteilt. Die Genotypisierung erfolgte mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse (RFLP-Analyse) mit der Endonuklease PpuMi. Zur Validierung der Nested-PCR/RFLP-Methode wurden DNA-Proben des jeweiligen Genotyps jeweils Nukleotid-Sequenz-Analysen unterzogen (s. Abb. 7, S. 33).

Innerhalb der Gesamtpopulation ($n = 3015$) fand sich keine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ($p = 0,886$). Ebenso fand sich keine Abweichung in der Gruppe der Herzgesunden (Kontrollgruppe, $p = 0,910$), bei den koronarangiographierten Patienten ohne Myokardinfarkt ($p = 0,918$), bei den koronarangiographierten Patienten ohne KHK ($p = 0,863$), ohne KHK und MI ($p = 0,977$), und bei den Patienten mit KHK ($p = 0,322$) oder MI ($p = 0,678$). Durch die Übereinstimmungen mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht waren die Voraussetzungen für die nachfolgenden Assoziationsanalysen gegeben.

In der Gesamtpopulation unterschieden sich die Werte für Alter, Body-Mass-Index (BMI), Zigarettenkonsum in Pack-Years, Diabetes mellitus, arterieller Hypertonus, Cholesterin, Triglyceride, Apolipoprotein A-I, Apolipoprotein B und ApoA-I/ApoB-

Quotient zwischen den Gpl β -T₍₋₅₎C Genotypen der Gesamtpopulation nicht (s. Tab. 20, S. 53). Lediglich für Lipoprotein(a) wurden in der Gesamtpopulation Unterschiede beobachtet (s. Tab. 20, S. 53). TT-Homozygote hatten geringfügig niedrigere Lp(a)-Plasmaspiegel als Probanden mit TC- bzw. CC-Genotypen ($p = 0,037$). Diese Analysen wurden auf die für Assoziationsanalysen relevanten Populationen ausgedehnt (Herzgesunde vs. KHK-Patienten bzw. Herzgesunde vs. Myokardinfarkt-Patienten). Für die genannten Parameter wurden keine genotypabhängigen Unterschiede beobachtet (s. Tab. 20, Tab. 21, S. 53). Die statistischen Berechnungen erfolgten mit multivariaten Methoden unter Berücksichtigung der etablierten Risikofaktoren. In der Gesamtpopulation von 3015 Probanden wurde bei 2220 Probanden (73,63%) ein TT-Genotyp, bei 738 Probanden (24,48%) ein TC-Genotyp und bei 57 Probanden (1,89%) ein CC-Genotyp nachgewiesen (s. Abb. 20, S. 52).

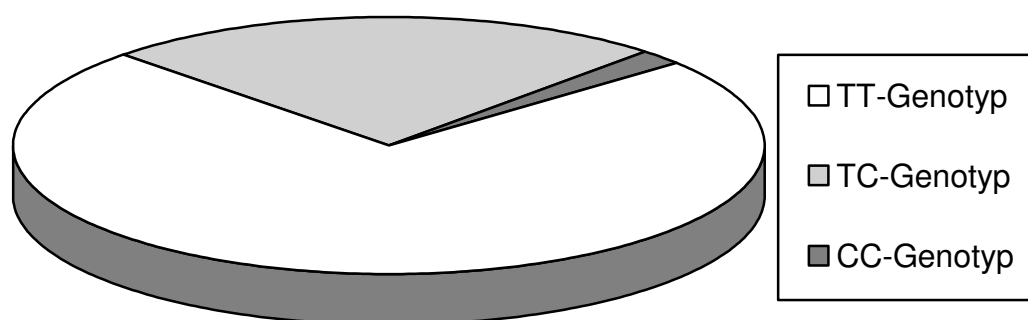


Abb. 20: Genotypenverteilung in der Gesamtpopulation

Graphische Darstellung der Genotypenverteilung in der Gesamtpopulation ($n = 3015$). TT-Genotyp, 73,63 % ($n = 2220$), TC-Genotyp, 24,48 % ($n = 738$), CC-Genotyp, 1,89 % ($n = 57$).

Tab. 20: Etablierte Risikofaktoren der Koronaren Herzkrankheit bzw. des Myokardinfarkts in Abhängigkeit von den Gplb α -Genotypen innerhalb der Gesamtpopulation

Gesamtpopulation n = 3015					
	Gplb α -T ₍₋₅₎ C Genotyp				
	TT (n = 2220)	TC (n = 738)	CC (n = 57)	Insgesamt	2p
Alter (Jahre)	60,6 ± 10,3	60,6±9,9	60,1±11,7	60,6±10,2	0,929
Fibrinogen (g/l)	3,6±1,3	3,6±1,1	3,7±1,4	3,6±1,3	0,747
Chol. (mg/dl)	209±42,5	209,8±43,2	212,1±50,3	209,2±42,8	0,803
ApoA-I (g/l)	1,44±0,28	1,45±0,31	1,44±0,3	1,44±0,3	0,520
ApoB (g/l)	1,24±0,33	1,24±0,32	1,28±0,4	1,24±0,33	0,589
ApoA-I/ApoB	1,24±0,41	1,25±0,56	1,19±0,37	1,24±0,45	0,555
Lp(a) (mg/l)	27,7±35,4	24,2±31,7	21,6±30,9	26,7±34,5	0,037
Trig. (mg/dl)	149,6±87,3	150,3±82,4	161,6±133,8	150±87,2	0,607
Diabetes in %	16	18	14	17	0,340
Hypertonus in %	54	56	58	55	0,475
Nikotinabusus (py)	20,4±25,9	23,1±27,5	21,2±31,3	21±26,4	0,088
BMI (kg/m ²)	26,9±3,4	26,8±3,5	26,3±3,2	26,8±3,4	0,546

Die ermittelten Werte sind Durchschnittswerte ± Standardabweichung bzw. relative Anteile in Prozent. Abkürzungen: n = Anzahl; Chol = Gesamtcholesterin; Apo = Apolipoprotein; Lp(a), Lipoprotein (a); Trig = Triglyceride; py = pack years; BMI = Body Mass Index; 2p = zweiseitiger p-Wert.

Tab. 21: Etablierte Risikofaktoren der KHK bzw. des Myokardinfarkts in Abhängigkeit von den Gplb α -Genotypen innerhalb der Population der Herzgesunden und KHK-Patienten

Herzgesunde (n = 523) vs. KHK-Patienten (n = 1918)					
	Gplb α -T ₍₋₅₎ C Genotyp				
	TT	TC	CC	Insgesamt	2p
Alter (Jahre)	61,3±9,7	60,76±9,9	59,7±11,5	61,11±10,0	0,311
Fibrinogen (g/l)	3,61±1,2	3,6±1,2	3,7±1,5	3,6±1,2	0,810
Chol. (mg/dl)	210±42,4	210,5±42,9	212,6±45,2	210,2±42,5	0,901
ApoA-I (g/l)	1,43±0,28	1,44±0,31	1,44±0,27	1,43±0,29	0,625
ApoB (g/l)	1,25±0,33	1,25±0,33	1,25±0,27	1,25±0,33	0,946
ApoA-I/ApoB	1,22±0,38	1,24±0,61	1,20±0,38	1,23±0,45	0,548
Lp(a) (mg/l)	28,7±36,5	26,0±33,1	24,8±33,0	28,0±35,6	0,238
Trig. (mg/dl)	151,0±86,5	154,5±85,8	150,61±66,4	151,9±86,0	0,712
Diabetes in %	17	19	15	18	0,560
Hypertonus in %	54	55	62	55	0,618
Nikotinabusus (py)	21,0,±26,7	23,3±27,5	21,44±33,5	21,5±27,0	0,241
BMI (kg/m ²)	26,89±3,4	26,8±3,3	26,4±3,3	26,8±3,4	0,741

Die ermittelten Werte sind Durchschnittswerte \pm Standardabweichung bzw. relative Anteile in Prozent. Abkürzungen: n = Anzahl; Chol = Gesamtcholesterin; Apo = Apolipoprotein; Lp(a), Lipoprotein (a); Trig = Triglyceride; py = pack years; BMI = Body Mass Index; 2p = zweiseitiger p-Wert.

Tab. 22: Etablierte Risikofaktoren der KHK bzw. des Myokardinfarkts in Abhängigkeit von den Gplb α -T₍₋₅₎C Genotypen innerhalb der Population der Herzgesunden und Myokardinfarkt-Patienten

Herzgesunde (n = 523) vs. MI-Patienten (n = 1180)					
	GPIb α -T ₍₋₅₎ C Genotyp				
	TT (n = 2220)	TC (n = 738)	CC (n = 57)	Insgesamt	2p
Alter (Jahre)	60,2 \pm 10,3	59,7 \pm 9,9	58,7 \pm 12,7	60,0 \pm 10,3	0,498
Fibrinogen (g/l)	3,7 \pm 1,2	3,7 \pm 1,2	3,9 \pm 1,7	3,7 \pm 1,2	0,545
Chol. (mg/dl)	208,1 \pm 42,5	209,6 \pm 43,2	212,9 \pm 51,1	208,6 \pm 42,8	0,748
ApoA-I (g/l)	1,43 \pm 0,28	1,44 \pm 0,32	1,41 \pm 0,23	1,43 \pm 0,29	0,595
ApoB (g/l)	1,22 \pm 0,32	1,24 \pm 0,33	1,24 \pm 0,29	1,23 \pm 0,32	0,540
ApoA-I/ApoB	1,24 \pm 0,39	1,26 \pm 0,68	1,21 \pm 0,42	1,25 \pm 0,48	0,718
Lp(a) (mg/l)	27,6 \pm 34,4	23,1 \pm 31,0	28,7 \pm 34,3	26,5 \pm 33,6	0,063
Trig. (mg/dl)	148,0 \pm 76,7	156,6 \pm 86,4	128,3 \pm 65,0	149,9 \pm 79,2	0,070
Diabetes in %	16	18	3	16	0,109
Hypertonus in %	47	48	40	47	0,672
Nikotinabusus (py)	21,5 \pm 26,9	23,2 \pm 28,1	23,4 \pm 38,9	22,0 \pm 27,5	0,592
BMI (kg/m ²)	26,7 \pm 3,4	26,7 \pm 3,3	25,9 \pm 3,1	26,7 \pm 3,4	0,403

Die ermittelten Werte sind Durchschnittswerte \pm Standardabweichung bzw. relative Anteile in Prozent. Abkürzungen: n = Anzahl; Chol = Gesamtcholesterin; Apo = Apolipoprotein; Lp(a), Lipoprotein (a); Trig = Triglyceride; py = pack years; BMI = Body Mass Index; 2p = zweiseitiger p-Wert.

4.5 Der potentielle Einfluss des Gplb α -T₍₋₅₎C-Genpolymorphismus auf das Risiko und den Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit

Alle Analysen beruhen auf rezessiven, kodominanten und dominanten Vererbungsmodellen. Die Genvarianten des Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus wurden zwischen Herzgesunden (n = 523) und KHK-Patienten (n = 1918) mit Null- (n = 574), Ein- (n = 512), Zwei- (n = 538) und Dreifäßerkrankungen (n = 868) verglichen (s. Tab. 23, S. 55).

4.5.1 Risiko der Koronaren Herzkrankheit

Mit allen Vererbungsmodellen ließ sich keine Assoziation zwischen dem Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus und dem Risiko der koronaren Herzkrankheit nachweisen (s. Tab. 23, S. 55).

Tab. 23: Verteilung der Gplb α -T₍₋₅₎C-Genotypen in Probanden ohne Gefäß-erkrankung und in Patienten mit Koronarer Herzkrankheit

Kontrollgruppe / Patienten	n	Gplb α -Genotypen			T (95%KI)	C (95%KI)
		n TT	n TC	n CC		
Herzgesunde	523	386	128	9	0,86 (0,84-0,88)	0,14 (0,12-0,16)
Nullgefäßserkrankung	574	421	143	10	0,86 (0,84-0,88)	0,14 (0,12-0,16)
Eingefäßserkrankung	512	365	140	7	0,85 (0,83-0,87)	0,15 (0,13-0,17)
Zweigefäßserkrankung	538	395	127	16	0,85 (0,83-0,87)	0,15 (0,13-0,17)
Dreigefäßserkrankung	868	653	200	15	0,87 (0,85-0,88)	0,13 (0,12-0,15)

Herzgesunde wurden mit Hilfe des „Rose Questionnaire“ identifiziert. Die KHK wurde über den durch die Koronarangiographie bestimmten Gefäßstatus definiert. Es wurden Patientengruppen ohne Koronargefäßkrankung (Nullgefäßkrankung, Koronargefäß-Stenosen < 50 %) und Patientengruppen mit Ein-, Zwei- und Dreigefäßkrankung unterschieden. Zum Nachweis des Genpolymorphismus siehe Methoden. Die Konfidenzintervalle sind in Klammern angegeben. Abkürzungen: n = Anzahl; KI = Konfidenzintervall.

Dieser fehlende Zusammenhang zwischen den Varianten des Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus und dem Risiko der koronaren Herzkrankheit zeigte sich nicht nur innerhalb der Gesamtpopulation, sondern auch in Niedrigrisikogruppen und Hochrisikogruppen (Ergebnisse nicht dargestellt).

4.5.2 Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit

4.5.2.1 Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit nach klinischer Definition

Auch diese statistischen Berechnungen wurden mit der Population aus der herzgesunden Kontrollgruppe und den KHK-Patienten durchgeführt. Die Anzahl der atherosklerotisch veränderten Koronararterien (RCA, LCA, CX) bestimmte den KHK-Schweregrad nach klinischer Definition (s. Kap. 3.2, S. 15). Es wurde in Patienten ohne signifikante Stenosen und in Patienten mit Ein-, Zwei- und Dreigefäßkrankung

unterschieden. Ab einer Querschnittsverminderung von 50% galt die jeweilige Koronararterie als signifikant atherosklerotisch verändert [52]. Innerhalb dieser Population zeigte sich keine Assoziation zwischen dem Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus und dem Schweregrad der koronaren Herzkrankheit (s. Tab. 23, S. 55). Gleichartige Beobachtungen wurden auch in Niedrig- und Hochrisikogruppen gemacht (Ergebnisse nicht dargestellt).

4.5.2.2 Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit nach Definition gemäß Gensini

Der Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit wurde zusätzlich mittels Gensini-Score ermittelt [35, 36]. Der Gensini-Score berücksichtigt die unterschiedliche funktionelle Relevanz einer Koronarstenose. Da man den Gensini-Score nur an Hand eines Koronarangiographie-Befundes berechnen kann, musste für diese statistischen Analysen die Klinikpopulation der koronarangiographierten Patienten zugrunde gelegt werden. Innerhalb dieser Population fanden sich zwischen für die drei T₍₋₅₎C-Genotypen des Gplb α -Polymorphismus keine signifikanten Unterschiede des Gensini-Score (s. Abb 21, S. 57 und Tab. 24, S. 56).

Tab. 24: Vergleich der Gensini-Scores zwischen den Gplb α -Genotypen in der Klinikpopulation

Gplb α -Genotypen	n	Gensini-Scores
TT	1834	48,9 \pm 45,5
CT	610	47,7 \pm 46,4
CC	48	55,8 \pm 55,3
Gesamt	2494	48,7 \pm 45,9

Der Gensini-Score wurde nach Lokalisation und Schweregrad der Koronarstenosen berechnet und als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Je nach Stenosegrad wird der stenosierte Koronararterie ein Wert von 1 bis 32 zugeordnet, der dann in Abhängigkeit von der vitalen Bedeutung des betroffenen Segments mit einem Faktor von 0,5 bis 5 multipliziert wird (s. Kap. 3.2, Abb. 2, S. 17 und Tab. 1, S. 18). Abkürzungen: n = Anzahl.

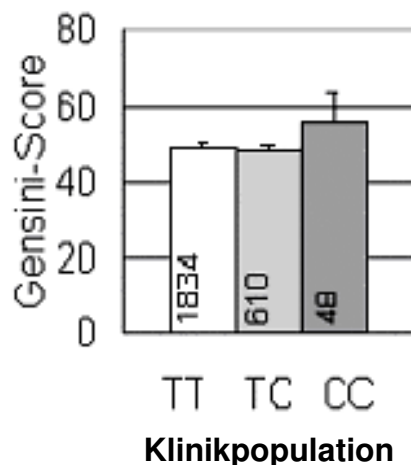


Abb. 21: Vergleich der Gensini-Scores zwischen den Gplb α -Genotypen in der Klinikpopulation

Graphische Darstellung der Mittelwerte der Gensini-Scores \pm Standardfehler bei den Gplb α -Genotypen in der Klinikpopulation

4.5.3 Vergleich der Gensini-Scores zwischen den Gplb α -Genotypen in Niedrig- und Hochrisikogruppen der Klinikpopulation

Die statistischen Analysen der Niedrig- und Hochrisikogruppen der Klinikpopulation ergaben folgende Befunde.

4.5.3.1 Analyse der Subpopulation < 62 Jahre (50. Perzentile)

Eine Analyse der Subpopulation von Patienten mit einem Alter < 62 Jahre (50. Perzentile) ergab bei den CC-Genotypen tendenziell höhere Gensini-Scores als bei den übrigen Gplb α -T₍₋₅₎C Genotypen TC und TT, jedoch ohne statistische Signifikanz ($p = 0,06$) (s. Abb. 22, S. 58). Wurde die Gruppe der jüngeren Probanden (< 62 Jahre) auf Patienten ohne Diabetes (1), ohne Diabetes und ohne arteriellen Hypertonus (2) oder ohne Diabetes, ohne arteriellen Hypertonus und ohne Nikotinkonsum (3) beschränkt, so wiesen CC-Homozygote signifikant höhere Gensini-Scores als die beiden anderen Genotypen auf.

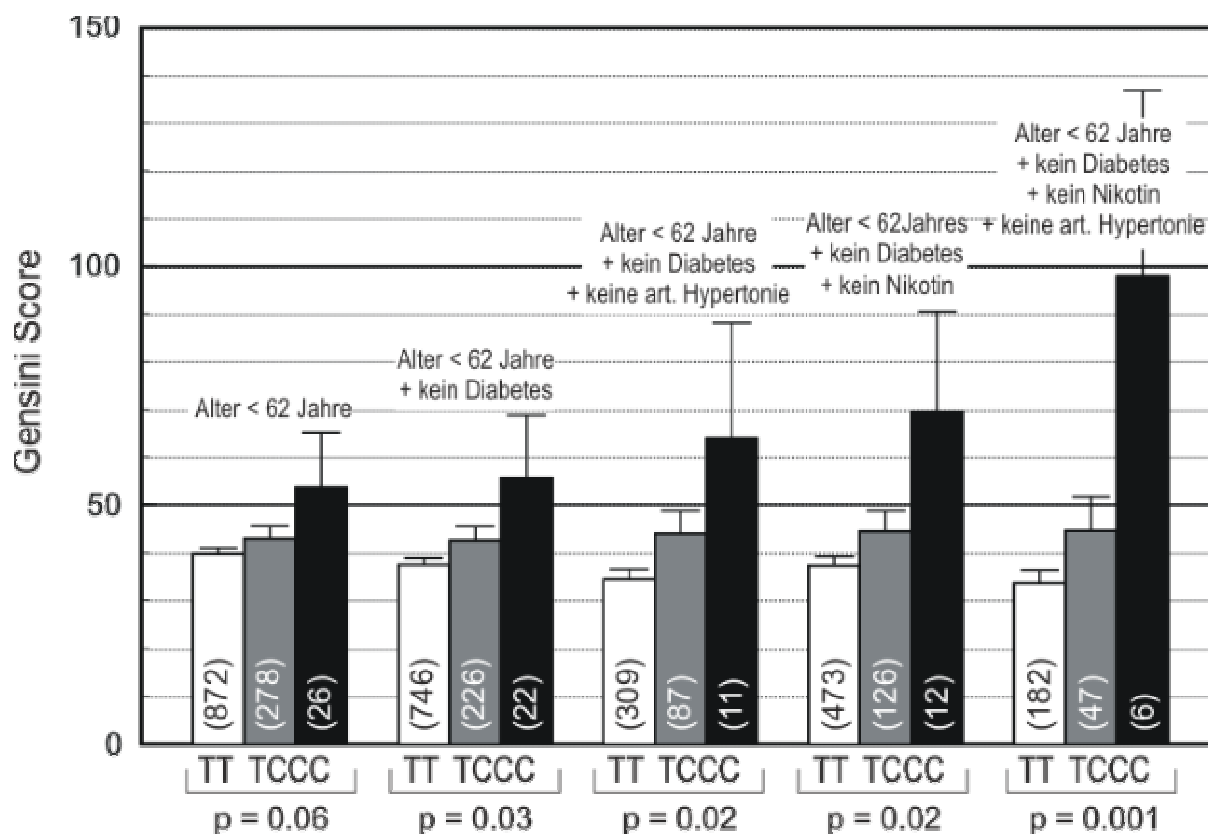


Abb. 22: Vergleich zwischen den Gensini-Score Mittelwerten der Gplb α -CC-Homozygoten und Trägern des Gplb α -T-Allels (TC- und TT-Genotypen) bei Patienten < 62 Jahre (50. Perzentile)

Die statistische Beziehung zwischen den Gplb α -Genotypen und dem Gensini-Score wurde mittels multipler Regression analysiert. Angaben als Durchschnittswerte \pm Standardfehler. Anzahl der Individuen in absoluten Zahlen.

4.5.3.2 Analyse der Subpopulation < 56 Jahre (25. Perzentile)

Aufgrund der tendenziell höheren Gensini-Scores für CC-Genotypen bei Patienten < 62 Jahre und den signifikant höheren Gensini-Scores für CC-Genotypen bei Patienten ohne Diabetes (1), ohne Diabetes und ohne arteriellen Hypertonus (2), ohne Diabetes, ohne arteriellen Hypertonus und ohne Nikotinkonsum (3) erfolgte eine weitere Restriktion der Population auf Patienten mit einem Alter < 56 Jahre (25. Perzentile). Hier zeigte sich eine signifikante Assoziation zwischen dem CC-Genotyp des Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus mit dem ermitteltem Gensini-Score ($p = 0,02$) (s. Abb.23, S. 59). Bei CC-Genotypen fand sich ein signifikant höherer KHK-Schweregrad als bei Patienten mit TC- und TT-Genotypen. Weitere Analysen von Niedrigrisikogruppen innerhalb der Subpopulation von Personen < 56 Jahre ergaben bei Patienten mit CC-Genotyp ohne Diabetes mellitus (1) sowie ohne Diabetes mellitus

und arteriellem Hypertonus (2) und ohne Diabetes mellitus, arteriellem Hypertonus und ohne Zigarettenkonsum (3) ebenfalls deutlich höhere Gensini-Scores als bei Probanden mit TC- und TT-Genotypen (s. Abb. 23, S. 59). Die Gensini-Scores der TC- und TT-Genotypen zeigten dabei innerhalb der Gesamtpopulation und in den Subpopulationen annähernd gleiche Werte (s. Abb. 22, S. 58 und Abb. 23, S. 59).

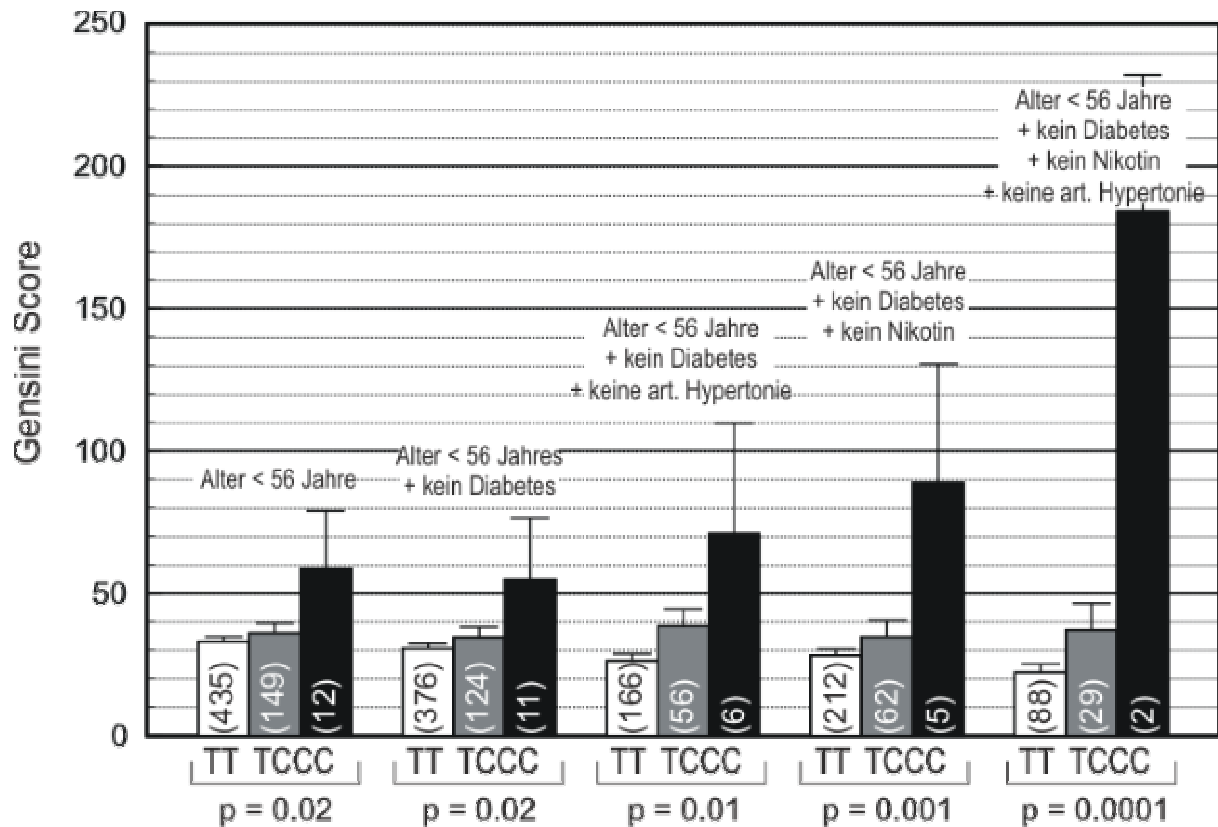


Abb. 23: Vergleich zwischen den Gensini-Score Mittelwerten der Gplb α -CC-Homozygoten und Trägern des Gplb α -T-Allels (TC- und TT-Genotypen) bei Patienten < 56 Jahre (25. Perzentile)

Die statistische Beziehung zwischen den Gplb α -Genotypen und dem Gensini-Score wurde mittels multipler Regression analysiert. Angaben als Durchschnittswerte \pm Standardfehler. Anzahl der Individuen in absoluten Zahlen.

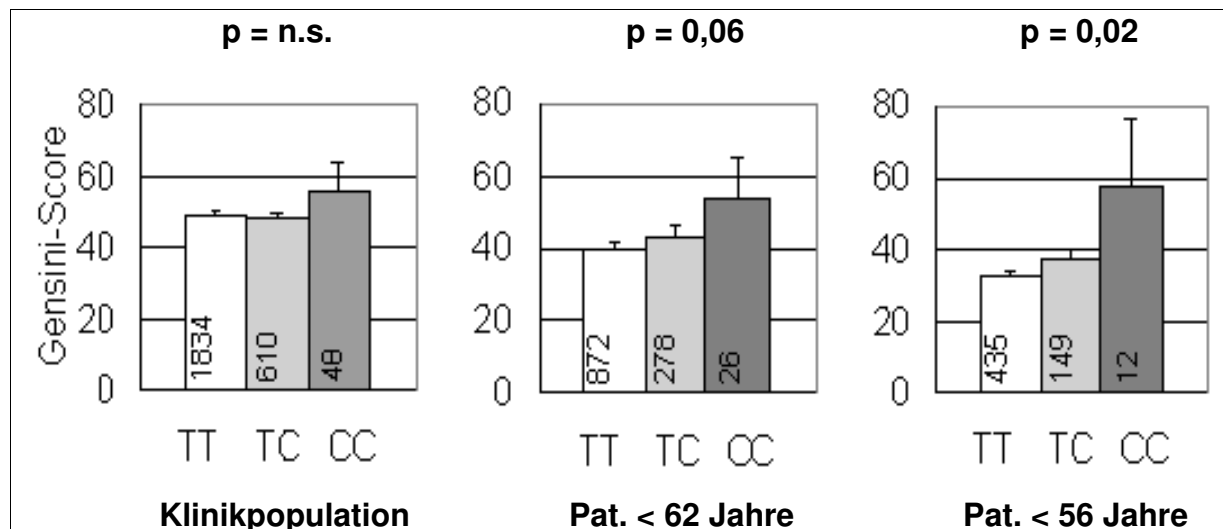


Abb. 24: Altersabhängigkeit der Assoziation des CC-Genotypen der Gplb α -Genvariation mit dem Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit

Vergleich der Gensini-Score Mittelwerte zwischen den Gplb α -CC-Homozygoten und Trägern des Gplb α T-Allels (TT-, TC-Genotyp) innerhalb der Klinikpopulation (links), bei Patienten < 62 Jahre (mitte) und bei Patienten < 56 Jahre (rechts). Angaben als Durchschnittswerte \pm Standardfehler. Anzahl der Individuen in absoluten Zahlen. Abkürzungen: n.s. = nicht signifikant; Pat. = Patient.

Festzuhalten bleibt somit eine deutliche Altersabhängigkeit der Assoziation des CC-Genotyps der Gplb α -Genvariation zum Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit bei Klinikpatienten (zusammengefasst in Abb. 24, S. 60). Zusätzliche Analysen z.B. der 10. Altersperzentile konnten aufgrund der geringen Anzahl von CC-Homozygoten nicht durchgeführt werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

4.6 Der potentielle Einfluss des Gplb α -T₍₋₅₎C-Genpolymorphismus auf das Myokardinfarktisiko

Für diese Analysen wurde die Population aus herzgesunden Probanden (n = 523) und Myokardinfarkt-Patienten (n = 1180) zu Grunde gelegt. Unabhängig vom Vererbungsmodus konnte keine Assoziation zwischen dem Gplb α -T₍₋₅₎C-Genpolymorphismus und dem Herzinfarktisiko nachgewiesen werden (s. Tab. 25, S. 61). Zusätzliche Analysen in Niedrig- und Hochrisikogruppen ergaben ebenfalls keinen Hinweis auf eine Assoziation der Gplb α -T₍₋₅₎C-Genvariation und dem Myokardinfarktisiko (Ergebnisse nicht dargestellt). Wurden die koronarangiographierten Patienten ohne Myokardinfarkt als Kontrollgruppe gewählt, so wurden auch hier im Vergleich

mit den Myokardinfarkt-Patienten nahezu identische Frequenzen der T- und C-Allele des Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus festgestellt.

Tab. 25: Verteilung der Gplb α -T₍₋₅₎C-Genotypen in Probanden ohne GefäÙerkrankung, in Myokardinfarkt-Patienten und Klinikpatienten ohne Myokardinfarkt

Kontrollgruppe / Patienten	n	Gplb α -Genotypen			T (95%KI)	C (95%KI)
		n TT	n TC	n CC		
Herzgesunde	523	386	128	9	0,86 (0,84-0,88)	0,14 (0,12-0,16)
Kein Myokardinfarkt	1312	975	310	27	0,86 (0,85-0,88)	0,14 (0,13-0,15)
≥ 1 Myokardinfarkt	1180	859	300	21	0,86 (0,84-0,87)	0,14 (0,13-0,16)

Herzgesunde wurden mit Hilfe des „Rose Questionnaire“ identifiziert. Myokardinfarkt-Patienten wurden mittels einer detaillierten, standardisierten Befragung und vorliegenden Patientenakten identifiziert. Zum Nachweis des Genpolymorphismus siehe Methoden. Die Konfidenzintervalle sind in Klammern angegeben. Abkürzungen: n = Anzahl; KI = Konfidenzintervall.

Schließlich wurde untersucht, ob es vom Genotyp abhängige Unterschiede in Bezug auf das Alter geben könnte, an dem die Patienten ihren ersten Herzinfarkt erlitten hatten. Von 1088 der 1180 Patienten konnten verlässliche Daten zum Alter beim 1. Herzinfarkt erhoben werden. Abb. 25 veranschaulicht, dass zwischen den drei Genotypen keine Unterschiede bezüglich des Alters beim 1. Myokardinfarkt beobachtet werden konnten.

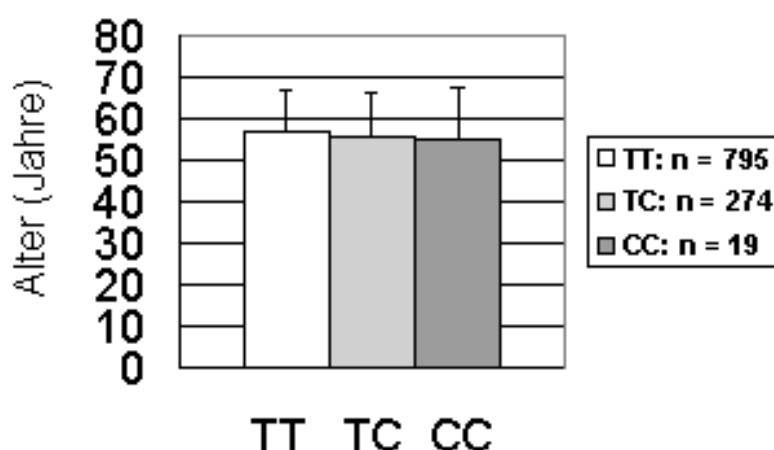


Abb. 25: Vergleich des Durchschnittsalters beim 1. Myokardinfarkt zwischen den Gplb α -T₍₋₅₎C-Genotypen

Graphische Darstellung des Alters beim 1. Myokardinfarkt. Das Durchschnittsalter wurde als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Myokardinfarkt-Patienten wurden mittels einer detaillierten,

standardisierten Befragung und vorliegender Patientenakten identifiziert. Zum Nachweis des Genpolymorphismus siehe Methoden. Abkürzungen: n = Anzahl.

Tab. 26: Vergleich des Durchschnittsalters beim 1. Myokardinfarkt zwischen den Gpl α -T₍₋₅₎C-Genotypen

GPIα-Genotypen	n	Alter (Jahre)
TT	795	56,6 \pm 9,9
TC	274	56,1 \pm 10,1
CC	19	54,8 \pm 12,3
Gesamt	1088	56,4 \pm 10,0

In der Tabelle werden die in Abb. 25 dargestellten Daten in tabellarischer Form zusammengefasst. Das Durchschnittsalter wurde als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Myokardinfarkt-Patienten wurden mittels einer detaillierten, standardisierten Befragung und vorliegender Patientenakten identifiziert. Zum Nachweis des Genpolymorphismus siehe Methoden. Abkürzungen: n = Anzahl.

5 Diskussion

5.1 Der potentielle Einfluss des Gplb α -T₍₋₅₎C-Genpolymorphismus auf das Risiko und den Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit: Kurzdarstellung der Studienergebnisse

Die untersuchte Gesamtpopulation bestand aus 3015 männlichen Probanden und setzte sich aus 2492 koronarangiographierten Patienten (Klinikpopulation) und 523 Herzgesunden (Kontrollgruppe) zusammen. Die Koronare Herzkrankheit wurde über den Gefäßstatus (ab einem Stenosegrad der Herzkranzgefäße $\geq 50\%$) und über den Gensini-Score definiert (s. Kap. 3.2, S. 15). Entsprechend den Koronarangiographiebefunden wurde die Klinikpopulation in Patienten ohne KHK mit Nullgefäßerkrankung ($n = 574$), Patienten mit Eingefäßerkrankung ($n = 512$), Patienten mit Zweigefäßerkrankung ($n = 538$) und Patienten mit Dreigefäßerkrankung ($n = 868$) eingeteilt. Die Gplb α -T₍₋₅₎C-Genotypen wurden mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse (RFLP) bei allen Probanden ermittelt (s. Kap. 3.7.5, S. 27). Bei 2220 Probanden (73,63%) wurde ein TT-Genotyp, bei 738 Probanden (24,48%) ein TC-Genotyp und bei 57 Probanden (1,89%) ein CC-Genotyp nachgewiesen (s. Kap. 4.4, Abb.20, S. 52). Der relative Anteil an Patienten mit Koronarer Herzkrankheit nahm mit steigendem Alter zu (s. Kap. 4.1, Abb. 9 und Tab. 9, S. 36). Auch bezüglich des Myokardinfarktes zeigte sich eine deutliche Altersabhängigkeit (s. Kap. 4.1, Abb. 11, S. 39, Tab. 11, S. 39). Der allgemein anerkannte Zusammenhang zwischen Koronarer Herzkrankheit und Myokardinfarkt konnte somit auch in der vorliegenden Studienpopulation nachgewiesen werden. Der Vergleich der etablierten Risikofaktoren der Koronaren Herzkrankheit bzw. des Myokardinfarkts in Abhängigkeit von den Gplb α -T₍₋₅₎C-Genvarianten (Herzgesunde vs. KHK-Patienten bzw. Herzgesunde vs. Myokardinfarkt-Patienten) zeigte keine vom Genotyp abhängigen Unterschiede (s. Kap. 4.5, Tab. 21, S. 53 und Tab. 22, S. 54). Der potentielle Einfluss des Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus auf das Risiko und den Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit sowie das Myokardinfarkttrisiko wurde in der Population aus KHK-Patienten ($n = 1918$) und Herzgesunden ($n = 523$) untersucht. Mit allen Vererbungsmodellen ließ sich keine Assoziation zwischen dem Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus und dem Risiko der Koronaren Herzkrankheit (s. Kap. 4.5.1, Tab. 23, S. 55) sowie dem Schweregrad der

KHK (s. Kap. 4.5.2, Tab. 24, S. 56 und Abb. 21, S. 57) nachweisen. Subpopulationsanalysen von (1) Probanden mit einem Alter < 62 Jahre (50. Perzentile) und (2) einem Alter < 56 Jahre (25. Perzentile) zeigten für Patienten mit homozygotem CC-Genotyp tendenziell höhere Gensini-Scores (Alter < 62 Jahre) bzw. eine signifikante Assoziation (Alter < 56 Jahre) zwischen dem homozygotem CC-Genotyp und dem ermitteltem Gensini-Score ($p = 0,02$) (s. Kap. 4.5.3., Abb. 22, S. 58, Abb. 23, S. 59). Festzuhalten bleibt somit eine altersabhängige Assoziation zwischen dem CC-Genotyp des Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus und dem Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit (s. Kap. 4.5.3, Abb. 24, S. 60). Die Analysen zum potentiellen Einfluss des Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus auf das Myokardinfarkttrisiko (Herzgesunde vs. Herzinfarktpatienten) zeigten unabhängig vom Vererbungsmodus keine Assoziation zwischen dem Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus und dem Myokardinfarkttrisiko (s. Kap. 4.6, Tab. 25, S. 61). Die abschließenden Untersuchungen, ob es vom Genotyp abhängige Unterschiede in Bezug auf das Alter geben könnte, an dem die Patienten ihren ersten Herzinfarkt erlitten hatten, zeigten zwischen den drei Genotypen keine Unterschiede bezüglich des Alters beim 1. Myokardinfarkt (s. Kap. 4.6, Abb. 25, S. 61 und Tab. 26, S. 62).

5.2 Der Gplb α -T₍₋₅₎C-Genpolymorphismus: Darstellung bisheriger Publikationen

Grundlage der vorliegenden Arbeit war die zu Beginn unserer Untersuchungen im Juli 1999 vorliegende Publikation von Afshar-Kharghan et al. bezüglich des potentiellen Einfluss des Gplb α -T₍₋₅₎C-Genpolymorphismus auf die Expression des thrombozytären Gplb α -Oberflächenrezeptors [1]. Die Untersuchungen von Afshar-Kharghan et al. basierten auf der von Kaski et al. im Jahre 1996 veröffentlichten Erstbeschreibung des Gplb α -T₍₋₅₎C-Genpolymorphismus [47]. Im Verlauf und nach Abschluss unserer Untersuchungen wurden weitere Studien anderer Forschungsgruppen über den Gplb α -T₍₋₅₎C-Genpolymorphismus publiziert [16, 20, 21, 24, 31, 44, 45, 46, 51, 72, 84, 91].

5.2.1 Struktur des Glykoproteins Iba

Das Aufbrechen oder Unterbluten eines atherosklerotischen Plaques, gefolgt von der Freisetzung thrombogenen Materials, und die Entstehung eines okklusiven

Thrombus ist die häufigste Ursache eines akuten Koronargefäßverschlusses. Eine Hauptrolle in diesem dramatischen Geschehen spielen die Blutplättchen, die Thrombozyten [33]. Die Thrombozytenadhäsion an die verletzte Gefäßwand setzt eine Kaskade in Gang an deren Ende entweder die physiologische Hämostase mit dem Ziel der Blutungskontrolle oder die pathophysiologische Thrombusbildung steht. [4, 5, 10, 33, 59, 63, 86, 93]. Entscheidend vermittelt werden beide Vorgänge durch den thrombozytären Glykoprotein-Komplex Gplb-IX-V [4, 5, 19, 33, 68, 80, 81, 94]. Der Gplb-IX-V-Komplex setzt sich aus vier transmembranösen Glykoproteinen zusammen: Gplb α , Gplb β , GpIX und GpV [4, 5, 29, 33, 64, 68, 69, 74, 94].

Gplb α (135kD, 610 Aminosäuren) besteht aus einer N-terminalen extrazellulären Domäne, die sieben leucinreiche Aminosäuresegmente, die „tandem repeats“ enthält, einer hochgradig glykosylierten Makroglykopeptid-Domäne sowie aus einer transmembranösen Domäne und einem zytoplasmatischen Anteil [65]. Die extrazelluläre Domäne weist eine Bindungsstelle für den von-Willebrand-Faktor (vWF) und Thrombin auf [23]. Der zytoplasmatische Anteil enthält Bindungsstellen für zwei Proteine, welche die funktionelle Aktivität des Gplb-IX-V-Komplex beeinflussen (s. Kap. 1.2.1, S. 3) [3, 25]. Die DNA-Sequenz der Gplb α -Untereinheit [110] weist verschiedene Polymorphismen auf (s. Kap. 1.4, S. 10) [1, 12, 45, 47, 75, 97, 98]. Einer dieser Polymorphismen ist der Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus. Aufgrund seiner Lokalisation innerhalb der Initiationssequenz für die Translation des Gplb α -Gens wird dieser Polymorphismus auch als Kozak-Sequenz-Polymorphismus des Gplb α -Gens bezeichnet [1]. Als Kozak-Konsensus-Sequenz ist heute die Nukleotidsequenz GCCGCCACCATGG definiert. Genvariationen der Nukleotide, welche das Initiatorcodon ATG umgeben, besitzen Einfluss auf die Translation und damit auf die Synthese von Proteinen (s. Kap. 1.3, S. 9) [54, 55, 56, 57, 58].

5.2.2 Publierte Untersuchungen zur Oberflächendichte des Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus

Im Rahmen systematischer Untersuchungen zu genetischen Variationen im menschlichen Gplb α -Gen entdeckten Kaski et al. 1996 einen T₍₋₅₎C-Dimorphismus, welcher auf dem Vorhandensein von Thymin (T) oder Cytosin (C) an der Position -5 vor dem ATG-Initiatorcodon des Gplb α -Gens beruht [47]. Die funktionelle Bedeutung dieses Polymorphismus wurde von Kaski et al. jedoch nicht weiter untersucht. Aufgrund der Lokalisation des T₍₋₅₎C-Dimorphismus innerhalb der Initiationssequenz

für die Translation des Gplb α -Gens untersuchten Afshar-Kharghan et al. 1999 den Einfluss des Gplb α -T₍₋₅₎C-Genpolymorphismus auf die Expression des Gplb α -Oberflächenrezeptors [1]. Bei Vorliegen der ₍₋₅₎C-Genvariation zeigte sich eine erhöhte Gplb α -Expression gegenüber der ₍₋₅₎T-Genvariation [1]. Afshar-Kharghan et al. erklärten diesen Befund durch die höhere Übereinstimmung der ₍₋₅₎C-Kozak-Sequenz des Gplb α -Gens „GCCCTCATGC“ mit der Kozak-Konsensus-Sequenz „GCCACC ATGG“, was zu einer effektiveren Translation der mRNA mit Cytosin (C) an Position -5 führt. Die effektivere Translation der mRNA führt wiederum zu einer erhöhten Expression des Oberflächenmoleküls Glykoprotein-Ib α [1]. Die von Afshar-Kharghan et al. beschriebene erhöhte Expressionsrate des Glykoproteins Gplb α bei Trägern des ₍₋₅₎C-Allels des Gplb α -T₍₋₅₎C-Genpolymorphismus konnte jedoch in Studien von Corral et al. (2000) [20], Santoso et al. (2002) [99], Huang et al. (2003) [44] und Jilma-Stohlawetz et al. (2003) [46] nicht bestätigt werden.

Corral et al. genotypisierten 101 Patienten mit abgelaufenem Akuten Koronarsyndrom (definiert als Myokardinfarkt und/oder instabile Angina pectoris), 104 Patienten mit cerebraler arterieller Verschlusskrankheit und 139 gesunde Probanden bezüglich des Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Oberflächendichte der thrombozytären Glykoproteinrezeptoren bestimmt. Die statistischen Analysen zeigten keine Assoziation zwischen dem Gplb α -T₍₋₅₎C-Genpolymorphismus und der Expressionsrate der thrombozytären Oberflächenrezeptoren [20]. Santoso et al. führten Durchflusszytometrie-Untersuchungen zur Bestimmung der Oberflächendichte der einzelnen Untereinheiten des Gplb-IX-V-Komplexes durch [99]. Um einen eventuell verfälschenden Einfluss des VNTR- und des HPA-2-Polymorphismus des Gplb α -Gens zu vermeiden, wurden nur Probanden mit gleichen Phänotypen des VNTR- und HPA-2-Polymorphismus (VNTR-C Variante, HPA-2b) untersucht. Homozygote ₍₋₅₎T-Allel-Träger (TT-Genotyp) sowie homozygote ₍₋₅₎C-Allel-Träger (CC-Genotyp) exprimierten die Glykoproteine Gplb α , GplX und GpV in gleicher Anzahl. Wie bei Corral et al. zeigte sich keine Assoziation des Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus mit der Glykoprotein-Expressionsrate [99]. Huang et al. untersuchten, ob die Glykoproteinpolymorphismen C807T in Gpl α , PI(A1/A2) in GplIIa, und der Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus die Oberflächendichte der drei wichtigen Oberflächenrezeptoren Gpl α , GplIIa und Gplb α beeinflussen. 45 Probanden wurden entsprechend genotypisiert und die Oberflächendichten der Glykoproteine mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. Die thrombozytäre Gplb α -Oberflächendichte war

nicht mit dem Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus assoziiert [44]. Jilma-Stohlawetz et al. untersuchten den Einfluss des VNTR-, HPA-2- und Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus auf die Thrombusentstehung. 233 gesunde Probanden wurden genotypisiert und die Oberflächendichte der Glykoproteine durchflusszytometrisch bestimmt. Es fand sich keine Assoziation zwischen dem Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus und der Oberflächendichte der thrombozytären Glykoproteine [46].

5.3 Publierte Untersuchungen zur Assoziation des Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus mit der ischämischen Herzerkrankung

5.3.1 Vergleich der Allelfrequenzen der ₍₋₅₎C- und ₍₋₅₎T-Variante des Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus mit Allelfrequenzen bisheriger Publikationen

Der Vergleich zwischen den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Allelfrequenzen der ₍₋₅₎C- und ₍₋₅₎T-Variante des Gplb α -T₍₋₅₎C-Genpolymorphismus mit den zu Beginn unserer Untersuchungen vorliegenden [1, 47] und im Verlauf und nach Abschluss unserer Untersuchungen in weiteren Studien publizierten Allelfrequenzen [16, 21, 24, 45, 91] zeigte keine signifikanten Unterschiede. In der vorliegenden Arbeit fand sich die ₍₋₅₎C-Variante des Gplb α -Genpolymorphismus mit einer Allelfrequenz von 13% bis 15% (Herzgesunde: 14%, n = 523; Nullgefäßerkrankung: 14%, n = 574; Eingefäßerkrankung: 15%, n = 512; Zweigefäßerkrankung: 15 %, n = 538; Dreigefäßerkrankung: 13%, n = 868; kein Myokardinfarkt: 14%, n = 1312; ≥ 1 Myokardinfarkt: 14%, n = 1180; s. Kap. 4.5.1, Tab 23, S.55 und Kap. 4.6, Tab. 25, S.61). Afshar-Kharghan et al. genotypisierten DNA-Proben von Afro-Amerikanern (n = 92), Finnen (n = 82), australischen Ureinwohnern (n = 38), Süd-Ost-Asiaten (n = 68) und französischen Kaukasiern (Menschen mit weißer Hautfarbe), Referenzfamilien des CEPH, Centre d'Étude du Polymorphisme Humain, (n = 372) [1]. Die Allelfrequenzen für die ₍₋₅₎C-Variante lagen zwischen 7,9% und 17,4% (Afro-Amerikaner: 17,4% (T: 82,6%), Finnen 17,1% (T: 82,9%), australische Aborigenes: 7,9% (T: 92,1%), Süd-Ost-Asiaten: 16,2% (T: 83,8%), französische Kaukasier: 13,2% (T: 86,6%) [1]. Kaski et al. fanden die ₍₋₅₎C-Variante des Gplb α -Genpolymorphismus innerhalb einer finnischen Population (n = 50) bei 16,0% (T: 84,0%) [47]. Corral et al. genotypisierten 139 Kaukasier aus Süd-Spanien bezüglich des Gplb α -T₍₋₅₎C-Genpolymorphismus. Die Allelfrequenz für die ₍₋₅₎C-Variante lag bei 10,8% (T: 89,2%)

[16]. Croft et al. genotypisierten in einer Fall-Kontroll Studie 1037 Kaukasier aus Großbritannien. Für die $T_{(-5)}C$ -Variante zeigte sich eine Allelfrequenz von 11,0% (T: 89,0%) [21]. In der von Douglas et al. genotypisierten Population aus 180 Kaukasiern aus Großbritannien und 76 indischen Asiaten fand sich die $T_{(-5)}C$ -Variante in einer Allelfrequenz von 13,7% (T: 86,3%) [24]. Ishida et al. genotypisierten 314 Japaner. Die Allelfrequenz für die $T_{(-5)}C$ -Variante lag bei 28,3% (T: 71,7%) [45]. Rosenberg et al. genotypisierten 100 Probanden mit asiatisch-afrikanischer (n = 34), europäisch-amerikanischer (n = 57) und israelischer bzw. gemischter Abstammung (n = 9) auf den Gplb α - $T_{(-5)}C$ -Polymorphismus. Die Allelfrequenz für die $T_{(-5)}C$ -Variante lag bei 13,0% (T: 87,0%) [91]. Bei zusätzlich genotypisierten 119 Probanden (asiatisch-afrikanische Abstammung, n = 66; europäisch-amerikanische Abstammung, n = 36; israelischer bzw. gemischter Abstammung, n = 17) fand sich eine Allelfrequenz für die $T_{(-5)}C$ -Variante von 11,3% (T: 88,7%) [91]. In den Studien von Cadroy et al. [16], Frank et al. [31], Huang T et al. [44], Jilma-Stohlawetz et al. [46], Kenny et al. [51], Meisel et al. [72] und Ozelo et al. [84] wurden keine Allelfrequenzen angegeben.

5.3.2 Studien in denen keine Assoziation des Gplb α - $T_{(-5)}C$ -Polymorphismus mit der ischämischen Herzerkrankung beobachtet wurde

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich zwar eine altersabhängige Assoziation zwischen dem CC-Genotyp des Gplb α - $T_{(-5)}C$ -Polymorphismus und dem Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit jedoch keine Assoziation zwischen dem Gplb α - $T_{(-5)}C$ -Polymorphismus und dem Risiko der Koronaren Herzkrankheit sowie dem Schweregrad der KHK. Zusätzlich fand sich keine Assoziation mit dem Myokardinfarkttrisiko. Im Folgenden werden die Studien beschrieben, welche ebenfalls keine Assoziation des Gplb α - $T_{(-5)}C$ -Polymorphismus mit dem KHK-Risiko, bzw. dem KHK-Schweregrad feststellen konnten. Zusätzlich sind die Studien angeführt, welche keinen Einfluss des Gplb α - $T_{(-5)}C$ -Polymorphismus auf die Rezeptordichte von Gplb α , bzw. auf eine gesteigerte Thrombusentstehung feststellen konnten.

Im Jahr 2000 genotypisierten Corral et al. die DNA-Proben von 139 Kaukasiern (71 Männer, 68 Frauen; Durchschnittsalter 36,8 J \pm 12,9 J) aus Süd-Spanien bezüglich des Gplb α - $T_{(-5)}C$ -Polymorphismus [20]. Zusätzlich wurde die Rezeptordichte von Gplb α bestimmt (20 Probanden mit dem TC-Genotyp und 20 Probanden mit dem TT-Genotyp). Das Ziel der Studie war es, die von Afshar-Kharghan et al. beschriebene

erhöhte Gplb α -Expression bei Vorliegen der (-5) C-Genvariation [1] näher zu untersuchen. Die statistische Analyse der Ergebnisse der Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenzuntersuchungen zeigte keinen Einfluss der Genotyp-Varianten auf die Rezeptordichte von Gplb α . Um eine mögliche Assoziation zwischen den Genvarianten des Gplb α -Gens und der Koronaren Herzkrankheit zu analysieren, genotypisierten Corral et al. zusätzlich 101 Patienten mit abgelaufenem Akuten Koronarsyndrom. Zwischen der Patientengruppe und der Kontrollgruppe wurde kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der TT-, TC- und CC-Genotypen beobachtet [20]. Somit ergab sich kein Anhalt für eine Assoziation zwischen dem Gplb α -T (-5) C-Polymorphismus und dem KHK-Risiko. Croft et al. führten 2000 eine Fall-Kontroll-Studie mit 539 Myokardinfarkt-Patienten (Kaukasier, Männer 67,9%, Durchschnittsalter 61,9 Jahre \pm 9,2 Jahre) und 498 Probanden ohne Gefäßerkrankung als Kontrollgruppe durch [21]. Es fand sich keine Assoziation der (-5) C-Variante mit dem Myokardinfarktrisiko [21]. Douglas et al. untersuchten 2002 den potentiellen Einfluss des Gplb α -T (-5) C-Polymorphismus auf den Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit sowie auf das Myokardinfarktrisiko [24]. 256 koronarangiographierte Patienten (180 Kaukasier, 76 indische Asiaten) zwischen 33 und 88 Jahren wurden genotypisiert. Die Population wurde in 88 Patienten (79 Männer; 9 Frauen) mit abgelaufenem Myokardinfarkt und 168 Patienten (101 Männer; 67 Frauen) ohne Hinweis auf einen abgelaufenen Myokardinfarkt unterteilt. Die beiden Gruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede bezüglich Alter, ethnischer Herkunft sowie den etablierten Risikofaktoren. Lediglich die Geschlechtsverteilung war mit 79 Männern in der Myokardinfarktgruppe gegenüber 101 Männern in der Nicht-Myokardinfarktgruppe signifikant unterschiedlich. Die statistische Analyse der Genotypenverteilung ergab keine Assoziation des Gplb α -T (-5) C-Polymorphismus mit dem Schweregrad der Koronaren Herzerkrankung. Bezüglich des Myokardinfarktrisikos stellten Douglas et al. eine signifikante Assoziation des homozygoten TT-Genotyps des Gplb α -T (-5) C-Polymorphismus mit dem Auftreten eines Myokardinfarkts fest. Im Jahre 2001 genotypisierten Frank et al. 184 Frauen mit abgelaufenem Myokardinfarkt (n = 78) bzw. ischämischen apoplektischen Insult (n = 106) bezüglich des Gplb α -T (-5) C-Polymorphismus [31]. Die Kontrollgruppe bestand aus 384 gesunden Frauen ohne Hinweis auf eine Gefäßerkrankung. Das Durchschnittsalter lag zwischen 18 und 44 Jahren. Die statistische Analyse zeigte keine Assoziation des Gplb α -T (-5) C-Polymorphismus mit dem Auftreten eines

Myokardinfarkts bzw. eines ischämischen apoplektischen Insults [31]. Ishida et al. untersuchten im Jahre 2000 eine rein asiatische Population [45]. 156 japanische koronarangiographierte KHK-Patienten und 158 gesunde Probanden ohne Hinweis auf eine Gefäßerkrankung wurden genotypisiert. Die Patientengruppe bestand aus 107 Patienten mit abgelaufenem Myokardinfarkt, 16 Patienten mit instabiler und 33 Patienten mit stabiler Angina pectoris. Der Gpl β -T₍₋₅₎C-Polymorphismus war nicht mit der Koronaren Herzkrankheit assoziiert [45]. 2003 untersuchten Ozelo et al. eine brasilianische Population aus 180 Patienten mit abgelaufenem Myokardinfarkt und 180 vergleichbare gesunde Probanden [84]. Es zeigte sich keine Assoziation zwischen dem Gpl β -T₍₋₅₎C-Polymorphismus und dem KHK-Schweregrad sowie der Entstehung eines Myokardinfarktes [84]. 2004 untersuchten Rosenberg et al. das potentielle Risiko des Gpl β -T₍₋₅₎C-Polymorphismus auf die Entstehung eines Myokardinfarkts. 100 männliche Patienten jünger als 53 Jahre mit einem abgelaufenem Myokardinfarkt sowie 119 gesunde Probanden ohne Gefäßerkrankung wurden genotypisiert. Die ₍₋₅₎C-Genvariante fand sich häufiger in der Patientengruppe als in der Kontrollgruppe, jedoch ohne statistische Signifikanz. Der Gpl β -T₍₋₅₎C-Polymorphismus stellte sich nicht als unabhängiger Risikofaktor für den akuten Myokardinfarkt dar. 2001 wurde von Meisel et al. eine Fall-Kontroll-Studie mit 1000 koronarangiographierten KHK-Patienten (759 Männer, 241 Frauen, Durchschnittsalter 60,6 Jahre) und 1000 alters- und geschlechtsentsprechenden Kontrollindividuen (759 Männer, 241 Frauen, Durchschnittsalter 60,5 Jahre) zur Bestimmung des Einfluss des Gpl β -T₍₋₅₎C-Polymorphismus auf das Risiko der Koronaren Herzkrankheit und das Komplikationsrisiko nach perkutaner transluminaler koronarer Angioplastie (PTCA) durchgeführt [72]. Von den koronarangiographierten Patienten hatten 235 Patienten ein Akutes Koronarsyndrom erlitten (144 Patienten mit instabiler Angina pectoris, 91 Patienten mit Myokardinfarkt). 673 Patienten mussten einer interventionellen Therapie unterzogen werden, 269 Patienten erhielten eine PTCA, 278 Patienten eine PTCA mit zusätzlicher Einlage eines Koronarstents. Bei 103 Patienten wurde eine koronare Atherektomie durchgeführt. Es erfolgte eine post-interventionelle Beobachtung über 30 Tage hinweg. Als Endpunkte wurden die erneute Revaskularisierung durch PTCA oder durch aortokoronare Bypassoperation, Myokardinfarkt und Tod definiert. Alle Probanden wurden auf den Gpl β -T₍₋₅₎C-Polymorphismus genotypisiert. Die statistische Analyse zeigte eine signifikante Häufung der ₍₋₅₎C-Variante innerhalb der Gruppe der Patienten mit Akutem

Koronarsyndrom (Angina pectoris, Myokardinfarkt) sowie eine signifikante Assoziation der $_{(-5)}C$ -Variante des Gplb α -T $_{(-5)}C$ -Polymorphismus mit dem Komplikationsrisiko der PTCA. Es bestand keine Assoziation mit dem Risiko der Koronaren Herzkrankheit [72]. Huang et al. untersuchten 2003 bei 54 gesunden Kaukasiern (26 Männer, 28 Frauen) im Alter von 19 bis 65 Jahren den Einfluss des Gplb α -T $_{(-5)}C$ -Polymorphismus auf die Expression der thrombozytären Glykoproteine [44]. Die statistische Auswertung der mittels Genotypisierung und Durchflusszytometrie gewonnenen Daten zeigte keine Assoziation mit der Oberflächenexpression des Gplb α -Rezeptors [44]. Ergänzend zu der vorliegenden Arbeit führten Santoso et al. Untersuchungen über die Oberflächendichte der einzelnen Untereinheiten des Gplb-IX-V-Komplexes durch [99]. Träger des homozygoten TT-Genotyps sowie Träger des homozygoten CC-Genotyps des Gplb α -T $_{(-5)}C$ -Polymorphismus exprimierten die Untereinheiten Gplb α -, GplX- und GpV- des Gplb-IX-V-Komplexes in gleicher Anzahl. Somit fand sich auch in dieser Untersuchung keine Assoziation des Gplb α -T $_{(-5)}C$ -Polymorphismus mit der Expressionsrate der Glykoproteine [99].

5.3.3 Studien in denen eine Assoziation des Gplb α -T $_{(-5)}C$ -Polymorphismus mit der ischämischen Herzerkrankung beobachtet wurde

Im Folgenden werden die Studien genannt, in denen eine Assoziation des Gplb α -T $_{(-5)}C$ -Polymorphismus mit der ischämischen Herzerkrankung im Sinne eines erhöhten Thromboserisikos oder Myokardinfarktrisikos festgestellt wurde.

Durch Afshar-Kharghan et al. wurde 1999 erstmalig die funktionelle Bedeutung des Gplb α -T $_{(-5)}C$ -Genpolymorphismus untersucht [1]. Die Expression des Gplb α -Rezeptors wurde mit Hilfe von Transfektionsuntersuchungen an Ovarialzellen chinesischer Hamster (CHO-Zellen) untersucht. Die Ovarialzellen wurden zunächst mit der Gplb α -cDNA (Plasmid) der $_{(-5)}C$ -Variante, der $_{(-5)}T$ -Variante oder beiden Varianten transfiziert. Mittels Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz wurde dann die Expressionsrate des Gplb α -Rezeptors bestimmt. Die CHO-Zellen, welche mit dem $_{(-5)}C$ -Plasmid transfiziert wurden, zeigten eine signifikant höhere Expressionsrate des Gplb α -Rezeptors, als die mit dem $_{(-5)}T$ -Plasmid transfizierten CHO-Zellen. Auch im Vergleich mit den CHO-Zellen, welche mit dem $_{(-5)}C$ - und $_{(-5)}T$ -Plasmid transfiziert wurden, zeigte sich eine signifikant höhere Expressionsrate des Gplb α -Rezeptors für die CHO-Zellen, welche nur mit dem $_{(-5)}C$ -Plasmid transfiziert

wurden [1]. Zusätzlich genotypisierten Afshar-Kharghan et al. DNA-Proben von Afro-Amerikanern (n = 92), Finnen (n = 82), australischen Ureinwohnern (n = 38), Süd-Ost-Asiaten (n = 68) und französischen Kaukasiern (Referenzfamilien des CEPH, Centre d'Étude du Polymorphisme Humain; n = 372). Bei jeweils einer Probe der drei möglichen Genotypen des Gplb α -T₍₋₅₎C-Genpolymorphismus (CC, TC, TT) wurde dann die Expressionsrate des Gplb α -Rezeptors bestimmt. Bei Vorliegen der ₍₋₅₎C-Genvariation des Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus fanden Afshar-Kharghan et al. gegenüber der ₍₋₅₎T-Genvariation, eine erhöhte Gplb α -Expression [1]. Aufgrund der entscheidenden Rolle des Gplb-IX-V-Komplexes für die Thrombozytenadhäsion postulierten Afshar-Kharghan et al. wegen der erhöhten Expression des Glykoproteinrezeptors Gplb α ein erhöhtes Thromboserisiko und Myokardinfarktrisiko [1]. Im Jahre 2001 untersuchten Cadroy et al. bei 40 gesunden, männlichen Kaukasiern zwischen 21 und 41 Jahren den Einfluss des Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus auf die Thrombusentstehung bei unterschiedlich starken Scherkräften [16]. Hierfür verwendeten sie eine mit menschlichen Typ I Kollagen beschichtete Flusskammer, durch welche die Blutproben der zuvor genotypisierten Probanden pulsatil gepumpt wurden. Bei Scherkräften von 650/s zeigte sich für heterozygote TC-Genotypen des Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus eine signifikant höhere Thrombozytenablagerung pro Zeiteinheit (4 Minuten), als für homozygote TT-Genotypen. Cadroy et al. schlussfolgerten, dass für die ₍₋₅₎C-Variante des Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus ein erhöhtes Thrombose- und Myokardinfarktrisiko vorliegt und sahen hierdurch die Ergebnisse von Afshar-Kharghan et al. bestätigt [1, 16]. In weiteren Messungen bei Scherkräften von 2600/s stellten Cadroy et al. keine signifikante Beziehung zwischen dem Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus und der Thrombusentstehung fest [16]. Jilma-Stohlawetz et al. [46] untersuchten ebenfalls die Rolle des Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus bei der Thrombusbildung unter hohen, pathophysiologisch relevanten Scherkräften (5000/s – 6000/s). 233 gesunde Probanden (134 Männer, 99 Frauen) wurden zunächst genotypisiert. Im Gegensatz zu Cadroy et al. [16] fanden sie für den homozygoten TT-Genotyp des Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus eine um 20% schnellere Thrombusbildung gegenüber dem heterozygoten TC-Genotyp [46]. 2002 untersuchten Kenny et al. den Einfluss des Gplb α -T₍₋₅₎C-Genpolymorphismus auf das Outcome bei Patienten mit Akutem Koronarsyndrom [51]. 1014 Patienten mit instabiler Angina pectoris wurden genotypisiert. Die Patienten entstammten der Studienpopulation der „OPUS-TMI 16“-Multicenterstudie, in welcher die Wirksamkeit des GplIb/IIIa-

Antagonisten Orbofiban™ untersucht wurde. Die genotypisierte Population bestand aus 924 Kaukasiern, 30 Afroamerikanern, 20 Asiaten, 37 Mittel-/Südamerikanern und 3 Patienten mit gemischtem ethnischen Hintergrund. Das Durchschnittsalter lag bei 58 Jahren. Um den Einfluss ethnischer Unterschiede auszuschliessen, wurden nur die 924 Kaukasier in die statistische Analyse einbezogen. Es fand sich ein signifikant erhöhtes Myokardinfarkttrisiko für Patienten mit der $(-5)C$ -Variante des Gplb α -T $(-5)C$ -Genpolymorphismus (Myokardinfarkttrisiko: homozygoter TT-Genotyp: 2,3%; heterozygoter TC-Genotyp: 5,0%; homozygoter CC-Genotyp: 16,7%) [51]. Zusätzlich wurde der potentielle Einfluss des Polymorphismus auf die Blutungsneigung bei Patienten unter Orofiban™-Therapie untersucht. Unter der Annahme, dass bei Vorliegen der $(-5)C$ -Variante des Gplb α -T $(-5)C$ -Genpolymorphismus die Thrombusentstehung begünstigt wird, erwarteten Kenny et al. bei Trägern der $(-5)C$ -Variante eine verminderte Blutungsneigung. Es fand sich eine geringfügig, jedoch nicht signifikant verminderte Blutungsneigung bei Trägern des $(-5)C$ -Allels des Gplb α -T $(-5)C$ -Polymorphismus [51].

5.4 Vergleich der Studien über die Assoziation des Gplb α -T $(-5)C$ -Polymorphismus zur ischämischen Herzerkrankung und den Myokardinfarkt

5.4.1 Erklärungsansätze für die kontroversen Studienergebnisse

Im Folgenden sollen methodische Unterschiede der Studien zur potentiellen Assoziation zwischen dem Gplb α -T $(-5)C$ -Genpolymorphismus und der ischämischen Herzerkrankung und dem Myokardinfarkt aufgezeigt werden [20, 21, 24, 31, 45, 51, 72, 84, 91, 99]. Die Arbeiten, welche den Einfluss des Gplb α -T $(-5)C$ -Genpolymorphismus auf die Gplb α -Expression [1, 20, 44, 99] und die Thrombusbildung untersuchten [16, 46] werden ebenfalls in die kritische Betrachtung miteinbezogen.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigten keine Assoziation des Gplb α -T $(-5)C$ -Polymorphismus mit dem Risiko der Koronaren Herzkrankheit, dem KHK-Schweregrad und dem Herzinfarkttrisiko, jedoch zeigten Subpopulationsanalysen eine altersabhängige Assoziation zwischen dem CC-Genotyp des Gplb α -T $(-5)C$ -Polymorphismus und dem Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit.

Corral et al. [20], Croft et al. [21], Douglas et al. [24], Frank et al. [31], Ishida et al. [45], Meisel et al. [72], Ozelo et al. [84] und Rosenberg et al. [91] konnten ebenfalls

keine Assoziation des Gplb α -T₍₋₅₎C-Genpolymorphismus mit der ischämischen Herzkrankheit feststellen. Nur Kenny et al. [51], Afshar-Kharghan et al. [1], Cadroy et al. [16] und Jilma-Stohlawetz et al. [46] fanden eine Assoziation des Gplb α -T₍₋₅₎C-Genpolymorphismus mit der ischämischen Herzerkrankung. Kenny et al. stellten ein signifikant erhöhtes Myokardinfarktrisiko für Patienten mit der (-5)C-Variante des Gplb α -T₍₋₅₎C-Genpolymorphismus fest [51]. Auch Afshar-Kharghan et al. und Cadroy et al. schlussfolgerten aus ihren Studienergebnissen ein erhöhtes Thrombose- und Myokardinfarktrisiko für die (-5)C-Genvariation des Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus [1, 16]. Jilma-Stohlawetz et al. hingegen stellten in ihrer Arbeit für die homozygote (-5)T-Variante (TT) ein erhöhtes Thrombose- und Myokardinfarktrisiko fest [46].

Im Vergleich der Studien untereinander zeigten sich bezüglich der Größe der Studienpopulationen deutliche Unterschiede. In der vorliegenden Arbeit wurden 3015 männliche Probanden untersucht, davon 2492 koronarangiographierte Patienten und 523 gesunde Probanden als Kontrollgruppe. Die Studienpopulationen der anderen Forschungsgruppen waren z. T. deutlich kleiner (Meisel et al.: 1000 KHK-Patienten, 1000 Kontrollindividuen [72]; Kenny et al.: 924 Patienten [51]; Croft et al.: 539 Patienten, 498 Kontrollprobanden [21]; Douglas et al.: 256 Patienten [24]; Frank et al.: 184 Patienten, 384 Kontrollen [31]; Ozelo et al.: 180 Patienten, 180 Kontrollen [84]; Ishida 156 Patienten, 158 Kontrollen [45]; Corral et al.: 101 Patienten, 139 Kontrollen [20]; Rosenberg et al. 100 Patienten, 119 Kontrollen [91]).

Weitere Unterschiede bestanden in der Definition, bzw. der Art der Diagnosestellung der Koronaren Herzkrankheit. In der vorliegenden Arbeit waren alle Patienten einer Koronarangiographie unterzogen worden. Durch Verwendung des Gensini-Scores konnten genaue Angaben über den Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit gemacht werden (s. Kap. 3.2, S. 15). Nur bei Douglas et al. [24], Ishida et al. [45] und Meisel et al. [72] wurde die KHK ebenfalls durch eine Koronarangiographie diagnostiziert. Bei Corral et al, [20], Croft et al. [21], Frank et al. [31], Ozelo et al. [84], Rosenberg et al. [91] und Kenny et al. [51] erfolgte die Diagnosestellung mit Hilfe klinischer Kriterien, wie z.B. ein abgelaufenes Akutes Koronarsyndrom (Angina pectoris, Myokardinfarkt). Werden jedoch für die Diagnostik bzw. Definition der Koronaren Herzkrankheit nur klinische Parameter herangezogen, so ist die Aussagekraft zur Assoziation des Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus mit dem Risiko der Koronaren Herzkrankheit kritisch zu werten. Ein Patient mit abgelaufenem Myokardinfarkt muss nicht zwingend an einer schweren Koronaren Herzkrankheit leiden.

Auch in einem nicht signifikant stenosiertem Koronargefäß (Lumeneinengung < 50%) kann es durch eine Plaqueruptur zu einem akuten thrombotischen Verschluss und Ausbildung eines Akuten Koronarsyndroms kommen. Wird eine Koronare Herzkrankheit nur unter Verwendung klinischer Kriterien diagnostiziert, so wird ein Patient mit einem abgelaufenem Akuten Koronarsyndroms auch dann in die statistische Analyse miteinbezogen, wenn keine signifikanten Koronarstenosen vorliegen und somit definitionsgemäß keine KHK besteht. In einem solchen Fall wird jedoch nicht der Einfluss auf das KHK-Risiko bzw. deren Schweregrad erfasst, sondern eher der potentielle Einfluss des Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus auf akute thrombotische Ereignisse. Die Validität der Aussage über den Einfluss auf das KHK-Risiko bzw. deren Schweregrad wird hierdurch eingeschränkt. In den drei Studien, bei denen die Diagnosestellung der KHK auch mittels Koronarangiographie erfolgte (Douglas et al. [24], Ishida et al. [45] und Meisel et al. [72]), wurde wie in der vorliegenden Arbeit keine Assoziation zwischen dem Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus und der Koronaren Herzerkrankung festgestellt. Interessanterweise fanden Douglas et al. in ihrer Arbeit eine signifikante Assoziation des homozygoten TT-Genotyps des Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus mit dem Auftreten eines Myokardinfarkts. Die genotypisierte Studienpopulation war mit 88 Myokardinfarkt-Patienten (79 Männer, 9 Frauen) jedoch relativ klein [24]. In der vorliegenden Arbeit wurden hingegen 1180 Myokardinfarkt-Patienten untersucht (s. Kap. 3.5, S. 15). Im Gegensatz zu Douglas et al. [24] stellten Meisel et al. eine signifikante Häufung der ₍₋₅₎C-Variante bei Patienten mit abgelaufenem Akuten Koronarsyndrom (Myokardinfarkt, n = 91; Angina pectoris n = 144) fest sowie eine signifikante Assoziation der ₍₋₅₎C-Variante des Gplb α -T₍₋₅₎C-Genpolymorphismus mit dem PTCA-Komplikationsrisiko [72]. Auch bei Meisel et al. war die Anzahl der Myokardinfarktpatienten (n = 91) deutlich geringer als in der vorliegenden Arbeit. Die von Douglas et al. beschriebene signifikante Assoziation des homozygoten TT-Genotyp mit dem Auftreten eines Myokardinfarkts wurde indirekt durch die Untersuchungen von Jilma-Stohlawetz et al. [46] über die Rolle des Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus bei der Thrombusbildung unterstützt. Jilma-Stohlawetz et al. stellten bei Vorliegen des homozygotem TT-Genotyp eine um 20% schnellere Thrombusbildung als für den heterozygoten TC-Genotyp fest [46] Die Thrombusentstehung wurde bei Scherkräften von 5000/s – 6000/s gemessen. Solche pathophysiologisch hohen Scherkräfte finden sich vor allem an atherosklerotisch veränderten Koronargefäßabschnitten. Eine schnellere Thrombusbildung könnte

durchaus die Entstehung eines Myokardinfarkts begünstigen. Cadroy et al. führten ebenfalls Untersuchungen zur Thrombusbildung durch [16]. Die Messungen erfolgten bei Scherkräften von 650/s und 2600/s. Bei hohen Scherkräften (2600/s) zeigte sich im Gegensatz zu Jilma-Stohlawetz et al. [46] keine signifikante Beziehung zwischen dem Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus und der Thrombusentstehung [16]. Bei niedrigen Scherkräften (650/s) stellten sie für heterozygote TC-Genotypen eine signifikant höhere Thrombozytenablagerung pro Zeiteinheit als bei homozygoten TT-Genotypen fest [16]. Die Ergebnisse von Jilma-Stohlawetz et al. [46] und Cadroy et al. [16] zeigten für den homozygoten TT-Genotyp widersprüchliche Ergebnisse, jedoch erfolgten die Messungen der Thrombusbildung bei unterschiedlich starken Scherkräften (Jilma-Stohlawetz et al. [46]: 5000/s – 6000/s; Cadroy et al. [16]: 2600/s). Es ist durchaus möglich, dass der potentielle Einfluss der Genotypvarianten des Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus auf die Thrombusbildung von den lokalen Scherkräften abhängig ist und erst bei hohen Scherkräften von 5000/s – 6000/s, jedoch nicht bei 2600/s darstellbar ist.

Neben der unterschiedlichen Probandenanzahl bestanden auch Unterschiede in der Geschlechtsverteilung und dem ethnischen Hintergrund der Studienpopulationen. Männliches Geschlecht gilt als ein unbeeinflussbarer Risikofaktor der KHK. Männer sind zwei- bis dreimal häufiger betroffen als Frauen. Wird von einer allgemein anerkannten protektiven Wirkung weiblicher Hormone ausgegangen, so ergeben sich, unabhängig von anderen Risikofaktoren, bereits geschlechtsabhängige Unterschiede in der Inzidenz und Progredienz ischämischer Herzerkrankungen. Männer sind zwei- bis dreimal häufiger betroffen als Frauen. In der vorliegenden Untersuchung wurden nur männliche Patienten untersucht, wohingegen von Douglas et al. [24], Meisel et al. [72] und Ishida et al. [45] männliche und weibliche Probanden untersucht wurden. Bezüglich des ethnischen Hintergrundes setzte sich die Studienpopulation bei Douglas et al. aus Kaukasiern und indischen Asiaten zusammen [24]. Bei Meisel et al. [72] bestand die Studienpopulation aus Kaukasiern, bei Ishida et al. aus Probanden asiatischer Abstammung [45]. Auch wenn der statistische Vergleich der Allelfrequenzen der ₍₋₅₎C- und ₍₋₅₎T-Variante des Gplb α -T₍₋₅₎C-Genpolymorphismus keine signifikanten Unterschiede aufwies (s. Kap. 5.3.1 S. 67), ist es durchaus denkbar, dass die Funktion des Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus und seine Rolle bei der Thrombusbildung durch bis dato noch unbekannt ethnischen Faktoren beeinflusst wird.

Die Vergleichbarkeit der Arbeiten von Corral et al. [20], Croft et al. [21], Frank et al. [31], Ozelo et al. [84] und Rosenberg et al. [91] wurde ebenfalls durch deutliche Unterschiede in der Probandenanzahl, der Diagnose der KHK sowie der Geschlechtsverteilung eingeschränkt. Corral et al. [20], Croft et al. [21] und Ozelo et al. [84] zogen männliche und weibliche Probanden in ihre Untersuchung mit ein, Rosenberg et al. untersuchten nur männliche Patienten [91], Frank et al. hingegen nur weibliche Patienten [31]. Bei Corral et al. [20] und Croft et al. [21] bestand die Studienpopulation aus Kaukasiern, Ozelo et al. [84] untersuchte eine hochgradig heterogene brasilianische Population mit europäischen, afrikanischen und süd-amerikanisch-indianischen Ursprung. Rosenberg et al. [91] genotypisierten Probanden mit asiatisch-afrikanischer, europäisch-amerikanischer und israelischer Abstammung. Croft et al. untersuchten 539 Myokardinfarkt-Patienten und fanden keine Assoziation mit dem Gpl β -T₍₋₅₎C-Genpolymorphismus. Eine zusätzliche Analyse einer Subpopulation von Patienten < 55 Jahre zeigte ebenfalls keine Assoziation mit dem Myokardinfarkt-Risiko [21]. Diese Ergebnisse fanden sich auch in der vorliegenden Arbeit (s. Kap. 4.6, S. 60). Die Ergebnisse von Rosenberg et al. waren von besonderem Interesse, da alle untersuchten Patienten jünger als 53 Jahre waren. Rosenberg et al. fanden keine signifikante Häufung der ₍₋₅₎C-Genvariante in der Myokardinfarktgruppe [91]. Frank et al. fanden keine Assoziation des Gpl β -T₍₋₅₎C-Polymorphismus mit dem Auftreten eines Myokardinfarkts [31]. Die von Frank et al. untersuchte Studienpopulation aus 184 Frauen mit abgelaufenem Myokardinfarkt bzw. ischämischen apoplektischen Insult war zur Analyse eines möglichen prothrombotischen Risikos besonders geeignet, da Myokardinfarkt und apoplektischer Insult ungewöhnliche und seltene Ereignisse bei jungen Frauen darstellen. Corral et al. fanden keine Assoziation zwischen dem Gpl β -T₍₋₅₎C-Polymorphismus und dem KHK-Risiko [20]. Zusätzlich untersuchten Corral et al. den Einfluss der Genotyp-Varianten des Gpl β -T₍₋₅₎C-Polymorphismus auf die Rezeptordichte von Gpl β [20]. Sie stellten im Gegensatz zu Afshar-Kharghan et al. keine Assoziation zwischen dem Gpl β -T₍₋₅₎C-Polymorphismus und der Rezeptordichte von Gpl β fest [20]. Die Erklärung dieser diskrepanten Ergebnisse ist wiederum in der stark unterschiedlichen Anzahl an Probanden zu suchen. Afshar-Kharghan et al. untersuchten nur 9 ausgewählte Einzelspender [1], wohingegen Corral et al. Proben von 139 Probanden analysierten [20]. Zusätzlich ist kritisch anzumerken, dass Afshar-Kharghan et al. die Untersuchungen mit statischen Gewebekulturen durchführten. Unter physiologischen

bzw. pathophysiologischen Bedingungen, wie man sie in einer atherosklerotisch veränderten Koronararterie findet, laufen wahrscheinlich andere Regulationsmechanismen ab und beeinflussen die Oberflächenexpression der thrombozytären Glykoproteine auf andere Art und Weise als unter diesen Laborbedingungen.

Die methodischen Möglichkeiten zur Untersuchung der physiologischen sowie pathophysiologischen Abläufe in einer Koronararterie sind noch sehr begrenzt. Die komplexen Mechanismen auf zellulärer und molekularer Ebene sind nur eingeschränkt erfassbar und in ihrer Gesamtheit und ihrem Zusammenspiel noch nicht verstanden. Die Entdeckung, dass Polymorphismen der Gene thrombozytärer Glykoproteine die Thrombusentstehung beeinflussen, ist noch relativ neu und die Kenntnisse darüber sind noch sehr gering. Aufgrund der komplexen multifaktoriellen Genese der Atherosklerose, bzw. der Koronaren Herzkrankheit ist davon auszugehen, dass ein einzelner Genpolymorphismus, wie der Gplb α -T₍₋₅₎C-Genpolymorphismus, nur eine eingeschränkte Bedeutung in dieser Genese besitzt.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die klinische Relevanz des Gplb α -T₍₋₅₎C-Genpolymorphismus für die Koronare Herzkrankheit und den Myokardinfarkt zu erfassen. Wie in den vorhergehenden Absätzen dargestellt wurde lassen sich die aufgeführten kontroversen Studienergebnisse durch das unterschiedliche Studiendesign (Größe der Studienpopulation, ethnische und geschlechtliche Zusammensetzung) der verschiedenen Studien erklären. Zusätzlich ist kritisch anzumerken, dass alle Studien, auch die vorliegende Arbeit, retrospektiv angelegt waren. Dies ist insbesondere für die Untersuchung des Einflusses des Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus auf das Myokardinfarktrisiko als problematisch anzusehen, da bei einem retrospektiven Vorgehen nur die Patienten in die Analyse miteinbezogen werden können, die den Myokardinfarkt überlebt haben. Es ist jedoch theoretisch vorstellbar, dass die Träger eines ungünstigen Genotyps des Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus gerade aus diesem Grund einen Herzinfarkt nicht überleben und folglich auch nicht in eine retrospektive Untersuchung miteinbezogen werden, was zu einer Verfälschung des Ergebnisses führen kann („Überlebens-Bias“).

Bezüglich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist hervorzuheben, dass neben dem „negativen“ Ergebnis der fehlenden Assoziation zwischen dem Gplb α -T₍₋₅₎C-Genpolymorphismus und dem KHK-Risiko sowie dem KHK-Schweregrad mit der festgestellten altersabhängigen Assoziation zwischen dem CC-Genotyp des Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus und dem Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit auch ein

„positiver“ Befund erhoben wurde. Die Ergebnisse anderer Studien werden hierdurch maßgeblich erweitert. Aufgrund der Größe und Homogenität der untersuchten Studienpopulation sowie der Diagnosestellung der Koronaren Herzkrankheit mittels Koronarangiographie und Verwendung des Gensini-Scores zur genauen Schweregradeinteilung, sind die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse zum potentiellen Einflusses des Gplb α -T₍₋₅₎C-Genpolymorphismus auf das Risiko und den Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit als valide und reliabel anzusehen.

5.4.2 Ausblick auf zukünftige Studien

Der thrombozytäre Glykoproteinrezeptor-Komplex Gplb-IX-V ist der entscheidende Faktor in der kontrollierten und schnellen, scherkraftabhängigen Thrombozytenadhäsion und –aggregation der physiologischen Hämostase bzw. der pathophysiologischen Thrombusbildung. Aus medizinisch-pharmakologischer Sicht stellen der Gplb-IX-V-Komplex bzw. seine Untereinheiten (Gplb α , Gplb β , GpV, GpIX) wichtige mögliche Angriffspunkte für therapeutische Interventionen dar, um möglichst früh die Kaskade der pathophysiologischen Thrombusbildung zu durchbrechen oder zumindest einzudämmen. Insbesondere in der Therapie des Akuten Koronarsyndroms könnte ein spezifischer Rezeptorantagonist, ähnlich den GplIb-IIIa-Rezeptorantagonisten, von großem Nutzen sein. Ein besonderer Vorteil eines Gplb-IX-V Rezeptorantagonisten wäre, dass die Kaskade der Hämostase bereits auf der Ebene der initialen Thrombozytenadhäsion durchbrochen werden könnte. Im Rahmen der Untersuchungen über die Funktion und Struktur der thrombozytären Glykoproteinrezeptoren wurden in den entsprechend kodierenden Genen Polymorphismen entdeckt [1, 77, 83, 92, 93]. Für einige dieser Genpolymorphismen zeigten sich Assoziationen mit dem Risiko für atherosklerotische Erkrankungen [83, 80, 92, 93, 98]. Die Ergebnisse bisheriger Studien über den potentiellen Einfluss des Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus auf das Risiko der Koronaren Herzerkrankung sind sehr kontrovers (s. Kap. 5.3, S. 67 und Kap. 5.4., S. 73). Gründe hierfür wurden benannt (s. Kap. 5.4.1, S. 73). Um die Bedeutung und die funktionellen Abläufe sowie die physiologischen bzw. pathophysiologischen Konsequenzen des Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus besser zu verstehen sind prospektive Studien mit grossen Studienpopulationen erforderlich, welche die epidemiologischen, genetischen und funktionellen Parameter in ihrer Gesamtheit erfassen. Als bestes Beispiel einer

großen, prospektiven Studie ist die bereits 1948 begonnene Framingham-Studie anzuführen [22]. Sie stellt die bedeutendste systematische, prospektive Studie über Ursachen und Risikofaktoren der Koronaren Herzkrankheit und Artherosklerose dar. Die in den letzten Jahren entdeckten Genpolymorphismen mit Anhalt für mögliche Assoziationen mit der Koronaren Herzkrankheit sollten, wie die bereits gesicherten Risikofaktoren, mit Studien entsprechend der Framingham-Studie untersucht werden. Sollten sich der Gpl α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus, bzw. weitere Genpolymorphismen der thrombozytären Glykoproteine als Risikoindikatoren bzw. Risikofaktoren, wie der Zigarettenkonsum oder die arterielle Hypertonie, erweisen, so sollten Vorsorgeuntersuchungen bezüglich der Koronaren Herzkrankheit durch eine Genotypisierung auf den jeweiligen Polymorphismus ergänzt werden.

6 Zusammenfassung

Der potentielle Einfluss des Gplb α -T₍₋₅₎C-Genpolymorphismus auf das Risiko und den Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit

Der thrombozytäre Glykoproteinkomplex Gplb-IX-V ist der wichtigste Rezeptor für den von-Willebrand-Faktor (vWF) und ist entscheidend für die initiale Thrombusentstehung. Für die Untereinheit Gplb α sind verschiedene Genpolymorphismen bekannt. Im Jahre 1996 wurde erstmalig ein Polymorphismus (T₍₋₅₎C bzw. Kozak-Sequenz-Polymorphismus) innerhalb der für die Translation verantwortlichen Sequenz des Gplb α -Gens beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wurde der potentielle Einfluss des Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus (Kozak-Sequenz-Polymorphismus) auf das Risiko und den Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit (KHK) untersucht. 2492 koronarangiographierte Patienten und 523 herzgesunde Probanden (Kontrollgruppe) wurden genotypisiert. Die Genotypisierung erfolgte mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und Restriktionsfragmentlängenpolymorphismusanalyse (RFLP) mit der Endonuklease PpuMi. Die Definition des KHK-Schweregrades erfolgte nach Anzahl der betroffenen Koronargefäße (Null-, Eins-, Zwei- oder Dreifäßerkrankung) und durch Verwendung des Gensini-Score. Die Verteilung der Gplb α -T₍₋₅₎C-Genotypen befand sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Es zeigte sich keine Assoziation zwischen dem Gplb α -T₍₋₅₎C-Genpolymorphismus und dem Risiko der Koronaren Herzkrankheit sowie dem Risiko des Myokardinfarkts.

Bei Definition des KHK-Schweregrades nach Anzahl der betroffenen Koronargefäße (keine signifikanten Stenosen, Ein-, Zwei-, Dreifäßerkrankung) zeigte sich keine Assoziation des Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus mit dem Schweregrad der koronaren Herzkrankheit innerhalb der Gesamtpopulation und in Niedrigrisiko- und Hochrisikogruppen (Herzgesunde vs. KHK-Patienten).

Bei Einteilung des Schweregrades der Koronaren Herzkrankheit nach Gensini (Berücksichtigung der unterschiedlichen funktionellen Relevanz von Koronarstenosen) fand sich bei Patienten mit homozygotem CC-Genotyp und einem Alter unter 56 Jahren (25. Perzentile) ein höherer KHK-Schweregrad als bei Patienten mit heterozygotem TC-, bzw. homozygotem TT-Genotyp und somit eine signifikante Assoziation zwischen dem homozygotem CC-Genotyp des Gplb α -T₍₋₅₎C

Polymorphismus und dem KHK-Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit (Herzgesunde vs. KHK-Patienten).

Schlussfolgerung:

Bei jüngeren KHK-Patienten unter 56 Jahren besitzt der Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus Einfluss auf den Schweregrad der KHK (Definition gemäß Gensini). Insbesondere für die jüngeren Patienten, welche in Bezugnahme auf die etablierten KHK-Risikofaktoren, den Niedrigrisikogruppen zugeordnet werden können (ohne Diabetes mellitus; ohne Diabetes mellitus und arteriellem Hypertonus; ohne Diabetes mellitus, arteriellem Hypertonus und Zigarettenkonsum) stellt der CC-Genotyp des Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus ein Risikoindikator für die Ausbildung eines höheren KHK-Schweregrades dar. Assoziationen zwischen der Gplb α -T₍₋₅₎C-Genvariation einerseits und dem KHK-Risiko, dem KHK-Schweregrad nach klinischer Definition und dem Myokardinfarkttrisiko andererseits konnten jedoch weder in der Gesamtpopulation noch in Niedrig- oder Hochrisikogruppen identifiziert werden. Es kann daher gefolgert werden, dass sich die Bedeutung des Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphismus für die ischämische Herzerkrankung auf die beschriebenen Subpopulationen beschränkt. In prospektiven Studien sollten diese Befunde überprüft werden.

7 Summary

The Impact of the Gplb α -T₍₋₅₎C-Polymorphism on the Risk and Extent of Coronary Heart Disease

The platelet membrane glycoprotein Ib-IX-V (Gplb-IX-V) complex is a major receptor for von-Willebrand-factor (vWF), which plays a key role in the initial development of thrombi. Several polymorphic variants of the Gplb α subunit are known. In 1996, a single nucleotide dimorphism in the translation site of the Gplb α gene was described (T₍₋₅₎C-polymorphism or Kozak-sequence-polymorphism).

In this study the impact of the Gplb α -T₍₋₅₎C-polymorphism as a risk indicator of coronary heart disease (CHD) was analyzed by genotyping 2492 participants who underwent coronary angiography and 523 healthy individuals. Genotyping was performed by PCR-RFLP using PpuMi endonuclease. Gplb α -T₍₋₅₎C genotypes of the study sample were in Hardy-Weinberg equilibrium.

No associations were observed between the Gplb α -T₍₋₅₎C-polymorphism and the risk of coronary heart disease and myocardial infarction. This observation applied also to the extent of coronary heart disease, when it was defined by the number of diseased vessels. However, when the degree of coronary artery disease was defined by the Gensini-Score, CC homocygotes had clearly higher scores ($p = 0.02$), when the study sample was restricted to participants younger than 56 years (25th percentile). CC homocygotes younger than 62 years (50th percentile) tended to have higher scores ($p = 0.06$) whereas not any differences were detected in the total sample.

Conclusion:

In young patients under 56 years with coronary heart disease the Gplb α -T₍₋₅₎C-polymorphism had influence on the severity of coronary heart disease. Especially for young patients who are in a low-risk-groups (based on the established risk factors for coronary heart disease: without diabetes, without diabetes + arterial hypertension, without diabetes + arterial hypertension + smoking habits) the CC-genotype of the Gplb α -T₍₋₅₎C-polymorphism is a risk indicator for the development of a higher extent of coronary heart disease. However, associations between the Gplb α -gene variation and the risk for coronary heart disease and extent of coronary heart disease (defined clinically) and also risk of myocardial infarction could be identified neither in low-

risk- nor in the high-risk-groups. It can therefore be concluded that the impact of the Gpl α -T₍₋₅₎C-polymorphism on ischemic heart disease is restricted to the subpopulations mentioned above. These conclusions should be checked in prospective studies.

Literaturverzeichnis

1. Afshar-Kharghan V, Li CQ, Khoshnevis-Asl M, Lopez JA. Kozak sequence polymorphism of the Glycoprotein (GP) Iba gene is a major determinant of the plasma membrane levels of the platelet GPIb-IX-V complex. *Blood* 1999; 94: 186-191.
2. Anderson KM, et al. An updated coronary risk profile: a statement for health professionals. *Circulation* 1991; 83: 356-362.
3. Andrews RK, Fox JE. Identification of a region in the cytoplasmic domain of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX complex that binds to purified actin-binding protein. *J Biol Chem* 1992; 267: 18605-18611.
4. Andrews RK, Lopez JA, Berndt MC. Molecular mechanism of platelet adhesion and activation. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29: 91-105.
5. Andrews RK, et al. Platelet adhesion receptors and (patho)physiological thrombus formation. *Histol Histopathol* 2001; 16: 969-980.
6. Baenkler HW. *Innere Medizin, MLP Duale Reihe*. 1. Auflage, Hippokrates Verlag im Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1999; 119-163.
7. Baim DS, Grossmann. *Cardiac Catheterization*. Lippincott/Williams & Wilkins 1996; 57-82.
8. Baker RI, Eikelboom J, Lofthouse E, Staples N, Afshar-Kharghan V, Lopez JA, Shen Y, Berndt MC, Haney G. Platelet glycoprotein Iba Kozak polymorphism is associated with increased risk of ischaemic stroke. *Blood* 2001; 98: 36-40.
9. Berndt MC, Gregory C, Kabral A, Zola H, Fournier D, Castaldi PA. Purification and preliminary characterization of the human platelet membrane glycoprotein Ib complex. *Eur J Biochem* 1985; 151: 637-649.
10. Berndt MC, Ward CM, De Luca M, Facey DA, Castaldi PA, Harris SJ, Andrew RK. The molecular mechanism of platelet adhesion. *Aust NZ J Med* 1995; 25: 822-830.
11. Brass LM. The impact of cerebrovascular disease. *Diabetes Obes Meta* 2000; 2: 6-10.
12. Bray PF. Platelet glycoprotein polymorphisms as risk factors for thrombosis. *Curr Opin Hematol* 2000; 7: 284-289.
13. Breslow JL. Genetic markers for coronary heart disease. *Clin Cardiol* 2001; 24: 14-17.

14. Bruckenberger E. Herzbericht. 2001 mit Transplantationschirurgie. 14. Bericht der Arbeitsgruppe Krankenhauswesen der Arbeitsgemeinschaft der obersten Landesgesundheitsbehörden der Länder (AOLG) 2001.
15. Buddecke E. Grundriss der Biochemie. 9. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin, New York 1994.
16. Cadroy Y, Sakariassen KS, Charlet JP, Thalamas C et al. Role of 4 platelet membrane glycoprotein polymorphisms on experimental arterial thrombus formation in men. *Blood* 2001; 98: 3159-3161.
17. Charo IF, Kieffer N, Phillips DR. Platelet membrane glycoproteins. *Hemostasis and Thrombosis: Basic principles and clinical Practice*, 3rd edition 1994; edited by Colman RW et al. Lippincott Company, Philadelphia.
18. Clauss A. Rapid physiological coagulation method in determination of fibrinogen. *Acta Haematol* 1957; 17: 237-246.
19. Clementson KJ. Platelet glycoproteins and their role in diseases. *Transfus Clin Biol* 2001; 8: 155-162.
20. Corral J, Lozano ML, Gonzalez-Conejero R, Martinez C, Iniesta JA, Rivera J, Vincente V. A common polymorphism flanking the initiator codon of GPIb alpha does not affect expression and is not a major risk factor for arterial thrombosis. *Thromb Haemost* 2000; 83(1): 23-28.
21. Croft SA, Hampton KK, Daly ME, Steeds RP, Channer KS, Samani NJ. Kozak sequence polymorphism in platelet GPIbalph gene is not associated with risk of myocardial infarction. *Blood* 2000; 95: 2183-2184.
22. Dawber TR, Meadors GF, Moore FEJ. Epidemiological approaches to heart disease: the Framingham Study. *Am J Public Health* 1951; 41: 279-286.
23. Dong JF, Li CQ, Lopez JA. Tyrosine sulfatation of the glycoprotein IB-IX-complex: identification of sulfated residues and effect on ligand binding. *Biochemistry* 1994; 33: 13946-13953.
24. Douglas H, Michaelidis K, Gorog DA, Durante-Mangoni E, Ahmed N et al. Platelet glycoprotein Ibalph gene -5T/C Kozak sequence polymorphism as an independent risk factor, for the occurrence of coronary thrombosis. *Heart* 2002; 87: 70-74.
25. Du X, Fox JE, Pei S. Identification of a binding site for the 14-3-3 protein within the cytoplasmatic domain of the adhesion receptor, platelet glycoprotein Iba. *J Biol Chem* 1996; 271: 7362-7367.
26. Du X, Ginsberg MH. Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ and platelet function. *Thrombos Haemost* 1997; 78: 96-100.

27. Ennker J. Checkliste XXL Herzchirurgie. Thieme Verlag Stuttgart 2002; 124-137.
28. Fink PC, Romer M, Haeckel R, Fateh-Moghadam A, Delanghe J, Gressner AM, Dubs RW. Measurement of proteins with the Behring nephelometer. A multicenter evaluation. *J Clin Chem Clin Biochem* 1989; 27: 261.
29. Fox JE, Aggerbeck LP, Berndt MC. Structure of the glycoprotein Ib-IX complex from platelet membranes. *J Biol Chem* 1988; 263: 4882-4890.
30. Fox JE, Berndt MC. Cyclic AMP-dependent phosphorylation of GPIb inhibits collagen induced polymerization of actin in platelets. *J Biol Chem* 1989; 264: 9520.
31. Frank MB, Reiner AP, Schwartz SM, Kumar PN, Pearce RM, Arbogast PG, Longstreth WT, Rosendaal FR, Psaty BM, Siscovick DS. The Kozak sequence polymorphism of platelet glycoprotein Iba α and risk of nonfatal myocardial infarction and nonfatal stroke in young women. *Blood* 2001; 97: 875-879.
32. Gardemann A, Schwartz O, Haberbosch W et al. A Positive association of the β fibrinogen H1/H2 gene variation to basal fibrinogen levels and to the Increase in fibrinogen concentration during acute phase reaction but not to coronary artery disease and myocardial infarction. *Thromb Haemost* 1997; 77: 1120-1126.
33. Gawaz M. Das Blutplättchen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, NewYork 1999.
34. Gärtner K. Medizinische Laboruntersuchungen. 11. Auflage, Selbstverlag 1995.
35. Gensini GG. A more meaningful scoring system for determine the severity of coronary heart disease. *AM J Cardiol* 1983; 51: 606.
36. Gensini GG. Coronary arteriography. In Braunwald E (ed) *Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine*. 5th ed. Saunders, Philadelphia 1997; 352-353.
37. Gersh BJ, Braunwald E, Rutherford JD. Chronic Artery Disease. In Braunwald E (ed) *Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine*. 5th ed. Saunders, Philadelphia 1997; 1289-1365.
38. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med* 1977; 62: 707-714.
39. Haff LA (1994) Improved quantitative PCR using nested primers. Applied Biosystems Division, Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, Connecticut. *PCR Methods Appl* 1994; 3(6):332-337.

40. Herold G. Innere Medizin. Selbstverlag 2004; 117-252.
41. Hickey MJ, Hagen FS, Yagi M, Roth GJ. Human platelet glycoprotein V: characterization of the polypeptide and the related Ib-V-IX receptor system of adhesive, leucine-rich glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 8327-8331.
42. Hoefler G, Harnoncourt F, Paschke E, Mirtl W, Pfeiffer KH, Kostner GM (1988) Lipoprotein Lp(a). A risk factor for myocardial infarction. *Arteriosclerosis* 1988; 8: 398-401.
43. Houlston R, Friedl W. Biochemistry and clinical significance of lipoprotein (a). *Ann Clin Biochem* 1988; 25: 499-503.
44. Huang T, Sahud MA, Association of C807T, P1(a) und -5C/T Kozak genotype with density of glycoprotein receptors on platelet surface. *Thromb Res* 2003; 112: 147-150.
45. Ishida F, Ito T, Takei M, Shimodaira S, Kitano K, Kiyosawa K. Genetic linkage of Kozak sequence polymorphism of the glycoprotein Ib alpha with human platelet antigen-2 and variable number of tandem repeats polymorphism, and its relationship with coronary artery disease. *Br J Haematol* 2000; 111: 1247-1249.
46. Jilma-Stohlwetz P, Homoncik M, Jilma B, Knechteldorfer M, Unger P, Mannhalter C, Santoso S, Panzer S. Glycoprotein Ib polymorphisms influence platelet plug formation under high shear rates. *Br J Haematol* 2003; 120: 652-655.
47. Kaski S, Kekomäki R, Partanen J. Systematic screening for genetic polymorphism in human platelet glycoprotein Iba. *Immunogenetics* 1996; 44: 170.
48. Kattermann R, Jaworek D, Moller G, Assmann G, Bjorkhem I, Svensson L, Borner K, Boerma G, Leijinse B, Desager JP (1984) Multicenter study of a new enzymatic method of cholesterol determination. *Clin Chem Clin Biochem* 1984; 22: 245-251.
49. Kawasaki ES. Sample preparation from blood, cells and other fluids. In: *PCR Protocols. A guide to Methods and Applications*. 1990 Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. San Diego, CA, Academic, 146-152.
50. Kenichi F, et al. Influence of platelet collagen receptor polymorphisms on risk for arterial thrombosis. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126: 305-309
51. Kenny D, Muckian C, Fitzgerald DJ, Cannon CP, Shields DC. Platelet glycoprotein Ib alpha receptor polymorphisms and recurrent ischaemic events in acute coronary syndrome patients. *J Thromb Thrombolysis* 2002; 13:13-19.

52. Kirklin JW, Barratt-Boyes BG. Cardiac surgery: morphology, diagnostic criteria, history, technique, results and indications. Vol 1, 2nd ed., Churchill Livingstone, New York, 1993.
53. Kottke BA, Zinsmeister AR, Holmes DR Jr, Kneller RW, Hallaway BJ, Mao SJ. Apolipoproteins and coronary artery disease. *Mayo Clin Proc* 1986; 61: 313-320.
54. Kozak M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 1986; 44: 283.
55. Kozak M. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J Mol Biol* 1987; 169, 947.
56. Kozak M. Analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucl Acids Res* 1987; 15: 8125.
57. Kozak M. The scanning model for translation: an update. *J Cell Biol* 1989; 108: 229.
58. Kozak M. Evaluation of the fidelity of initiation of translation in reticulocyte lysates from commercial sources. *Nucl Acid Res* 1990; 2828.
59. Kroll MH, Hellums JD, McIntire LV, et al. Platelets and shear stress. *Blood* 1996; 88: 1525-1541.
60. Kujpers RWAM, Faber NM, Cuyper HTM, Ouwehand WH, von dem Borne AEGK. NH₂-terminal globular domain of human platelet glycoprotein Iba has a methionine¹⁴⁵/threonine¹⁴⁵ amino acid polymorphism, which is associated with the HPA-2(KO) alloantigens. *J Clin Invest* 1992; 89: 381-384.
61. Kunicki TJ. Platelet membrane glycoproteins and their function: an overview. *Blut* 1989; 59: 30-34.
62. Kuwahara M, Sugimoto M, Miyata S, et al. Cytosolic calcium changes in a process of platelet adhesion and cohesion on a von Willebrand factor coated surface under flow conditions. *Blood* 1999; 94: 1149-1155.
63. Kuwahara M, Sugimoto M, Tsuji S, et al. Platelet shape changes and adhesion under high shear flow. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 329-34.
64. Li CQ, Dong JF, Lanza F, Sanan DA, Sae-Tung G, Lopez JA. Expression of platelet GP V in heterologous cells and evidence for its association with GP Iba in forming a GPIb-IX-V complex on the cell surface. *J Biol Chem* 1995; 270: 16302.
65. Lopez JA, Chung DW, Fujikawa K, Hagen FS, Papayannopoulou T, Roth GJ. Cloning of the α chain of human platelet glycoprotein Ib: a trans-

- membrane protein with homology to leucine-rich α 2-glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci* 1987; 84: 5615-5619.
66. Lopez JA, Chung DW, Fujikawa K, Hagen FS, Davie ew, Roth GJ. The α and β chains of human platelet glycoprotein Ib are both transmembrane proteins containing leucine-rich amino acid sequence. *Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 2135.
 67. Lopez JA, Ludwig EH, McCarthy BJ. Polymorphism of Human glycoprotein Iba results from a variable number of tandem repeats of a 13-amino acid sequence in the mucin-like macroglycopeptides region. Structure/function implications. *J Biol Chem* 1992; 267: 10055-10061.
 68. Lopez JA. The platelet glycoprotein Ib-IX complex. *Blood Coag Fibrinol* 1994; 5: 97-119.
 69. Lopez JA, Andrews RK, Afshar-Kharghan V, Berndt MC. Bernard-Soulier Syndrome. *Blood* 1998; 91: 4397-4418.
 70. Loscalo J, Weinfeld M, Fless GM, Scanu AM. Lipoprotein(a), fibrin binding, and plasminogen activation. *Arteriosclerosis* 1990; 10: 240-245.
 71. Marchese P, Saldivar E, Ware J, Ruggeri ZM. Adhesive properties of the isolated amino-terminal domain of GPIba in a flow field. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 7837-7842.
 72. Meisel C, Afshar-Kharghan V, Cascorbi I, Laule M, Stangel V, Felix SB, Baumann G, Lopez JA, Roots I, Satngl K. Role of Kozak sequence polymorphism of platelet glycoprotein Iba as a risk factor for coronary artery disease and catheter interventions. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38: 1023-1027.
 73. Miyata S, Goto S, Federici AB, Ware J, Ruggeri ZM. Conformational changes in the A1 domain of von Willebrand factor modulating the interaction with platelet glycoprotein Iba. *J Biol Chem* 1996; 271: 9046-9053.
 74. Modderman PW, Admiraal LG, Sonnenberg A, von dem Borne AEG. Glycoproteins V and Ib-IX form a noncovalent complex in the platelet membrane. *J Biol Chem* 1992; 267: 364-369.
 75. Moroi M, Jung SM, Yoshida N. Genetic polymorphism of platelet glycoprotein Ib. *Blood* 1984; 64:622-629.
 76. Mortality from coronary heart disease and acute myocardial infarction: United States 1998. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2001; 50:90-93.
 77. Mullis K, et al. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalyzed chain reaction. *Meth Enzymol* 1987; 55: 335-350.

78. Mullis K. Target amplification for DNA analysis by polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin* 1990; 48: 579-582.
79. Newton C, Graham A. PCR: Essential Data, Spektrum 1997; 19-26.
80. Nurden AT, et al. A review of the role of platelet membran glycoproteins in the platelet-vessel wall interaction. *Bailliere's Clin Haematol* 1993; 6: 653-690.
81. Nurden AT. Human platelet glycoproteins. *Haemostasis and Thrombosis*. 3rd edition, edited by Bloom A et al. Churchill Livingstone, New York 1994.
82. Nurden AT. Inherited abnormalities of platelets. *Thrombosis and Haemostasis* 1999; 82: 468-480.
83. Ortlepp JR, Klues HG, Hanrath P (1999) Polymorphisms - genetic risk factors for coronary heart disease?. *Dtsch Med Wochenschr* 1999; 14: 600-608.
84. Ozelo MC, Origa AF, Aranha FJ, Mansur AP, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FF, Pollak ES, Arruda VR. Platelet glycoprotein Ibalpha polymorphisms modulate the risk for myocardial infarction. *Thromb Haemost* 2001; 92: 384-386.
85. Poche R, Poche de Vos, Hauptmann S. Pathologische Anatomie der Koronarinsuffizienz und des Herzinfarkts. Roskamm H, Reindell R (Hg.) *Herzkrankheiten: Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie*. 4. Aufl. Springer, Berlin Heidelberg New York; 1996: 584-600.
86. Rauch U, et al. Thrombus formation on atherosclerotic plaques: pathogenesis and clinical consequences. *Ann Intern Med* 2001; 134: 224-238.
87. Ridker PM, et al. PIA1/A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risk of myocardial infarction, stroke and venous thrombosis. *Lancet* 1997; 349: 385-388.
88. Riesen WF, Mordasini R, Salzmann C, Theler A, Gurtner HP. Apoproteins and lipids as discriminators of severity of coronary heart disease. *Atherosclerosis* 1980; 37: 157-162.
89. Rifai N, Chapman JF, Silverman LM, Gwynnes JT (1988) Review of serum lipids and apolipoproteins in risk-assesment of coronary heart disease. *Ann Clin Lab Sci* 1988; 18: 429-439.
90. Rose DA. The diagnosis of ischaemic heart pain and intermittent claudication in field surveys. *Bulletin of the World Health Organisation* 1962; 27: 645-648.

91. Rosenberg N, Zivelin A, Chetrit A, Dardik R, Kornbrot N, Freimark D, Inbal A. Effects of platelet membrane glycoprotein polymorphisms on the risk of myocardial infarction in young males. *Isr Med Assoc* 2002; 4: 411-414.
92. Ross R. The Pathogenesis of Atherosclerosis. In Braunwald E (ed) *Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine*. 5th ed. Saunders, Philadelphia 1997; 1105-1125.
93. Roth GJ. Platelets and blood vessels: the adhesion event. *Immunol Today* 1992; 13: 100-105.
94. Roth GJ. Human platelet glycoprotein Ib and the GPIb-V-IX system: the receptor for platelet adhesion in arteries. *Molecular Basis for Thrombosis and Haemostasis* (Edited by High KA and Roberts HR), pp. 561-578. Marcel Dekker, New York, NY.
95. Ruggeri ZM. Structure and function of von Willebrand factor. *Thromb Haemost* 1999; 82: 576-584.
96. Ruggeri ZM. Old concepts and new developments in the study of platelet aggregation. *J Clin Invest* 2000; 105: 699-701.
97. Santoso S. Clinical impact of platelet glycoprotein polymorphism. *Vox Sang* 2000; 78: 121-124.
98. Santoso S. Platelet polymorphisms in thrombotic disorders. *Transfus Clin Biol* 2001; 8: 261-266.
99. Santoso S, Zimmermann P, Sachs UJ, Gardemann A. The impact of the Kozak sequence polymorphism of the glycoprotein Ib alpha gene on the risk and extent of coronary heart disease. *Thromb Haemost* 2002; 87: 345-346.
100. Sandkamp M, Funke H, Schulte H, Kohler E, Assmann G. Lipoprotein(a) is an independent risk factor for myocardial infarction at young age. *Clin Chem* 1990; 36: 20-23.
101. Savage B, Salvidar E, Ruggeri ZM: Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* 1996; 84: 289-297.
102. Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell* 1998; 94: 657-666.
103. Scheuner MT. Genetic predisposition to coronary artery disease. *Curr Opin Cardiol*. 2001; 16: 251-260.
104. Shen Y, RornoGM, Dong JF, Schade A, McIntire LV, Kenny D, Whistock JC, Berndt MC, Lopez JA, Andrews RK. Requirement of leucine rich repeats of glycoprotein Ibalpha for shear-dependent and static binding of von

- Willebrand factor to platelet membrane GP Ib-IX-V complex. *Blood* 2000; 95: 903-910.
105. Sonoda A, Murata M, Ito D, Tanahashi N, Ohta A, Tada Y, Takeshita E, Yoshida T, Saito J, Yamamoto M, Ikeda Y, Fukuuchi Y, Watanabe K. Association between platelet glycoprotein Iba genotype and ischemic cerebrovascular disease. *Stroke* 2000; 31: 493-497.
 106. Titani K, Kumar S, Takio K, Ericsson IH, Wade RD, Ashida K, Walsch KA, Chopek MW, Sadler JE, Fujikawa K. Amino acid sequence of human von Willebrand factor. *Biochemistry* 1986; 25: 3171-3184.
 107. Utermann G. The mysteries of lipoprotein (a). *Science* 1989; 246: 904-910.
 108. Walter DH, et al. Genetic risk factors for myocardial infarction. *Herz* 2000; 25: 7-14.
 109. Weisswange A. Epidemiologie und Prävention der koronaren Herzkrankheit. In Roskamm H, Reindell R (Hg.) *Herzkrankheiten: Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie*. 4. Aufl. Springer, Berlin Heidelberg New York 1996; 601 – 623.
 110. Wenger RH, Kieffer N, Wicki AN, Clementson KJ. Structure of the human blood platelet membrane glycoprotein Iba gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 156: 389-95.
 111. Wiklund O, Angelin B, Olofsson SO, Eriksson M, Fager G, Berglund L, Bondjers G. Apolipoprotein(a) and ischaemic heart disease in familial hypercholesterinaemia. *Lancet* 1990; 335: 1360-1363.
 112. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* 1998; 97: 1837-1847.

Lebenslauf

Peter Zimmermann

geboren am 12.08.1972 in Hachenburg, Rheinland-Pfalz

Schulbildung

1979-1983

Grundschule in Westerburg, Rheinland-Pfalz

1983-1992

Gymnasium mit Abitur in Westerburg, Rheinland-Pfalz

Zivildienst

07/1992 – 10/1993

Deutsches Rotes Kreuz, Westerburg, Rheinland-Pfalz
Rettungsdienst / Ausbildung zum Rettungssanitäter

Hochschulbildung

04/1994

an der Justus-Liebig-Universität Gießen

08/1996

Beginn des Studiums der Humanmedizin

03/1998

Vorklinische Ärztliche Prüfung

06/1998

I. Staatsexamen

03/2000

USMLE Step I

08/2000

II. Staatsexamen

05/2001

USMLE Step II

III. Staatsexamen

Publikation

Santoso S, Zimmermann P, Sachs UJ, Gardemann A. The impact of the Kozak sequence polymorphism of the glycoprotein Ib alpha gene on the risk and extent of coronary heart disease. Thromb Haemost 2002; 87: 345-346.

Berufliche Nebentätigkeit

1995-1997

Pflegekraft auf der Intensivstation der Herz-, Kinderherz und Gefäßchirurgie, Uniklinikum der Justus-Liebig-Universität Gießen

Famulaturen

02/1997-03/1997

Herz- und Gefäßchirurgie, Prof. Dr. F. Hehrlein
Uniklinikum Gießen

07/1997-08/1997

Kinderkardiologie, Prof. Dr. D. Schranz
Uniklinikum Gießen

08/1997-09/1997

Allgemeine Pädiatrie, Dr. H. Kühle
Praxis für Pädiatrie, Gießen

08/1998-11/1998

General Surgery, Prof. Howard L. Beaton M.D.
Plastic Surgery, Prof. Joseph McCarthy M.D.
Cardiothoracic Surgery, Prof. Frank C. Spencer M.D.
NYU Medical Center, New York, USA

09/1999-10/1999

Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie, Prof. Dr. A. Haverich
MHH Hannover

Praktisches Jahr

05/2000-05/2001

I. Tertial

Allgemein- / Unfallchirurgie, Prof. Dr. T. Frick
Spital Zollikerberg, Lehrkrankenhaus des
Universitätsspitals Zürich, Schweiz

II. Tertial

Innere Medizin, Prof. Dr. W. Seeger
Uniklinikum der Justus-Liebig-Universität Gießen

III. Tertial

Herz- , Kinderherz und Gefäßchirurgie, Prof. Dr. P. Vogt
Uniklinikum der Justus-Liebig-Universität Gießen

Ärztliche Tätigkeit

01/06/2001-31/03/2003

AIP/Assistenzarzt

Herz-, Kinderherz und Gefäßchirurgie, Prof. Dr. P. Vogt
Uniklinikum der Justus-Liebig-Universität Gießen

Seit 01/04/2003

Assistenzarzt

Allgemein-, Gefäß und Viszeralchirurgie

PD Dr. U. A. Heuschen

Traumatologie und Unfallchirurgie

PD Dr. J. Hillmeier

St. Vincenz KH Limburg

Akademisches Lehrkrankenhaus der Justus-Liebig-
Universität Gießen

Limburg Februar 2007

Danksagung

Danken möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Andreas Gardemann. Er hat diese Arbeit in allen Phasen mit stetiger Hilfsbereitschaft, Geduld und Zeit für meine Fragen begleitet.

Dr. rer. nat. Sentot Santoso danke ich für die kompetente Beratung bei allen Fragen zu thrombozytären Glykoproteinen und Unterstützung bei der Etablierung der molekularbiologischen Methoden.

Ebenso danke ich Prof. Dr. med. Gregor Bein für die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeit in den Laboren seines Instituts sowie dem gesamten Laborteam des Instituts für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin für ein gutes Arbeitsklima und kollegiale Hilfsbereitschaft.

Ich danke meinen lieben Eltern, weil sie mir meine Ausbildung ermöglicht haben und mich immer unterstützt haben wenn ich ihre Hilfe nötig hatte.

Mein besonderer Dank gilt meiner Frau Jutta. Ohne ihre Geduld, Rücksichtnahme und Hilfsbereitschaft hätte ich niemals die Zeit gefunden diese Dissertation fertig zu stellen.

Peter Zimmermann
Limburg, Februar 2007

„ Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die 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.“

Peter Zimmermann
Limburg, Februar 2007