

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik  
(Department) Tübingen  
Abteilung Innere Medizin III  
(Schwerpunkte: Kardiologie und Kreislauferkrankungen)  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Gawaz**

**Bedeutung kardiovaskulärer Risikofaktoren für die  
Expression von Glycoprotein VI auf Thrombozyten**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Felix Wilhelm Arnaud Waibel  
aus  
Freiburg im Breisgau  
2009**

Dekan: Professor Dr. I. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. E. May

2. Berichterstatter: Professor Dr. T. Nordt



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1	Funktion und Morphologie der Thrombozyten	7
1.2	Glykoproteine der Thrombozytenmembran	10
1.3	Thrombozytäres GPVI	13
1.3.1	GPVI – Struktur und Signaltransduktion	13
1.3.2	GPVI – Funktion	14
1.4	Thrombozytäres Membranglykoprotein GP-Ib-V-IX	16
1.5	Thrombozytäres Membranglykoprotein P-Selektin	16
1.6	Beschreibung und Definition der stabilen Angina pectoris	16
1.7	Beschreibung, Definition und Untergliederung des akuten Koronarsyndroms	17
1.8	Definition kardialer Risikofaktoren	18
<b>2</b>	<b>Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit</b>	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>20</b>
3.1	Material und Studienpopulation	20
3.1.1	Studienpopulation und Kontrollgruppe	20
3.1.2	Monoklonale Antikörper für die Durchflusszytometrie	21
3.1.3	Verwendete Materialien	21
3.2	Methoden	22
3.2.1	Probengewinnung	22
3.2.2	Probenaufbereitung	23
3.2.3	Durchflusszytometrie	23
3.3	Statistische Auswertung	28

<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	29
4.1	Charakteristika des Patientenkollektivs	29
4.2	Oberflächenexpression von GPVI bei stabiler Angina pectoris und beim akuten Koronarsyndrom	34
4.3	Oberflächenexpression von GPVI bei gesunden Personen	36
4.4	Korrelation der GPVI-Expression mit Markern der Myokardischämie	36
4.5	Korrelation von GPVI-Expression mit kardiovaskulären Risikofaktoren	37
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	40
5.1	GPVI-Expression bei stabiler Angina pectoris und beim akuten Koronarsyndrom	40
5.2	Oberflächenexpression von GPVI bei kardialen Risikofaktoren	43
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	46
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	47
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	55
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b>	56

## Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin converting enzyme
ACS	Akutes Koronarsyndrom
ADP	Adenosindiphosphat
AT1-Rezeptor	Angiotensin 1-Rezeptor
BNP	Brain Natriuretic Peptide
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CK	Kreatinkinase
Col	Kollagen
CPDA	Citrat Phosphat Dextrose Arginin
ECM	Extrazelluläre Matrix
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
Fb	Fibrinogen
Fn	Fibronektin
GP	Glykoprotein
IAP	Instabile Angina pectoris
ICAM	Intercellular adhesion molecule
kDa	Kilodalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MMP-9	Matrix Metalloproteinase-9
NSTEMI-Infarkt	Myokardinfarkt ohne ST-Hebung (non ST-elevating myocardial infarction)
PAPP-A	Pregnancy-associated Plasma Protein-A
PECAM	Platelet-endothelial cell adhesion molecule
PGF	Placental Growth Factor
SAP	Stabile Angina pectoris
STEMI-Infarkt	Myokardinfarkt mit ST-Hebung (ST-elevating myocardial infarction)
Tn <sup>+</sup> ACS	Troponin-positives Akutes Koronarsyndrom
Tn-I	Troponin-I
Tsn	Thrombospondin
TxA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>
Vn	Vitronektin
vWF	von-Willebrand-Faktor

# 1 Einleitung

## 1.1 Funktion und Morphologie der Thrombozyten

Der Thrombozyt hat die Aufgabe, in Zusammenarbeit mit löslichen Plasmabestandteilen einen Thrombus zu bilden, der Verletzungen der Gefäßwand verschließen und Blutungen aus diesen Verletzungen stoppen soll. Dieser Vorgang erfolgt in drei Schritten: primäre Hämostase, sekundäre Hämostase und Fibrinolyse (28). Hierfür sind Adhäsion an der verletzten Gefäßwand, Aktivierung des Thrombozyten und schließlich Aggregation mit weiteren aktivierten Thrombozyten erforderlich.

Die Adhäsion als erster Schritt der primären Hämostase kennt zwei Formen: „Primäre Adhäsion“, bei der noch ruhende Thrombozyten an der verletzten Gefäßwand adhären und „sekundäre Adhäsion“, bei der bereits aktivierte Thrombozyten an Strukturen des Subendothels adhären (3). Glykoproteine der thrombozytären Membran regulieren diesen Adhäsionsvorgang.

Da die Adhäsion sowohl unter enormen arteriellen Flussgeschwindigkeiten als auch unter großen Scherkräften auftritt, muss bereits der erste Kontakt zwischen Thrombozyten und verletzter Gefäßwand schnell und stabil sein. Dieser erste Kontakt besteht in der Interaktion des thrombozytären Rezeptors für den von-Willebrand-Faktor (Glykoprotein Ib-V-IX) mit kollagen-immobilisiertem von-Willebrand-Faktor (vWF) (57,67).

Diese Interaktion ist jedoch reversibel und unzulänglich, um eine stabile Adhäsion zu erreichen. Es bedarf weiterer Kontakte zwischen Thrombozyten und Bestandteilen der extrazellulären Matrix (ECM) (56,12).

Thrombozytäre Oberflächenrezeptoren, insbesondere Integrine, führen durch Interaktion mit Bestandteilen des Subendothels zu einer Stabilisierung der Thrombozytenadhäsion. Integrine finden sich in geringer Zahl auf der Oberfläche verschiedener Zellen. Im ruhenden Zustand dieser Zellen weisen Integrine eine niedrige Affinität für ihre natürlichen Liganden auf. Durch inside-out Signale anderer Oberflächenrezeptoren können Integrine jedoch in einen Zustand hoher Affinität versetzt werden.

Die zentrale Rolle nimmt hierbei die Bindung des aktivierenden thrombozytären Kollagenrezeptors GPVI an subendothelial freiliegendes Kollagen ein: Sie führt zur Aktivierung der thrombozytären Integrine  $\alpha_2\beta_1$  und  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (56). Die Bindungen von  $\alpha_2\beta_1$  an Kollagen und von  $\alpha_{IIb}\beta_3$  an den vWF sind am wichtigsten für eine beständige Adhäsion (69,56) (Abbildung 1). Durch die Freisetzung löslicher Mediatoren (ADP,  $TxA_2$  und Thrombin, s. unten) wird dieser Prozess verstärkt (Abbildung 1).

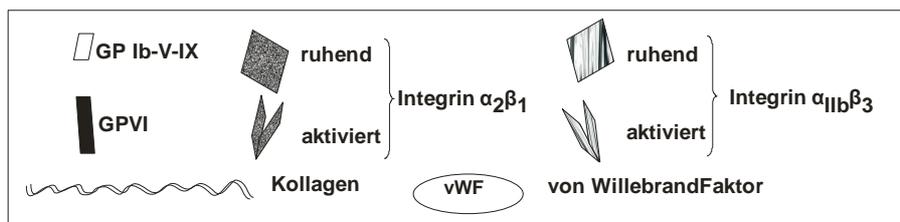
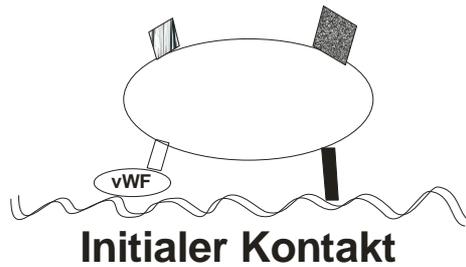
Es kommt neben der Aktivierung der Thrombozyten auch zu einer Änderung ihrer Form. Dabei bilden sich Scheinfüßchen („Pseudopods“), die das Abdichten der Gefäßwandverletzung unterstützen. Die aktivierten und adhärenen Thrombozyten bilden aus Arachidonsäure Thromboxan  $A_2$ , das sowohl den Aktivierungsprozess nach Freisetzung in den Extravasalraum als auch die Bindung an spezifische Thromboxanrezeptoren verstärkt. Des Weiteren ist  $TxA_2$  ein potenter Vasokonstriktor und führt zur Verlangsamung des Blutflusses (71,10). Diese Verlangsamung wiederum begünstigt die Thrombusbildung (28).

Autokrine und parakrine Sekretion granulierter Substanzen während der Adhäsion und der Formänderung verstärken den Adhäsionsprozess, indem aus dem zirkulierenden Blut noch ruhende Thrombozyten stimuliert, rekrutiert und schließlich zur Aggregation mit bereits adhärenen Thrombozyten veranlasst werden. Diese Effekte werden über den hauptsächlich durch Adenosindiphosphat (ADP) aktivierten GP IIb-IIIa Rezeptor vermittelt (28).

Die Aggregation lässt sich in zwei Phasen einteilen: Bei der primären, reversiblen Aggregation sind die Thrombozyten über „lose Fibrinogenbrücken“ miteinander verbunden. Die sekundäre, irreversible Aggregation setzt erst nach einer gewissen Verzögerung ein. Sie wird durch die oben angeführte Sekretion granulärer Substanzen initiiert (28).

Für den normalen Ablauf des Aggregationsvorganges spielen Scherkräfte, die die Wahrscheinlichkeit eines Kontaktes zwischen zwei Thrombozyten erhöhen können, sowie  $Ca^{2+}$  und Fibrinogen eine Rolle (28).

Von entscheidender Bedeutung für die Aggregation ist der Glykoprotein IIb-IIIa-Komplex: Erst wenn der Thrombozyt aktiviert ist, werden Bindungsstellen in der Umgebung des GP IIb-IIIa Komplexes für lösliches Plasmafibrinogen zugänglich.



**Abbildung 1: modifiziert nach Literaturangabe 41: Thrombozytenadhäsion an Kollagen**

Bei initialem Kontakt kommt es zu Interaktionen zwischen Bestandteilen der ECM und Oberflächenrezeptoren des Thrombozyten: An kollagen-immobilisierten vWF bindet der thrombozytäre vWF Rezeptor GP Ib-V-IX, an freiliegendes Kollagen bindet GPVI.

Im zweiten Schritt (Aktivierung) folgt auf die durch GPVI-Kollagen-Interaktionen hervorgerufene zelluläre Aktivierung die Versetzung der Integrine in einen Zustand hoher Affinität und die Freisetzung löslicher Mediatoren (vor allem ADP und  $TxA_2$ ).

Schließlich führt die nun starre Haftung des Thrombozyten an Kollagen (hervorgerufen durch direkt aktiviertes  $\alpha_2\beta_1$ , und durch indirekt [via vWF oder andere Liganden] aktiviertes  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ) zu anhaltendem GPVI Signaling, vermehrter Freisetzung und koagulationsfördernder Aktivität. ADP und  $TxA_2$  dehnen die Integrin-Aktivierung auf bereits adhärenenten Thrombozyten aus und induzieren Thrombuswachstum, indem weitere Thrombozyten aktiviert werden.

Die Bindung von GP IIb-IIIa hängt stark von der Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  ab und führt zur Bildung von Thrombozytenaggregaten.

Dieses primäre Aggregat ist relativ instabil und bedarf weiterer Festigung (sekundäre Hämostase) (18). Aktivierung der Gerinnungskaskade und Bildung von Fibrin sowie Thrombin stellen den Beginn der sekundären Hämostase dar. Für die Aktivierung der Gerinnungskaskade spielt die aktivierte Thrombozytenoberfläche eine entscheidende Rolle (25). Die Quervernetzung von auf der Thrombozytenoberfläche abgelagertem Fibrin führt zur Verfestigung des Thrombus. Dieser Vorgang wird durch die Kontraktion des Thrombozyten-Fibrin-Konglomerats verstärkt.

Dabei können nur aktivierte Thrombozyten einen stabilen Thrombus bilden. Der Aktivierungsvorgang ist komplex und beinhaltet Änderungen metabolischer und biochemischer Mechanismen, Änderung der Thrombozytengestalt, Aktivierung von Oberflächenrezeptoren sowie Veränderungen in der Ausrichtung von Membranphospholipiden (28,61,70). Besonders beachtenswert erscheint, dass die Aktivierung von Thrombozyten sowohl zu einer erhöhten Freisetzung von löslichem GPVI in die Plättchenumgebung als auch zu einer erhöhten Expression von GPVI auf der thrombozytären Plasmamembran führt (15,56).

## **1.2 Glykoproteine der Thrombozytenmembran**

Thrombozyten exprimieren membranständige Glykoproteine, welche die Interaktion der Thrombozyten untereinander, mit der subendothelialen Matrix, mit plasmatischen Gerinnungsfaktoren, mit Endothelzellen oder mit Leukozyten vermitteln.

Nach ihrer Molekülstruktur werden diese Glykoproteine in 4 Gruppen unterteilt: Integrine, leuzinreiche Glykoproteine, Selektine und Rezeptoren vom Immunglobulintyp (57) (Tabelle 1).

Die ubiquitär vorkommenden Integrine finden sich auf beinahe allen Zellen und fungieren als Adhäsionsrezeptoren. Sie verbinden Strukturen des Zytoskeletts mit der extrazellulären Matrix. Zu diesem Zweck interagieren Integrine mit einer

Vielzahl von Glykoproteinen wie Kollagen, Fibronectin, Fibrinogen, Laminin, Thrombospondin, Vitronectin und vWF.

Integrine bestehen aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit und werden anhand ihrer Struktur mittels der  $\beta$ -Kette subklassifiziert. Diese verbindet sich mit einer spezifischen  $\alpha$ -Kette zu einem funktionellen Rezeptor (28).

Bis heute wurden fünf auf Thrombozyten vorkommende Integrine beschrieben: drei der  $\beta_1$ -Klasse ( $\alpha_2\beta_1$  = Kollagenrezeptor,  $\alpha_5\beta_1$  = Fibronectinrezeptor,  $\alpha_6\beta_1$  = Lamininrezeptor) und zwei der  $\beta_3$ -Klasse ( $\alpha_{IIb}\beta_3$  = Fibrinogenrezeptor,  $\alpha_v\beta_3$  = Vitronectinrezeptor) zugehörend (57) (Tabelle 1).

Die beiden Membranglykoproteine GPIb-V-IX und GPIV sind charakteristischerweise reich an der Aminosäure Leuzin. GPIb-V-IX als Adhäsionsrezeptor für den vWF spielt eine zentrale Rolle in der primären Hämostase. Die Hauptaufgabe dieses Glykoproteins besteht in der Adhäsion zirkulierender Thrombozyten an den in Kollagenfibrillen immobilisierten vWF entgegen hohen Scherkräften (32). GPIb-V-IX besteht aus vier Untereinheiten: GPIb $\alpha$ , GPIb $\beta$ , GPV und GPIX. GPIb $\alpha$  nimmt eine zentrale Rolle für die Rezeptorfunktion ein. Es weist im Bereich seiner extrazellulären Domäne Bindungsstellen für den vWF und für Thrombin auf (16).

Selektine sind vaskuläre Adhäsionsrezeptoren, die die heterotypischen Interaktionen von Zellen vermitteln. Von den drei bekannten Selektinen (E-, L- und P-Selektin) findet sich nur P-Selektin im Thrombozyten. Es wird in den thrombozytären  $\alpha$ -Granula gespeichert und nur von aktivierten Thrombozyten exprimiert. Dabei fördert es die Anlagerung von Leukozyten an die Endothelläsion und induziert inflammatorische Reaktionen in Leukozyten. Überdies wird P-Selektin auch in den Weibel-Pallade-Körperchen der Endothelzellen gespeichert.

Die Bedeutung der Adhäsionsrezeptoren vom Immunglobulintyp PECAM-1 und ICAM-2 ist noch nicht vollständig geklärt. Für PECAM-1 wird eine Rolle bei der Plättchenadhäsion an das Subendothel diskutiert. Dabei scheint es durch Scherspannung aktiviert zu werden und dann selbst die ERK1/2 Kaskade zu aktivieren (24).

ICAM-2 wurde auf aktivierten Thrombozyten beschrieben und scheint von Bedeutung für die thrombozytenvermittelte Inflammation und für die Adhäsion von Thrombozyten an Leukozyten zu sein (28).

Tabelle 1 **Glykoproteine der Thrombozytenmembran** (modifiziert nach Literaturangaben 24, 27)

Klassifizierung	Elektrophoretische Klassifizierung	Cluster of Differentiation Nomenklatur	Rezeptorzahl pro Plättchen	Ligandenspezifität
<b>Integrine</b>				
$\alpha_2\beta_1$	GPIa-IIa	CD49b	1000	Col
$\alpha_5\beta_1$	GPIc-IIa	CD49c	1000	Fn
$\alpha_6\beta_1$	GPIc'-IIa	CD49f	1000	Laminin
$\alpha_{IIb}\beta_3$	GPIIb-IIIa	CD41-CD61	60.000-100.000	Fb, Fn, Vn, vWF
$\alpha_v\beta_3$	GPav-IIIa	CD51-CD61	100	Vn, Fb, Fn
<b>Leuzinreiche Glykoproteine</b>				
--	GPIb-V-IX	CD42a-b-c	25.000	vWF, Thrombin
--	GPIV (GPIIb)	CD36	15.000-25.000	Col, Tsn
<b>Selektine</b>				
--	P-Selektin	CD62P	12.000	$\alpha$ Mb2, PSGL-1
<b>Immunglobulinähnliche Adhäsionsrezeptoren</b>				
--	ICAM-2	CD102	5.000	LFA-1
--	PECAM-1	CD31	3.000	unbekannt
--	GPVI	--	3.700	Col
<b>Lysosomale integrale Membranproteine</b>				
--	GP53	CD63	3.000	unbekannt

Col: Kollagen, Fb: Fibrinogen, Fn: Fibronectin, Vn: Vitronectin, vWF: von-Willebrand-Faktor, Tsn: Thrombospondin

## 1.3 Thrombozytäres GPVI

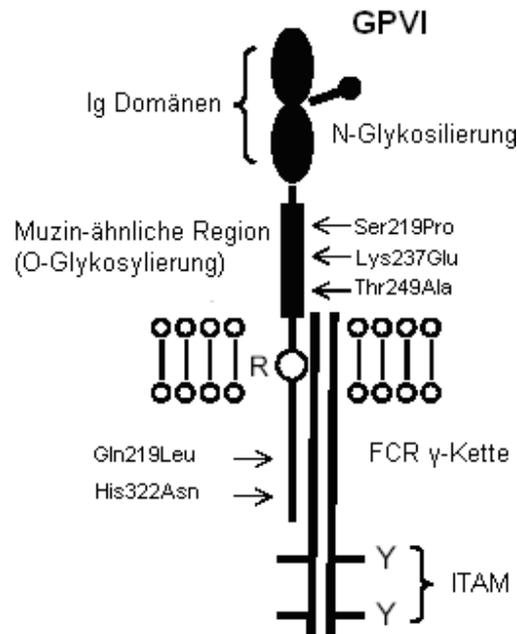
### 1.3.1 GPVI - Struktur und Signaltransduktion

GPVI wurde 1982 durch 2-D Gelelektrophorese als ein 60-65 kDa schweres thrombozytäres Glykoprotein identifiziert (17). Humanes GPVI besteht aus 339 Aminosäuren und besitzt 2 Ig-C2-ähnliche extrazelluläre Domänen, welche aus Disulfid-Bindungen, einem Muzin-ähnlichen Stiel, einer Transmembranregion und einem kurzen 51 Aminosäuren langen cytoplasmatischen Schwanz bestehen (39) (Abbildung 2).

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl das transmembranöse als auch das cytoplasmatische Ende des humanen GPVI Bereiche enthält, welche Bindungen mit weiteren Proteinen vermitteln. Für die Bindung einer Fc Rezeptor  $\gamma$ -Kette ist ein positiv geladenes Arginin erforderlich, welches GPVI in seiner transmembranösen Region trägt. Daneben scheinen die ersten 6 juxtamembranösen Aminosäuren von großer Wichtigkeit für die Bindung einer Fc Rezeptor  $\gamma$ -Kette zu sein.

Das cytosolische GPVI-Ende enthält eine Prolin-reiche Sequenz, welche selektiv an die Src homology 3 Domäne der Src Tyrosinkinasen Fyn und Lyn bindet (73). Ebenfalls am cytoplasmatischen Ende trägt GPVI eine Calmodulin bindende Domäne (26,27). Calmodulin ist fortwährend mit thrombozytärem GPVI assoziiert, dissoziiert aber mit zeitlicher Verzögerung nach Aktivierung.

Die Quervernetzung zweier GPVI-Komplexe führt zur Tyrosinphosphorylierung ihrer Immunorezeptor Tyrosin-basierenden Aktivierungsmotive (ITAM) durch die Tyrosinkinasen Fyn und Lyn (9,21,65). Hierauf folgen Bindung und anschließende Aktivierung der Syk Tyrosinkinase, welche zwei SH2 Domänen enthält. Dies initiiert eine nachgeschaltete Signalkaskade, welche zur Aktivierung einiger Effektorenzyme wie PLC $\gamma$ 2, kleine G-Proteine und Phosphoinositid-3 Kinase führt. Von entscheidender Bedeutung für diese Signalkaskade sind die Adapter LAT und SLP-76. Das Signaling durch die GPVI/FcR  $\gamma$ -Kette wird über denselben Weg vermittelt wie bei Immunrezeptoren, wobei die FcR  $\gamma$ -Kette als signaltransduzierender Teil des Rezeptorkomplexes fungiert (56).



**Abbildung 2: modifiziert nach Literaturangabe 56: Der GPVI/FC Rezeptor  $\gamma$ -Kettenkomplex**

Abgebildet ist die Anordnung des GPVI/Fc Rezeptor  $\gamma$ -Kettenkomplexes. GPVI besteht aus zwei Ig Domänen, die mit einer Muzin-ähnlichen Region verbunden sind. Diese Muzin-ähnliche Region enthält mehrere Bindungsstellen für O-gebundene Glykolisierung. Die Transmembrandomäne enthält ein Arginin, welches für die Assoziierung mit einer FcR  $\gamma$ -Kette via Salzbrückenbindung notwendig ist. Das cytosolische Ende enthält eine prolinreiche Sequenz sowie eine Calmodulin bindende Domäne. Die FcR  $\gamma$ -Kette besteht aus einem Homodimer, welches durch Disulphidbindungen verbunden ist. Sie besitzt zwei Tyrosine in einer festen Sequenz, die als Immunorezeptor Tyrosin-basierendes Aktivierungsmotiv (ITAM) bekannt ist.

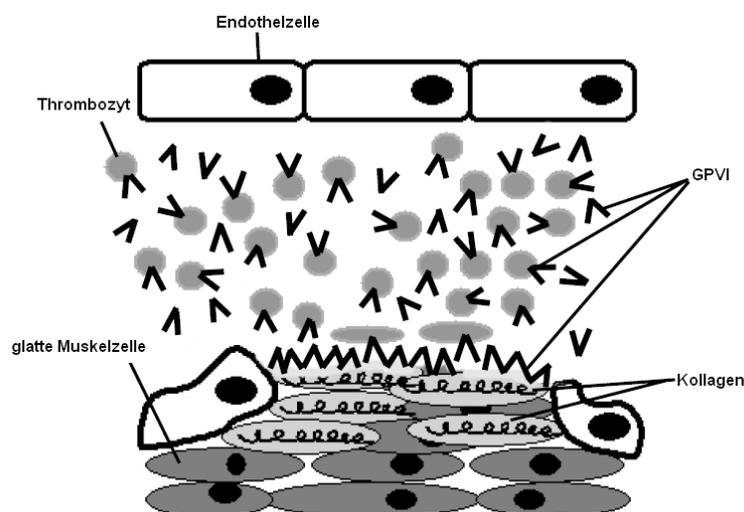
### 1.3.2 GPVI – Funktion

Neuere Arbeiten haben gezeigt, dass die Bindung von Kollagen an GPVI als initialer Trigger für Plättchenaktivierung und Plättchenaggregation bei Gefäßverletzungen dient, durch welche Komponenten der ECM wie Kollagen freigelegt werden (40,52,56). GPVI bindet nur an fibröses Kollagen, wobei lösliches GPVI auf dieselbe Weise an Kollagen bindet wie das auf der Thrombozytenoberfläche gebundene GPVI (29) (Abbildung 3).

GPVI-vermittelte feste Plättchenadhäsion führt zur Thrombozytenaktivierung und Sekretion prokoagulatorischer sowie proinflammatorischer Verbindungen, welche abwechselnd die Thrombusbildung verstärken und konsolidieren (56).

Nach der Kollagenbindung an Thrombozyten kommt es zur Phosphatidylserinexpression auf der Plättchenoberfläche. Phosphatidylserin verursacht Prothrombinaseaktivität, welche die Thrombusformation erhöht (56). Darüber hinaus erhöht sich die Lebensdauer adhärenter Plättchen um mehrere Stunden bis Tage. Die adhärenen Plättchen initiieren ferner die de novo-Proteinsynthese und Interleukin-1- $\beta$  Freisetzung durch Mikrovesikelfreisetzung (43,44,45). Hierdurch wird die inflammatorische Aktivität in der Umgebung eines Plättchenthrombus potenziert.

GPVI gilt als der wichtigste Kollagenrezeptor für die Vermittlung von Thrombozytenadhäsion und Thrombozytenaggregation an menschlichen atherosklerotischen Plaques (19,59). Wird GPVI inhibiert, führt dies zu einer substantiellen Abschwächung der Plättchenadhäsion an das atherosklerotische Gewebe (59). Obwohl GPVI kontinuierlich auf der Thrombozytenoberfläche exprimiert wird, erhöhen sich nach Plättchenaktivierung Freisetzungsrates und Plasmamembranexpression deutlich (15,56). Dies legt die Vermutung nahe, dass die Dichte des thrombozytären Kollagenrezeptors GPVI in Verbindung mit Myokardinfarkten steht (12,13,68).



**Abbildung 3: modifiziert nach Literaturangabe 13: Interaktion von GPVI und Kollagen bei Gefäßwandverletzungen**

*Bei Gefäßwandverletzungen werden Bestandteile des ECM wie Kollagen freigelegt. Sowohl plättchengebundenen wie auch löslichen GPVI binden auf dieselbe Art an das Kollagen.*

#### **1.4 Thrombozytäres Membranglykoprotein GP-Ib-V-IX**

Thrombozyten weisen zwei Membranglykoproteinkomplexe auf, die durch ihren Reichtum an der essentiellen Aminosäure Leuzin charakterisiert sind: GP-Ib-V-IX und GP IV.

Der GP-Ib-V-IX-Komplex bildet den Adhäsionsrezeptor für vWF und spielt eine zentrale Rolle in der primären Hämostase (vergleiche 1.1). Hauptaufgabe von GP-Ib-V-IX ist die Adhäsion zirkulierender Thrombozyten an in Kollagenfibrillen immobilisierten vWF entgegen den hohen Scherkräften, wie sie im Bereich arterieller Strömungen vorkommen (28).

#### **1.5 Thrombozytäres Membranglykoprotein P-Selektin**

P-Selektin gehört zur Gruppe vaskulärer Adhäsionsrezeptoren und findet sich sowohl in Plättchen als auch in Endothelzellen. Es liegt gespeichert in thrombozytären  $\alpha$ -Granula und in endothelialen Weibel-Pallade-Körperchen vor. Auf ruhenden Thrombozyten oder Endothelzellen wird P-Selektin nicht exprimiert. Eine Aktivierung führt jedoch zur raschen Freisetzung und Oberflächenexpression von P-Selektin auf beiden Zelltypen und spielt eine zentrale Rolle bei der sekundären Hämostase und bei vaskulären Reparaturvorgängen. P-Selektin fördert die Anlagerung von Leukozyten an die Endothelläsion und induziert inflammatorische Reaktionen in Leukozyten (28).

#### **1.6 Beschreibung und Definition der stabilen Angina pectoris**

Stabile Angina pectoris (SAP) ist ein Symptom myokardialer Ischämie, welche bei Sauerstoffminderversorgung des Herzmuskels auftritt (72). Gekennzeichnet ist die SAP durch kurzzeitig (im Rahmen weniger Minuten) anhaltende thorakale Beschwerden. Auslösende Faktoren können körperliche Belastung, emotionale

Anstrengung, Kälte oder ausgiebige Mahlzeiten sein. Als „stabil“ wird eine Angina bezeichnet, wenn bei mehrfachem Auftreten die Symptome von gleicher Intensität und nicht progredient sind.

Nach der Canadian Cardiovascular Society lässt sich die belastungsabhängige Angina in 4 Grade einteilen (38):

Grad	Definition
1	Angina nur bei sehr starker oder anhaltender Belastung
2	Angina mit mäßiger Beeinträchtigung normaler Tätigkeiten
3	Angina mit deutlicher Einschränkung der Leistungsfähigkeit
4	Angina mit erheblicher Einschränkung der Leistungsfähigkeit

Beseitigen lässt sich die SAP in der Regel durch körperliche Ruhe und die Gabe von Glyceroltrinitrat (1).

## **1.7 Beschreibung, Definition und Untergliederung des akuten Koronarsyndroms**

Unter dem Begriff “Akutes Koronarsyndrom” werden die instabile Angina pectoris (IAP) und der akute Myokardinfarkt zusammengefasst (63), wobei der akute Myokardinfarkt weiter unterteilt wird. Diese Unterteilung umfasst transmurale Infarkte, gekennzeichnet durch initial auftretende ST-Hebung und Auftreten von Q-Wellen (STEMI), und nicht-transmurale Infarkte, gekennzeichnet durch das Fehlen einer ST-Hebung und keinem Auftreten von Q-Wellen (NSTEMI). Dabei ähneln sich die Beschwerden beider Krankheitsbilder so sehr, dass sie sich allein durch Beurteilung der Symptomatik nicht sicher unterscheiden lassen.

Leitsymptom ist der stark ausgeprägte, retrosternal oder (seltener) epigastrisch lokalisierte (Thorax-)Schmerz. Er hält in aller Regel länger (mehr als 20

Minuten) an als ein SAP-Anfall und ist intensiver. Charakteristisch sind des Weiteren Glyceroltrinitrat-Refraktärität sowie Schmerzausstrahlung in die Arme, den Rücken, den Hals, den Unterkiefer und die epigastrische Region.

Begleitsymptome sind Blässe, Kaltschweißigkeit, Übelkeit, Erbrechen, Benommenheit und Schwächegefühl. In 25-30% der Fälle manifestiert sich der Myokardinfarkt allerdings als klinisch stummer Infarkt. Zur Einteilung des akuten Koronarsyndromes werden folgende Kriterien genutzt:

Episoden von mehr als 20 Minuten Angina pectoris, die entweder progredient sind oder innerhalb 24 Stunden in Ruhe oder bei minimaler körperlicher Aktivität auftreten. Das EKG weist entweder eine neu aufgetretene ST-Erniedrigung von mindestens 0,05mV, eine transiente (<20 Minuten) ST-Erhöhung von mindestens 0,1mV oder eine negative T-Welle von mindestens 0,3mV in zwei oder mehr Standardableitungen auf. Kreatinkinase (CK) und Troponin-I können erhöht sein, können aber auch normale Werte aufweisen. Bei CK oder Tn-I Erhöhung spricht man in Abhängigkeit vom EKG von STEMI oder NSTEMI:

Ein STEMI liegt vor, wenn bei einer länger als 20 Minuten andauernden Angina pectoris-Episode im EKG eine ST-Hebung von mindestens 0,1mV in zwei oder mehr Standardableitungen sichtbar ist und eine mindestens zweifache CK-Erhöhung, eine signifikante CK-MB Erhöhung oder ein erhöhter Tn-I Level vorliegt.

Ein NSTEMI liegt vor, wenn bei einer länger als 20 Minuten andauernden Angina pectoris-Episode im EKG keine ST-Hebung sichtbar ist und eine mindestens zweifache CK-Erhöhung, eine signifikante CK-MB Erhöhung oder ein erhöhter Tn-I Level vorliegt.

## **1.8 Definition kardialer Risikofaktoren**

Bereits 1947 startete der US-amerikanische Public Health Service eine Studie mit der Zielsetzung, den zu dieser Zeit dünnen Kenntnisstand über die Epidemiologie der koronaren Herzkrankheit aufzufrischen (60). Resultat dieser Framingham-Studie war die Definition mehrerer kardiovaskulärer Risikofaktoren:

Neben Alter und männlichem Geschlecht konnten erhöhter systolischer Blutdruck, Nikotinabusus, erhöhtes Gesamtcholesterin, erhöhtes LDL-C, erniedrigtes

HDL-C, Glukoseintoleranz und Diabetes mellitus als Risikofaktoren determiniert werden. Adipositas, koronare Herzkrankheit in der familiären Anamnese, linksventrikuläre Hypertrophie und Östrogensersatztherapien wurden ebenfalls als verursachend angesehen (2,75).

In den vergangenen Jahren konnten weitere Risikofaktoren identifiziert werden: Intima- und Media-Dicke der A. carotis (58), Hypoalphalipoproteinämie (5), Hyperhomocysteinämie (22) und das metabolische Syndrom (50). Ob die Hyperhomocysteinämie und die Behandlung dieses Risikofaktors jedoch tatsächlich eine Relevanz besitzen, wird in letzter Zeit kontrovers diskutiert. Die Tripeltherapie der Hyperhomocysteinämie mit Folsäure, Vitamin B12 und Vitamin B6 erscheint nicht von Vorteil (8).

## **2 Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit**

In dieser Arbeit sollen folgende Aspekte untersucht werden:

1. Finden sich Unterschiede in der Höhe der GPVI-Expression zwischen gesunden Menschen und Patienten mit stabiler Angina pectoris und finden sich Unterschiede in der Höhe der GPVI-Expression zwischen Patienten mit stabiler Angina pectoris und Patienten mit akutem Koronarsyndrom?
2. Unterscheidet sich die GPVI-Expression des Troponin-positiven akuten Koronarsyndroms, des NSTEMI und des STEMI jeweils von der GPVI Expression bei stabiler Angina pectoris?
3. Haben kardiovaskuläre Risikofaktoren einen Einfluss auf die GPVI-Expression bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom?

### **3 Materialien und Methoden**

#### **3.1 Material und Studienpopulation**

##### **3.1.1 Studienpopulation und Kontrollgruppe**

Im Rahmen der Studie wurde das Blut von 367 Patienten, welche mit symptomatischer koronarer Herzerkrankung in der medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Tübingen koronarangiographiert wurden, untersucht. 240 Patienten wiesen eine stabile Angina pectoris, 127 ein ACS bzw. einen Myokardinfarkt auf.

Als Ausschlusskriterien wurden Alter unter 18 Jahren, fehlendes informiertes Einverständnis und falsch positive CK bzw. CK-MB Werte genutzt.

Als erste Kontrollgruppe wurde zunächst die GPVI-Expression bei augenscheinlich gesunden Menschen gemessen: Hierzu wurden 30 Personen (22 Männer und 8 Frauen) untersucht, bei denen außer 4x Nikotinabusus keine kardialen Risikofaktoren vorlagen. Diese 30 Personen wurden natürlich nicht koronarangiographiert.

Als zweite Kontrollgruppe untersuchten wir 15 Patienten (9 Männer und 6 Frauen), bei denen eine koronare Herzkrankheit ausgeschlossen worden war. Diese 15 Patienten wurden wegen thorakalen Druckschmerzes koronarangiographiert und wiesen folgendes koronarvaskuläres Risikoprofil auf:

6x arterielle Hypertonie, 1x Diabetes mellitus, 1x Familiäre Anamnese mit koronarer Herzkrankheit, 1x Hypercholesterinämie und 1x Nikotinabusus.

### 3.1.2 Monoklonale Antikörper für die Durchflusszytometrie

Für die Studie wurden FITC- (Fluorescein-Isothiocyanat) bzw. PE- (Phycoerythrin) konjugierte Antikörper verwendet.

Genutzt wurde der FITC-konjugierte monoklonale anti-CD62P Antikörper der Firma Immunotech (F-13009 Marseille, Klon „CD62P-FITC No. 1164“). Der FITC-konjugierte monoklonale anti-CD62P Antikörper bindet an das  $\alpha$ -granuläre Glykoprotein P-Selektin. Dieses Glykoprotein wird nur dann auf der thrombozytären Oberfläche exprimiert, wenn der Thrombozyt aktiviert und damit adhärent ist (28).

Außerdem wurde der PE-konjugierte monoklonale anti-CD42b Antikörper der Firma Immunotech (F-13009 Marseille, Klon „CD42b-PE IM1417“) genutzt. Der PE-konjugierte monoklonale anti-CD42b Antikörper bindet an den leuzinreichen Membranglykoproteinkomplex GP-Ib-V-IX.

Ferner nutzten wir den FITC-konjugierten monoklonalen anti-GPVI Antikörper der Firma ProCorde (D-82152 Martinsried, Klon „4C9“). Der FITC-konjugierte monoklonale anti-GPVI Antikörper bindet an den thrombozytären Kollagenrezeptor GPVI.

### 3.1.3 Verwendete Materialien

Monovetten der Firma Sarstedt (D-51588 Nürnberg):

- S-Monovette® 8,5ml CPDA. Steril
- S-Monovette® 9ml K3E
- S-Monovette® 7,5ml Z
- S-Monovette® 9ml AH

Pasteurpipetten der Firma neoLab® (neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Rischerstr. 7, D-69123 Heidelberg):

- neoLab-Pasteurpipetten blood banking non steril, PE graduiert fein 2,0ml 156mm lang

Cups der Firma Eppendorf (D-22339 Hamburg):

- 2,5ml Cups weiß
- 2,5ml Cups rot
- 2,5ml Cups blau
- 2,5ml Cups gelb

Paraformaldehyd (Merck, D-64293 Darmstadt)

PBS (Invitrogen Corporation, D-76131 Karlsruhe)

“FacsCalibur” Fluss-Zytometer (Becton-Dickinson, D-69126 Heidelberg)

Megafuge 1.0 K (Heraeus Instruments, D-40470 Düsseldorf)

5ml Polystyrene Round-Bottom Tube (BD Biosciences, B-9320 Erembodegem)

Aqua dest.

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Probengewinnung**

Arteriell Blut wurde aus der Schleuse gewonnen, die zu Beginn der Herzkatheteruntersuchung in die Arteria femoralis gelegt worden war. Die Herzkatheteruntersuchung wurde bei Patienten mit ACS sofort nach Einweisung in das Krankenhaus durchgeführt, bei Patienten mit SAP erfolgte der Eingriff elektiv.

Bei den 30 gesunden Kontrollen wurde das Blut durch Venenpunktion der Vena mediana cubiti gewonnen.

Das Blut wurde in 5mL Citrat Phosphat Dextrose Arginin (CPDA) Monovetten gefüllt, aufbereitet und anschließend via Durchflusszytometrie analysiert.

### 3.2.2 Probenaufbereitung

Die Aufbereitung folgte stets streng nach folgendem Protokoll:

1. Pipettieren von 490µl PBS in ein Eppendorf Cup und Beigabe von 10µl des CPDA-Vollblutes.
2. In zwei FACS-Röhrchen werden je 35µl dieser 500µl pipettiert.
3. In das erste FACS-Röhrchen werden 5µl des FITC-konjugierten monoklonalen anti-GPVI Antikörpers gegeben, in das zweite Röhrchen werden 5µl des FITC-konjugierten monoklonalen anti-CD62P Antikörpers gegeben.
4. Beide Ansätze werden mit je 5µl des PE-konjugierten monoklonalen anti-CD42b Antikörpers versehen.
5. Zu beiden Ansätzen werden je 5µl PBS hinzugegeben.  
Die Konzentration des 1:200 verdünnten FITC-konjugierten monoklonalen anti-GPVI Antikörpers beträgt nun 5µg/ml.
6. Beide Ansätze werden bei Zimmertemperatur in einem abgedunkelten Raum für 25 Minuten inkubiert.
7. Mit je 300µl 0,5% PFA wird finiert.
8. Die Ansätze werden bei 4°C bis zur FACS-Messung aufbewahrt.

### 3.2.3 Durchflusszytometrie

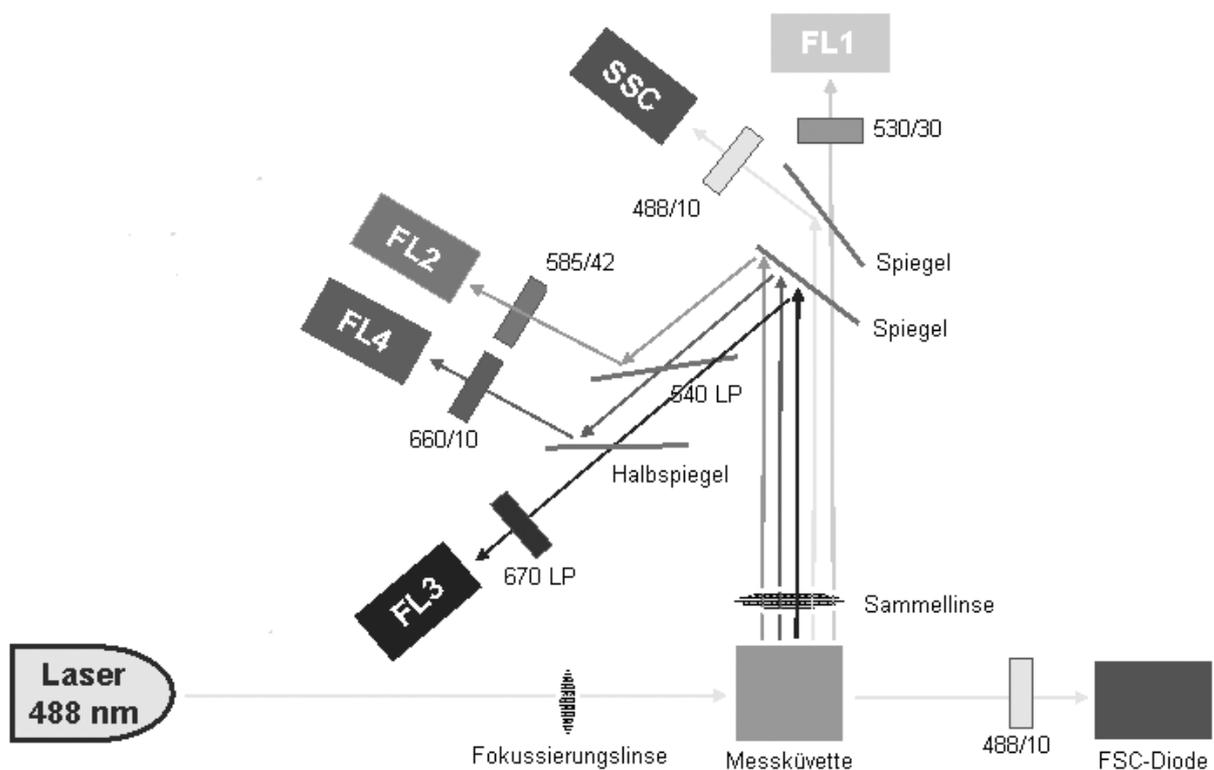
Das Prinzip der Durchflusszytometrie besteht darin, Mikropartikel wie Thrombozyten anhand ihrer Größe, Struktur, Oberflächeneigenschaften und intrazellulären Zusammensetzung zu unterscheiden.

Wesentliches Merkmal ist die Möglichkeit, innerhalb kürzester Zeit tausende Zellen in einem laminaren Probenstrom einzeln an einem Laser vorbeizuleiten. Dies ist neben der gleichzeitigen Erfassung verschiedener Parameter der größte Vorteil, den die Durchflusszytometrie gegenüber anderen Verfahren zur Zellcharakterisierung aufweist.

Viele Anwendungen setzen für die Messung mit dem Durchflusszytometer eine Markierung der zu messenden Zellen mit Antikörpern voraus. Diese Antikörper

werden entweder direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert oder werden indirekt mittels eines fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers nachgewiesen. Neben der Markierung mit nur einem Antikörper sind auch Mehrfachmarkierungen möglich.

Die so markierten Zellen werden von einem Laserstrahl erfasst, wodurch das entsprechende Fluorochrom einen Teil der Lichtenergie absorbiert und Fluoreszenzlicht in einer bestimmten Wellenlänge (monochromatisches Licht) emittiert. Das Licht wird durch ein komplexes System aus Spiegeln und Filtern gebündelt und zerlegt. Die Filter sind dabei so ausgelegt, dass sie – in Hinblick auf eine hohe Sensitivität – möglichst viel emittiertes Licht eines bestimmten Fluorchromes durchlassen, das Fluoreszenzlicht der anderen Fluorchrome aber weitgehend herausfiltern.



**Abbildung 4: Das optische System eines Durchflusszytometers.** (modifiziert nach einer Vorlage der FACS und Array Core Facility der Universität Mainz)

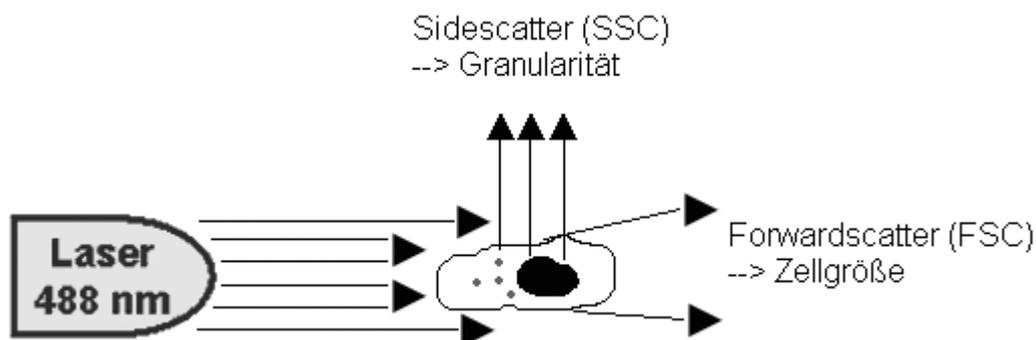
Aus einem Laser gesendetes Licht einer bestimmten Wellenlänge wird fokussiert und trifft in einer Messküvette auf den Probenstrom. Zellen und Partikel des Probenstroms streuen und reflektieren das Licht. Zudem emittieren Fluoreszenzfarbstoffe Licht verschiedener Wellenlängen. In einem System aus verschiedenen Filtern und Spiegeln wird die abgehende Strahlung nach ihren Wellenlängenbereichen getrennt und von Detektoren anteilmäßig registriert.

Mit diesem System lassen sich Zell- und Partikelgröße (mittels der Forwardscatter (FSC) - Diode), deren Granularität (mittels dem Sidescatter (SSC)) und bis zu vier verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe (FL1-FL4) bestimmen. 488/10, 530/30, 585/42, 660/10: Bandpassfilter; LP = Longpassfilter.

Zu diesem Zweck werden in aller Regel so genannte Bandpass- und Longpassfilter verwendet (Abbildung 4). Bandpassfilter lassen nur Licht eines bestimmten Wellenlängenbereiches passieren (Bsp.: der Bandpassfilter 488/10 lässt nur Licht der Wellenlängen 483 bis 493 nm passieren, also ein Wellenlängenband von 10 nm mit dem Mittelwert von 488 nm). Longpassfilter lassen nur Licht oberhalb eines bestimmten Wellenlängenbereiches passieren (Bsp.: 540 LP lässt nur Licht oberhalb 540 nm passieren).

Das nun aufgeteilte Licht gelangt so zu den jeweiligen Detektoren, welche den Anteil der jeweiligen Wellenlänge genau erfassen. Das Signal wird verstärkt, die Daten verrechnet und der Anwender erhält die Ergebnisse, neben den im Folgenden beschriebenen Ergebnissen, in einem Computerprogramm.

Unabhängig von den Fluoreszenzfarbstoffen lässt sich eine Aussage über Größe und Granularität der Zelle treffen: Beim Auftreffen der Laserstrahlen auf die im Probenstrom enthaltenen Bestandteile wird das Licht in der Messküvette gestreut. Die nach vorne abgelenkten Strahlen sind ein Maß für die Größe der gemessenen Zellen und Partikel. Man bezeichnet sie auch als Vorwärtsstreulicht oder als Forwardscatter (FSC). Weitere Strahlen werden in einem 90°-Winkel abgelenkt: Das Seitwärtsstreulicht oder Sidescatter (SSC) dient als Maß für die Zellgranularität (Abbildung 5).



**Abbildung 5: Die Parameter FSC und SSC**

*Der Laserstrahl trifft auf eine Zelle. Dabei werden Strahlen in Richtung des Laserstrahls gestreut, sodass die Zellgröße bestimmt werden kann (Vorwärtsstreulicht oder Forwardscatter FSC). Innerhalb der Zelle wird das Licht an Strukturen im 90°-Winkel reflektiert, sodass die Zellgranularität bestimmt werden kann (Seitwärtsstreulicht oder Sidescatter SSC).*

Allerdings ist darauf zu achten, dass nicht jeder Laser jeden Fluoreszenzfarbstoff anregen kann. Für die vorliegende Arbeit wurde ein Gerät mit einem Argonionenlaser genutzt (vergleiche Tabelle 2).

Tabelle 2: **Durchflusszytometrie-Laser:** Übersicht über die in der Durchflusszytometrie eingesetzten Laser und ihre Eigenschaften

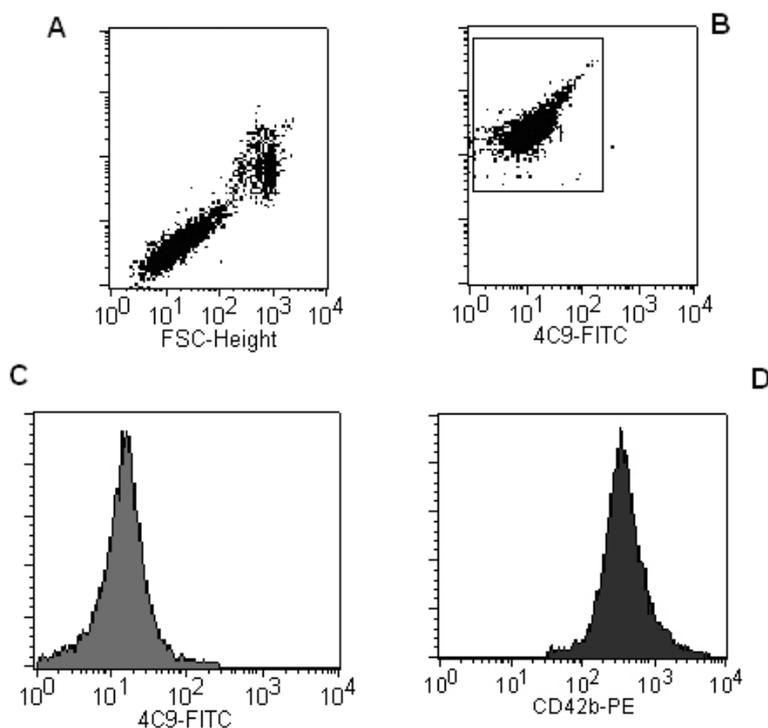
Laser	Wellenlänge	Kühlung mit	Anregbare Fluoreszenzfarbstoffe
Argonionenlaser	488 nm	Luft	FITC, PE, PE/TR, PerCP, PE/Cy5.5, PerCP/Cy5.5, PE/Cy7, A488
Nd:YAG-Laser	532 nm	Luft	PE, PE/TR, PErCP, PE/Cy5, PE/Cy5.5, PerCP/Cy5.5, PE/Cy7
Kryptonlaser	568 nm	Wasser	PE, PE/TR, PerCP, PE/Cy5, PE/Cy5.5, PE/Cy7, A568, TR, A595
Kryptonlaser	647 nm	Wasser	APC, APC/Cy5, APC/Cy5.5, APC/Cy
Farbstofflaser	595 nm	Wasser	TR, A595, APC, Cy5, APC/Cy5.5, APC/Cy7
HeNe-Laser	633 nm	Luft	APC, Cy5, APC/Cy5.5
Diodenlaser	635 nm	Luft	APC/Cy7

Als Fluoreszenzfarbstoff wurden Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) eingesetzt.

Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) ist ein gelbgrüner Farbstoff mit niedriger Molekularmasse, der sich bei hohen pH-Werten über primäre Aminogruppen leicht an Proteine koppeln lässt. Als Absorptionsmaximum wird bei neutralem pH eine Wellenlänge von 495 nm angegeben. FITC kann also gut mit einem Argonionenlaser der Wellenlänge 488 nm angeregt werden.

Phycoerythrin (PE) besitzt ein Emissionsmaximum von etwa 578 nm und ist daher ebenfalls gut für die Messung mit einem Argonionenlaser geeignet.

Des Weiteren ist zu beachten, dass es zu einer Überlappung der Emissionswellenlängenbereiche gleichzeitig gemessener verschiedener Fluorchrome kommen kann. Diese Überlappung führt zu falsch positiven Signalen und muss mittels Kompensation ausgeschlossen werden. Zu diesem Zweck wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst eine FACS-Analyse mit Vollblut durchgeführt. Die Messergebnisse wurden in einem Dot-Plot dargestellt, bei dem die Parameter FSC und SSC gegeneinander aufgetragen sind (vergleiche Abbildung 6 A). In diesem Dot-Plot trennten sich Thrombozyten deutlich von Leukozyten ab. Um die Thrombozyten wurde ein „Gate“ gelegt. Nun wurden die Messungseinstellungen so gewählt, dass in den weiteren Dot-Plots nur noch mit PE- konjugiertem monoklonalen anti-CD42b Antikörper gefärbte Thrombozyten registriert und in der Messung weiter charakterisiert wurden (Abbildung 6 B). Diese Einstellung wurde als Messstandard gespeichert und für die Messung jeder Probe verwendet.



**Abbildung 6: Beispiel für die FACS-Messung (inkl. Kompensation)**

*A zeigt die Darstellung der Messung von Vollblut in einem Dot-Plot. Deutlich voneinander trennbar sind Thrombozyten und Leukozyten.*

*B zeigt das das Thrombozyten-Gate: Dargestellt sind ausschließlich anti-CD42b und anti-GPVI markierte Thrombozyten.*

*C zeigt das Histogramm anti-GPVI markierter Thrombozyten: Es handelt sich um eine einfache Häufigkeitsverteilung, bei der die Stärke des Fluoreszenzsignals (Abszisse) gegen die Anzahl der Ereignisse (Ordinate) aufgetragen ist. Die Darstellung ist logarithmisch.*

*D zeigt das Histogramm anti-CD42b markierter Thrombozyten.*

Bei der eigentlichen Messung wurden die mit FITC-konjugiertem monoklonalen anti-GPVI Antikörper markierten sowie die mit FITC-konjugiertem monoklonalen anti-CD62b Antikörper markierten Thrombozyten quantifiziert. Die Messergebnisse wurden zum einen als Histogramm-Plots dargestellt (Abb. 6 C und D), zum anderen in Form einer Tabelle (Abb. 7).

Events	% Gated	% Total	Mean	Median
9914	100.00	99.14	16.01	13.82

**Abbildung 7: Tabellarische Aufstellung der Messergebnisse**

*Die tabellarische Aufstellung gibt Auskunft darüber, wie viele Zellen gemessen wurden (Events) und bei wie vielen Zellen eine Fluoreszenzmarkierung mit 4C9-FITC gemessen wurde (% Gated). Der Mean-Wert wird für die Auswertung der Messung zu Rate gezogen. Er gibt die durchschnittliche Fluoreszenzaktivität an.*

Zusammengefasst umfasst die Durchflusszytometrie folgende Schritte:

1. Probenvorbereitung (Zellmarkierung)
2. Inbetriebnahme des Durchflusszytometers
3. Kompensation und Messung der Proben
4. Auswertung der Messergebnisse

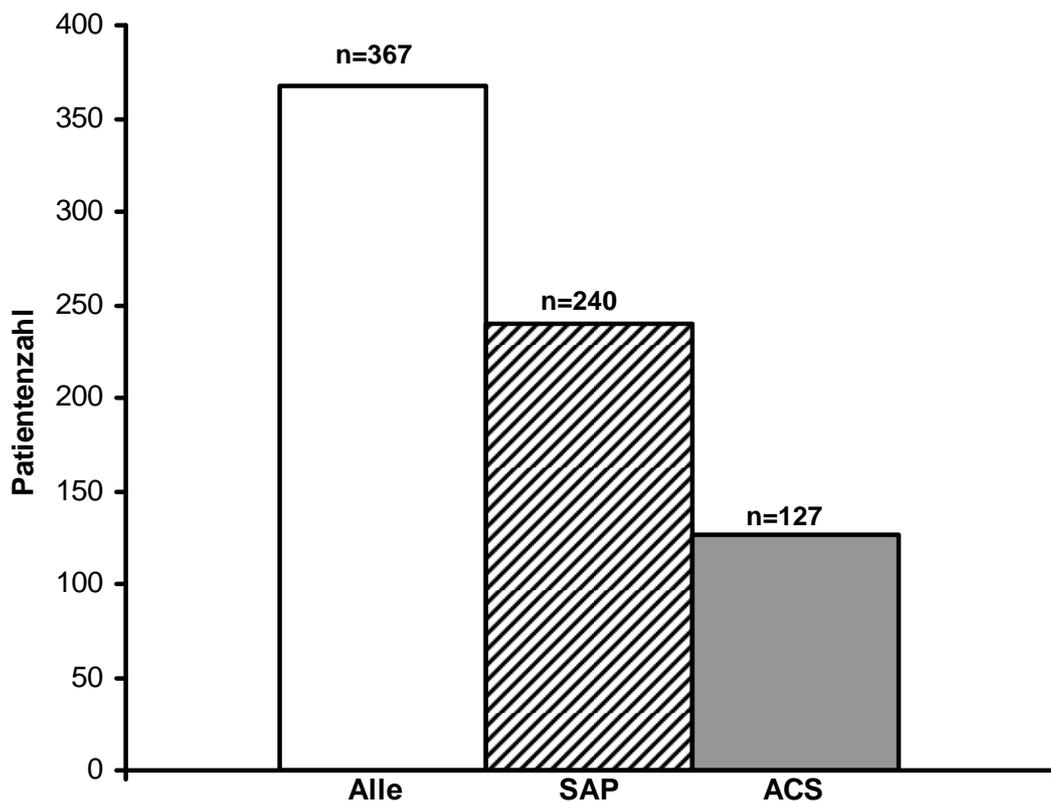
**3.3 Statistische Auswertung**

Paarweise wurden Vergleiche von ACS, Tn<sup>+</sup>ACS, NSTEMI und STEMI mit SAP durch den Kruskal-Wallis Test erhoben. Um das vielfache Testen zu korrigieren wurde eine Bonferroni-Holm Korrektur durchgeführt. Ein Wahrscheinlichkeitswert von  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant gewertet. Der Vergleich zwischen GPVI und klinischen Parametern wurde durch eine Spearman Korrelation durchgeführt. Der Abgleich mit möglichen konfundierenden Variablen wurde durch eine multifaktorielle Kovarianzanalyse des dekadischen Logarithmus von GPVI durchgeführt. Mögliche Zusammenhänge zwischen GPVI und konventionellen Labormarkern wurden mit einer logistischen Regressionsanalyse bestimmt. Alle statistischen Analysen wurden mit dem Statistikprogramm SPSS, Version 13, durchgeführt.

## 4 Ergebnisse

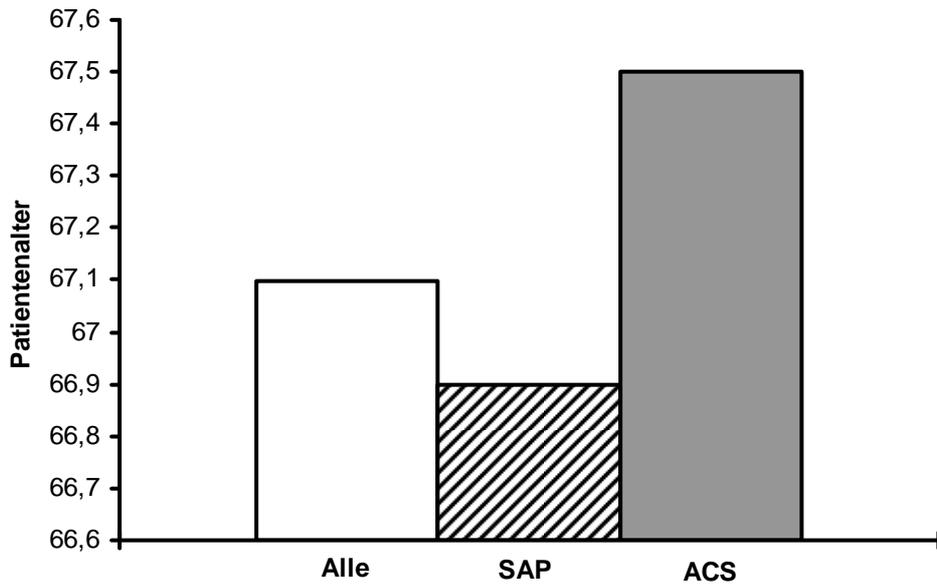
### 4.1 Charakteristika des Patientenkollektivs

Konsekutiv wurde die thrombozytäre Oberflächenexpression des Kollagenrezeptors GPVI bei 367 Patienten mit symptomatischer koronarer Herzkrankheit untersucht. Durch eine Herzkatheteruntersuchung wurde die Diagnose verifiziert und der Schweregrad der Erkrankung bestimmt. Die demographischen Details sind in den Abbildungen 7-15 aufgeführt.



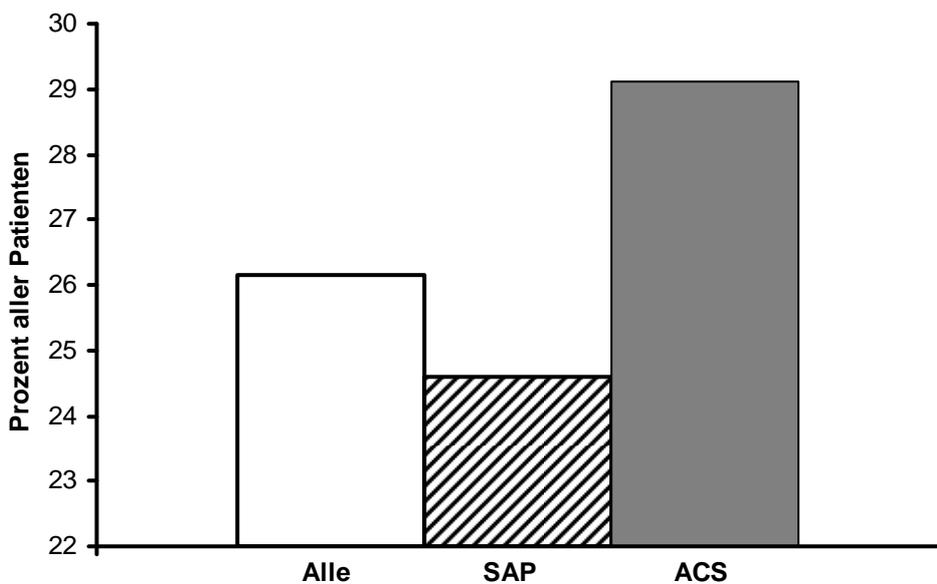
**Abbildung 7: Patientenzahlen**

Das Diagramm zeigt die Zahl untersuchter Patienten an. Insgesamt wurde ein Kollektiv von 367 Patienten untersucht, von denen 240 die Diagnose SAP und 127 die Diagnose ACS aufzeigten.



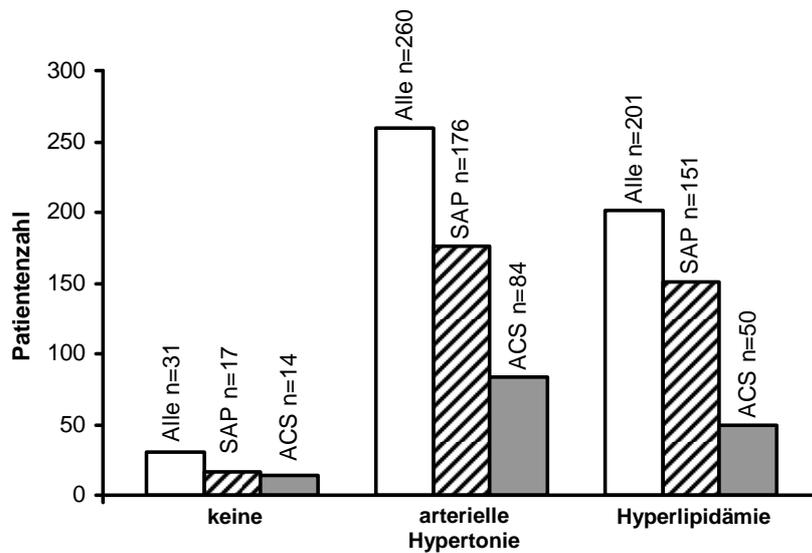
**Abbildung 8: Patientenalter**

Das Diagramm zeigt das Durchschnittsalter aller Patienten (Alle), der Patienten mit stabiler Angina pectoris (SAP) und der Patienten mit akutem Koronarsyndrom (ACS). Zusätzlich ist bei jeder Gruppe die Standardabweichung angegeben.



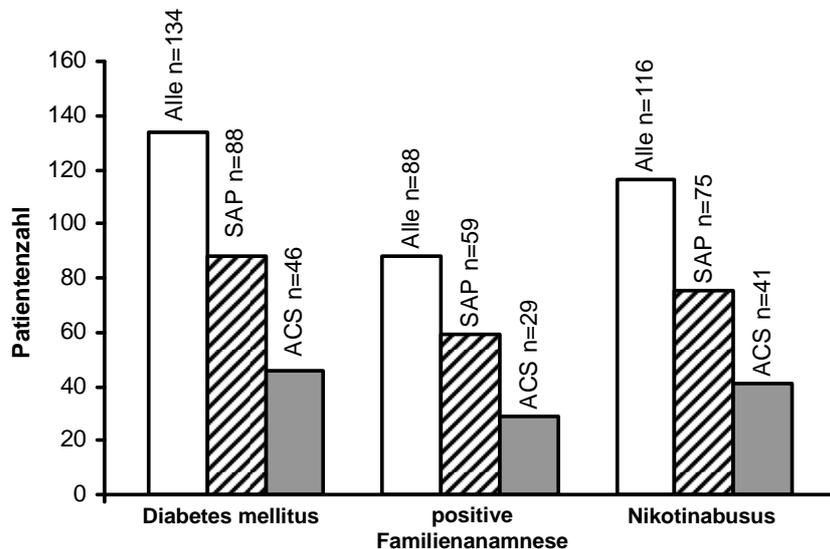
**Abbildung 9: Geschlecht (% Frauen)**

Das Diagramm zeigt den prozentualen Anteil weiblicher Patienten bei allen Patienten (Alle), bei SAP und bei ACS.



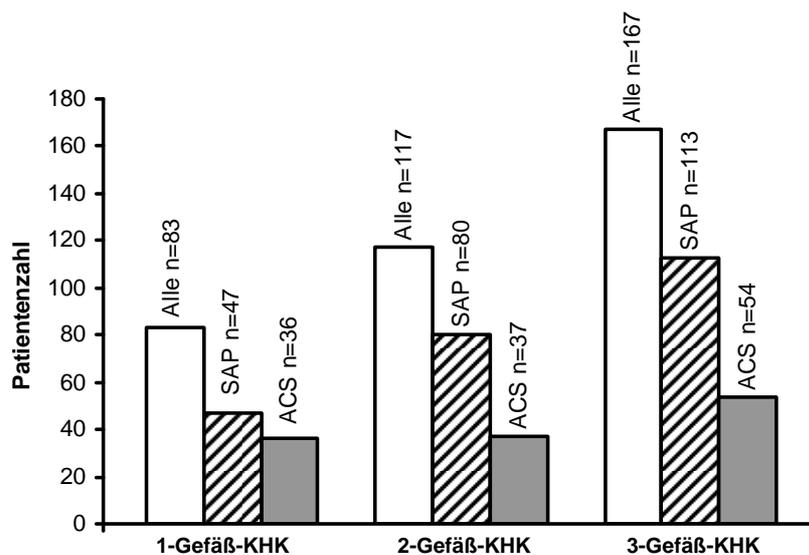
**Abbildung 10: Verteilung Kardiovaskulärer Risikofaktoren im Patientenkollektiv (1)**

Das Diagramm zeigt die Verteilung kardiovaskulärer Risikofaktoren im Patientenkollektiv. Aufgetragen sind Patienten ohne Risikofaktoren (keine), Patienten mit arterieller Hypertonie und Patienten mit Hyperlipidämie. Es erfolgte eine Aufschlüsselung in alle Patienten (Alle), Patienten mit SAP (SAP) und Patienten mit ACS (ACS).



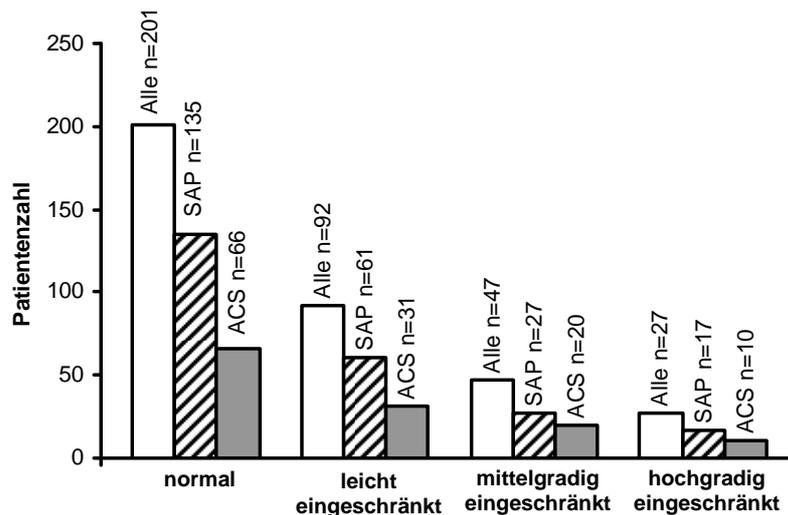
**Abbildung 11: Verteilung Kardiovaskulärer Risikofaktoren im Patientenkollektiv (2)**

Das Diagramm zeigt die Verteilung kardiovaskulärer Risikofaktoren im Patientenkollektiv. Aufgetragen sind die Risikofaktoren Diabetes mellitus, positive Familienanamnese sowie Nikotinabusus. Wiederum erfolgte eine Aufschlüsselung in alle Patienten (Alle), Patienten mit SAP (SAP) und Patienten mit ACS (ACS).



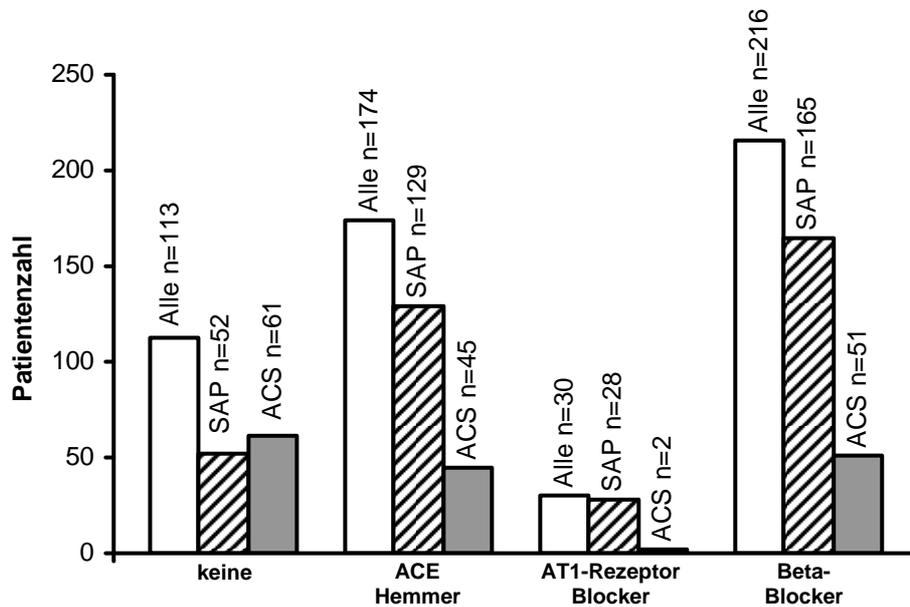
**Abbildung 12: Ausprägungsgrad der koronaren Herzkrankheit (KHK) im Patientenkollektiv**

Abbildung f zeigt den Ausprägungsgrad der KHK bezogen auf das Patientenkollektiv. Das Diagramm zeigt die Zahl von Patienten mit einer 1-Gefäß-KHK, mit einer 2-Gefäß-KHK und mit einer 3-Gefäß-KHK. Abermals erfolgte die Aufschlüsselung in alle Patienten (Alle), Patienten mit SAP (SAP) und Patienten mit ACS (ACS).



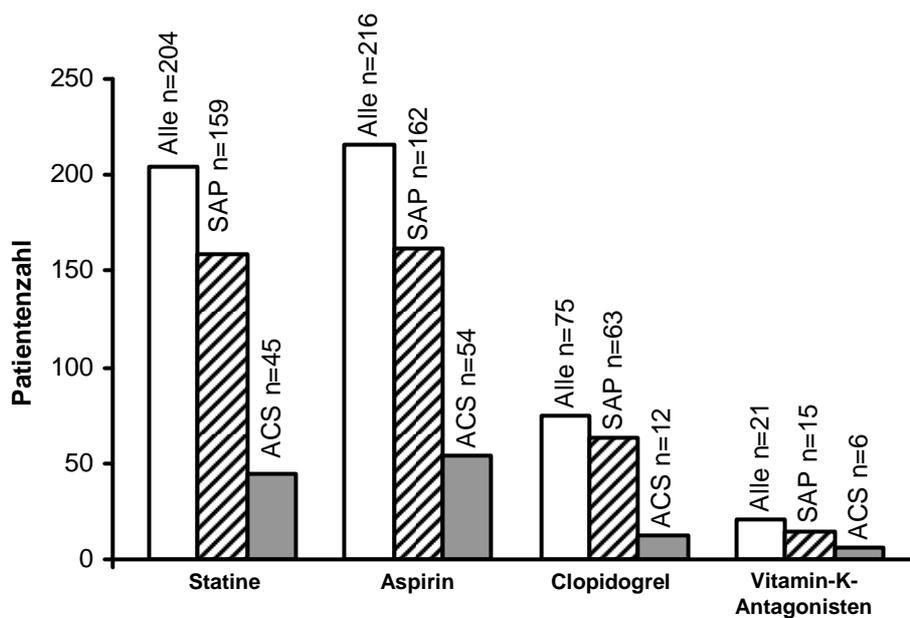
**Abbildung 13: Linksventrikuläre Auswurffraktion (LVEF) im Patientenkollektiv**

Dieses Diagramm zeigt die LVEF des Patientenkollektivs. Es erfolgte eine Einteilung in normale LVEF, leicht eingeschränkte LVEF, mittelgradig eingeschränkte LVEF und hochgradig eingeschränkte LVEF. Die Aufschlüsselung erfolgte in alle Patienten (Alle), Patienten mit SAP (SAP) und Patienten mit ACS (ACS).



**Abbildung 14: Medikation des Patientenkollektives (1)**

Dieses Diagramm zeigt die Medikation zum Zeitpunkt der Krankenhausaufnahme. Aufgeführt ist die Zahl der Patienten ohne Medikation (keine), mit ACE-Hemmern, mit AT-1-Rezeptor Blockern und mit Beta-Blockern.

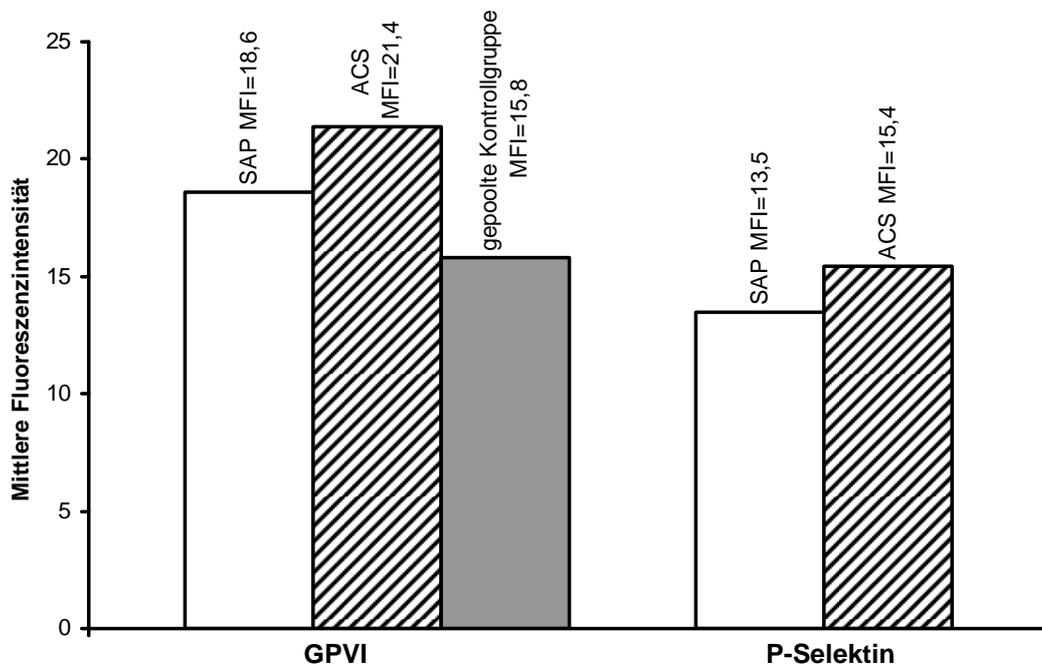


**Abbildung 15: Medikation des Patientenkollektives (2)**

Dieses Diagramm zeigt die Medikation zum Zeitpunkt der Krankenhausaufnahme. Aufgeführt ist die Zahl der Patienten mit Statinen, mit ASS (Aspirin), mit Clopidogrel und mit Vitamin-K-Antagonisten.

## 4.2 Oberflächenexpression von GPVI bei stabiler Angina pectoris und beim akuten Koronarsyndrom

Die Oberflächenexpression von GPVI war bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom im Vergleich zu Patienten mit stabiler Angina pectoris signifikant erhöht (ACS (Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI)  $\pm$  Standardabweichung):  $21,4 \pm 9,7$ ; SAP:  $18,6 \pm 7,1$ ;  $p=0,004$ ) (Abbildung 16). Bereits bei Patienten, die ein Troponin positives akutes Koronarsyndrom aufwiesen, zeigte sich eine signifikante Erhöhung des GPVI Levels im Vergleich zu Patienten mit stabiler Angina pectoris ( $Tn^+$  ACS ( $n=57$ ):  $21,6 \pm 9,2$ ; SAP ( $n=240$ ):  $18,6 \pm 7,1$ ;  $p=0,015$ ).



**Abbildung 16: Die Expression von thrombozytärem GPVI und P-Selektin ist bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom erhöht.**

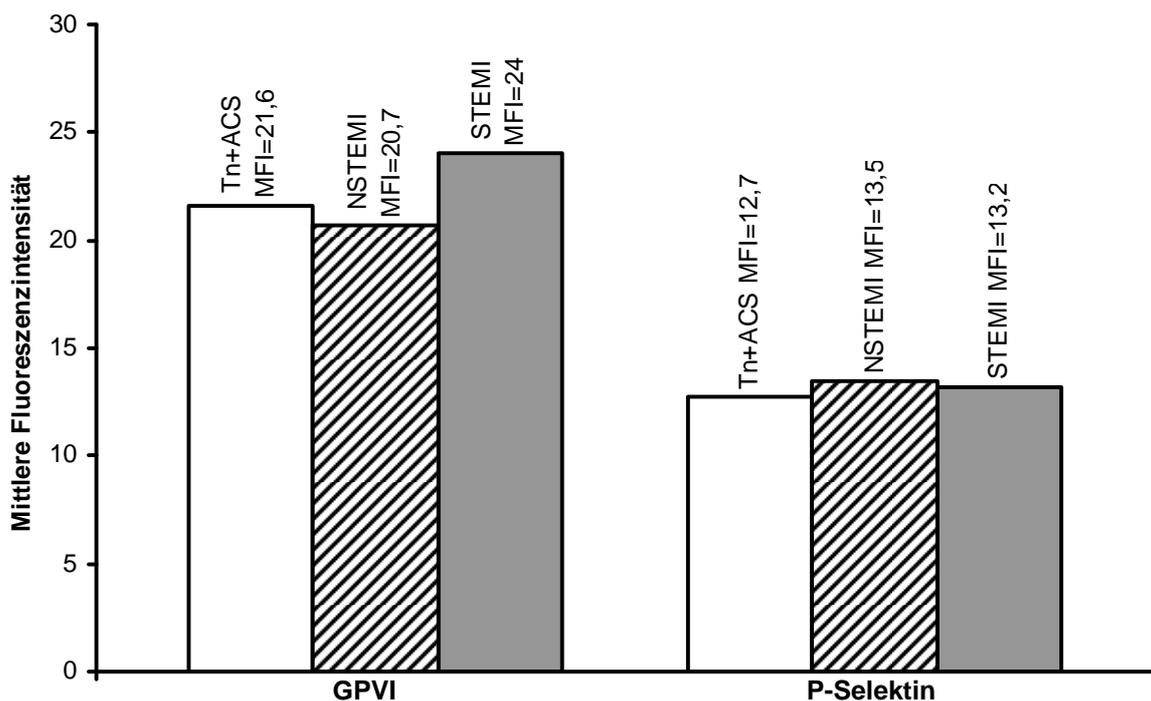
Die Thrombozyten von Patienten mit stabiler Angina pectoris (SAP), akutem Koronarsyndrom (ACS) und gesunden Kontrollpersonen wurden für den Kollagenrezeptor GPVI und für P-Selektin (CD62P) mit monoklonalen Antikörpern gefärbt, die mit FITC respektive PE konjugiert waren. Zweifarben-Vollblut-Durchflusszytometrie wurde gemäß eines Standardprotokolls durchgeführt, die Ergebnisse wurden als Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) angegeben.

Analog fand sich ein signifikanter Unterschied beim Vergleich der GPVI-Werte von Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt und Patienten mit stabiler Angina pectoris: Dies zeigte sich sowohl für den ST-Hebungsinfarkt (STEMI ( $n=19$ ):  $24 \pm 14,2$ ;

SAP (n=240):  $18,6 \pm 7,1$ ;  $p=0,018$ ) als auch für den Nicht-ST-Hebungsinfarkt (NSTEMI n=51:  $20,7 \pm 8,2$ ; SAP (n=240):  $18,6 \pm 7,1$ ;  $p=0,02$ ) (Abbildung 17).

Patienten mit akutem Myokardinfarkt (insbesondere STEMI) schienen im Vergleich zu Patienten mit geringer Myokardischämie (Troponin positives ACS) das höchste GPVI-Expressionsniveau zu erreichen. Jedoch zeigte sich für diese Beobachtung keine statistische Signifikanz (Tn<sup>+</sup> ACS (n=57):  $21,6 \pm 9,2$ ; NSTEMI (n=51):  $20,7 \pm 8,2$ ;  $p=0,672$ ; STEMI (n=19):  $24 \pm 14,2$ ;  $p=0,894$ ) (Abbildung 17). In ähnlicher Weise zeigte sich die Oberflächenexpression von CD62P bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom signifikant erhöht gegenüber Patienten mit stabiler Angina pectoris (ACS (MFI  $\pm$  Standardabweichung):  $15,4 \pm 11,4$ ; SAP:  $13,5 \pm 8,3$ ;  $p=0,036$ ) (Abbildungen 16 und 17).

Das thrombozytäre GPVI korrelierte mit der Oberflächenexpression von P-Selektin ( $r=0,702$ ;  $p=0,001$ ) (Tabelle 4).



**Abbildung 17: Die Expression von thrombozytärem GPVI und P-Selektin bei den verschiedenen Formen des akuten Koronarsyndroms.**

Die Abbildung zeigt die GPVI- und P-Selektin-Expression bei Patienten mit Troponin-positivem akutem Koronarsyndrom (Tn<sup>+</sup>ACS) und bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt mit/ohne ST-Hebung (STEMI/NSTEMI).

### **4.3 Oberflächenexpression von GPVI bei gesunden Personen**

Um Informationen über die normale GPVI Expression bei augenscheinlich gesunden Personen zu erhalten, untersuchten wir als erste Kontrollgruppe unser Laborpersonal (n=30; MFI±Standardabweichung: 15,6±4,7). Diese Kontrollpersonen wurden keiner Koronarangiographie unterzogen. Zudem untersuchten wir als zweite Kontrollgruppe eine Kohorte Patienten, die wegen thorakalen Druckschmerzes koronarangiographiert wurden. Bei diesen Patienten wurde eine koronare Herzkrankheit ausgeschlossen (n=15; MFI±Standardabweichung: 16,2±2,7). Die MFI der GPVI Expression der gepoolten Kontrollgruppe ergab 15,8±4,3 (n=45, Abbildung 16).

### **4.4 Korrelation der GPVI-Expression mit Markern der Myokardischämie**

Des Weiteren untersuchten wir, ob thrombozytäres GPVI mit Markern für eine myokardiale Ischämie korreliert. Dabei stellte sich heraus, dass die unter Akutsymptomatik ermittelten GPVI-Werte nicht mit den entsprechend bestimmten initialen Troponin-I oder CK Werten korrelierten (initiales Troponin: r=0,035, p=0,567; initiale CK: r=0,069, p=0,232) (Tabelle 4).

Dagegen korrelierten die Expression des GPVI mit den später, während des Krankenhausaufenthalts bestimmten maximalen Werten für Troponin-I und CK (maximales Troponin-I: r=0,178, p=0,031; maximale CK: r=0,181, p=0,047) (Tabelle 4). Zwischen Werten für GPVI und dem C-reaktiven Protein (CRP) konnte keine Korrelation ermittelt werden.

Um zu testen, ob die GPVI-Expression unabhängig von konventionellen Labormarkern für ein akutes Koronarsyndrom mit dem akuten Koronarsyndrom assoziiert ist, wurde eine logistische Regressionsanalyse durchgeführt. Diese umfasste Troponin-I, Kreatinkinase und C-reaktives Protein (bestimmt zum Zeitpunkt der Krankenhauseinweisung) (Tabelle 3). Es stellte sich heraus, dass die Oberflächenexpression von GPVI auf Thrombozyten unabhängig mit dem akuten Koronarsyndrom assoziiert ist.

**Tabelle 3: Assoziation von GPVI nach Abgleich mit konventionellen Labormarkern**

Parameter	Regressions- koeffizient B	p-Wert	Odds Ratio	95% Konfidenz- intervall des Odds Ratio	
				Unteres	Oberes
GPVI (MFI)	-0,097	0,013	1,021	1,021	1,189
Initiales Troponin I (ng/ml)	-0,673	0,167	1,966	0,754	5,124
Initiale Kreatinkinase (U/l)	-0,007	0,025	1,007	1,001	1,014
Initiales C-rP (mg/dl)	-0,009	0,882	1,009	0,899	1,132

**Tabelle 4: Korrelation von GPVI mit P-Selektin und Markern myokardialer Ischämie**

Korrelat	GPVI	
	Korrelation nach Pearson	Signifikanz
P-Selektin	0,702	0,001
Initiales Troponin-I	0,035	0,567
Initiale Kreatinkinase	0,069	0,232
Maximales Troponin-I	0,178	0,007
Maximale Kreatinkinase	0,181	0,001

#### 4.5 Korrelation der GPVI-Expression mit kardiovaskulären Risikofaktoren

Ferner untersuchten wir, ob eine Korrelation zwischen erhöhten Expressionswerten von thrombozytärem GPVI und kardiovaskulären Risikofaktoren besteht. Es wurde eine multifaktorielle Kovarianzanalyse für den dekadischen Logarithmus von GPVI durchgeführt. Untersucht wurden mögliche Korrelationen mit

arterieller Hypertonie (n=260; p=0,713), Hyperlipidämie (n=201; p=0,622), Diabetes (n=134; p=0,969), positive Familienanamnese (n=88; p=0,370) und Nikotinabusus (n=116; p=0,872). Dabei zeigte sich, dass erhöhte GPVI-Expressionswerte mit keinem der genannten kardiovaskulären Risikofaktoren statistisch signifikant korrelieren (Tabelle 5).

**Tabelle 5: Multifaktorielle Kovarianzanalyse für den dekadischen Logarithmus von GPVI**

Kategorie	Faktor	p-Wert
<b>Medikation</b>		
	ACE-Hemmer	0,061
	AT-1-Rezeptor-Blocker	0,844
	Beta-Blocker	0,546
	Statine	0,912
	Aspirin	0,456
	Clopidogrel	0,121
	Vitamin K Antagonisten	0,586
<b>Kardiovaskuläre Risikofaktoren</b>		
	Arterielle Hypertonie	0,713
	Hyperlipidämie	0,622
	Diabetes	0,969
	Familiäre Anamnese einer KHK	0,370
	Rauchen	0,872
<b>Konventionelle Labormarker</b>		
	Initiales Troponin I (ng/ml)	0,110
	Initiale Kreatinkinase (U/l)	0,484
	Initiales C-rP (mg/dl)	0,216
<b>Gruppen</b>		
	ACS vs. SAP	0,024

Zudem untersuchten wir mittels multifaktorieller Kovarianzanalyse, ob konventionelle Labormarker wie initiales Troponin I, initiale Kreatinkinase und initiales C-rP statistisch signifikant mit erhöhten GPVI-Expressionswerten korrelieren und ob die Einnahme von KHK-Leitlinientherapeutika die GPVI-Expressions-Erhöhung bei Patienten mit ACS beeinflusst. Es zeigte sich, dass keine statistisch signifikante Korrelation zwischen konventionellen Labormarkern und erhöhten GPVI-Expressionswerten besteht und dass auch die Prämedikation keinen Einfluss auf die GPVI-Expression besitzt (Tabelle 5).

## 5 Diskussion

### 5.1 GPVI-Expression bei stabiler Angina pectoris und beim akuten Koronarsyndrom

Diese Arbeit basiert auf einer Beobachtungsstudie, die 367 Patienten mit stabiler Angina pectoris (SAP) oder akutem Koronarsyndrom (ACS) umfasst. Es ist gezeigt worden, dass die Expressionswerte des thrombozytären GPVI bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom im Vergleich zu den Expressionswerten bei Patienten mit stabiler Angina pectoris signifikant erhöht sind. Eine nähere Betrachtung des akuten Koronarsyndromes erfolgte beim Vergleich des Tn<sup>+</sup>ACS, des STEMI und des NSTEMI mit der stabilen Angina pectoris. Für jedes der drei Vergleichspaare zeigte sich eine signifikante Erhöhung der GPVI Expression gegenüber der stabilen Angina pectoris. Die zum Zeitpunkt der Krankenhausaufnahme bestimmte Expression von GPVI auf der Thrombozytenoberfläche war unabhängig von Labormarkern myokardialer Ischämie (Troponin, CK) mit dem akuten Koronarsyndrom assoziiert. Erhöhte GPVI-Werte bei Krankenhausaufnahme waren mit der Entwicklung eines akuten Koronarsyndromes oder eines Herzinfarktes assoziiert. Eine Assoziation zwischen den Expressionswerten von GPVI und dem Vorhandensein der kardiovaskulären Risikofaktoren arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie, Diabetes, positive Familienanamnese sowie Nikotinabusus konnte nicht gezeigt werden.

Diese Resultate legen den Schluss nahe, dass thrombozytäres GPVI ein früher Marker für die Identifizierung von Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom ist. Da die GPVI-Expressionswerte zum Zeitpunkt der Krankenhausaufnahme schon erhöht sein können, während Labormarker myokardialer Nekrose sich noch im Normbereich bewegen, liegt es nahe anzunehmen, dass ein Thrombozyten-spezifischer Marker helfen kann, Risikopatienten zu erkennen, bevor die Myokardischämie offensichtlich wird. Die Untersuchung von Patienten, die mit thorakalen Beschwerden oder anderen Symptomen, die auf ein akutes Koronarsyndrom hinweisen, in der Klinik vorstellig werden, nimmt (zu-) viel Zeit in Anspruch und ist problematisch. Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass ein Anstieg von Biomarkern, der dem Anstieg der Laborparameter für kardiale Nekrose (Troponine-I oder -T) vorgeschaltet ist (wie zum Beispiel Laborparameter für Entzündungen (C-rP, CD40L) und Laborparameter für myokardiale Dehnung (BNP)),

eine frühere Beurteilung des allgemeinen Patientenrisikos möglich machen könnten und darüber hinaus durch frühzeitigere Identifizierung von Patienten mit einem größeren Risiko für einen ungünstigen Verlauf der Angina pectoris von großem Nutzen bezüglich des Patienten-Outcomes sein könnten.

Thrombozytenaktivierung und die thrombozytär vermittelte Thrombusformation sind beim Auftreten einer Plaqueruptur die initialen Auslöser beim ACS (30). Durch die rupturierte Plaque werden Matrixproteine, insbesondere Kollagen, freigelegt, dem Blutstrom ausgesetzt und schnell durch eine Schicht aktivierter Thrombozyten bedeckt (67). GPVI als der wichtigste Kollagenrezeptor vermittelt Thrombozytenadhäsion und –aktivierung an fibrillärem Kollagen (48,49,56). Die Expression von GPVI ist auf das megakaryozytäre System begrenzt und daher Thrombozyten-spezifisch (56).

Die aktuelle Datenlage hinsichtlich Veränderungen der GPVI Expression auf zirkulierenden Thrombozyten ist begrenzt. Insbesondere genetische Faktoren scheinen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung koronarer Thrombosen und Myokardinfarkte zu spielen, wie eine Studie über GPVI Polymorphismen zeigt (59). Die dieser Arbeit zugrunde liegende Patientenkohorte wurde nicht auf GPVI-Polymorphismen untersucht, dennoch ist davon auszugehen, dass GPVI Polymorphismen unabhängig von der GPVI Expression zum Risiko der Entwicklung eines koronaren Ereignisses signifikant beitragen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein spezifischer FITC-konjugierter monoklonaler anti-GPVI Antikörper benutzt, der eigens für die durchflusszytometrische Analyse entwickelt worden war (15). Die Auswertung der GPVI-Expressionswerte unserer konsekutiven Patientenkohorte mit symptomatischer koronarer Herzerkrankung zeigte eine Erhöhung der thrombozytären Oberflächenexpression von GPVI bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom und akutem Myokardinfarkt im Vergleich zu Patienten mit stabiler Angina pectoris. Darüber hinaus zeigte sich, dass die GPVI-Expressionswerte, welche bei Krankenhausaufnahme bestimmt wurden, unabhängig von Labormarkern myokardialer Nekrose wie Troponin oder Kreatinkinase mit dem akuten Koronarsyndrom assoziiert sind. Diese Ergebnisse bestärken die Annahme, dass es beim akuten Koronarsyndrom zur Thrombozytenaktivierung kommt und dass diese für die Progredienz der Erkrankung von entscheidender Bedeutung ist. Zudem wurde durch diese Ergebnisse der Nachweis erbracht, dass GPVI als Thrombozyten-

spezifischer Aktivierungsmarker eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie des akuten Koronarsyndroms spielt (GPVI/Kollagen Interaktion) und einen vielversprechenden Kandidaten für einen Biomarker darstellt, der für die Risikostratifizierung von Patienten, die mit einem akuten Koronarsyndrom vorstellig werden, von Nutzen ist. Die Bestimmung erhöhter GPVI-Expressionswerte könnte einen prothrombotischen Status bei Patienten anzeigen, bei denen sich ein akutes Koronarsyndrom entwickelt und damit als ein frühzeitiger Biomarker einer drohenden Myokardischämie dienen. Insbesondere die Feststellung, dass bereits Patienten mit Tn<sup>+</sup>ACS erhöhte GPVI-Expressionswerte aufweisen, kann in Zukunft von hohem diagnostischem und therapeutischem Nutzen sein. Der Nachweis prothrombotischer Aktivität durch erhöhte GPVI-Expressionswerte dürfte zukünftig als Indikation für eine forcierte antikoagulatorische oder antiaggregatorische Therapie dienen und damit nützlich für die Verhinderung von Myokardinfarkten sein. Neben der bis dato gängigen antikoagulatorischen Therapie mit Substanzen wie Heparin oder Marcumar beziehungsweise der Therapie mit Thrombozytenaggregationshemmern wie Acetylsalicylsäure (ASS) oder Clopidogrel stellt auch GPVI selbst ein adäquates Ziel für Prävention kardialer Ereignisse dar.

Ein denkbarer Therapieansatz wäre die gezielte Blockade von GPVI bei einem Nachweis prothrombotischer Aktivität. Die aktuelle Datenlage umfasst dabei mehrere Ansätze. Vielversprechend erscheint unter diesen die Inhibition von Calmodulin zu sein. Calmodulin bindet direkt an das zytoplasmatische Ende von GPVI und scheint eine wichtige Rolle für die Signaltransduktion von GPVI zu spielen (26,4,27). Die Inkubation von Thrombozyten mit dem Calmodulin-Inhibitor W7 führte zu einem zeitabhängigen Verlust von GPVI auf der Thrombozytenoberfläche (26). Im Mausversuch erwies sich ein Verlust von GPVI von der Thrombozytenoberfläche, hervorgerufen durch Behandlung der Thrombozyten mit dem monoklonalen anti-GPVI Rattenantikörper „JAQ1“ (54), als protektiv gegen thromboembolische Ereignisse (55).

Eine weitere Möglichkeit könnte zukünftig die lokale Applikation des löslichen dimerischen Fusionsproteins von GPVI, GPVI-Fc, sein. Im Maus- und Kaninchenversuch wurde GPVI-Fc über einen speziellen Medikamenten-zuführenden Doppel-Ballonkatheter am Ort einer Endothelläsion appliziert. Die Thrombusbildung in der Umgebung der verletzten A. carotis wurde mittels eines Computer-gestützten

Bildanalyse systems quantifiziert. Die lokale Applikation von rekombinanten GPVI-Fc führte zu einer reduzierten Thrombusbildung (14).

Zu beachten ist jedoch, dass eine anti-GPVI-Therapie zu einer beeinträchtigten Hämostase bei Patienten mit erniedrigten  $\alpha 2\beta 1$ -Spiegeln oder mit einer begleitenden ASS-Therapie führen könnte.

## **5.2 Oberflächenexpression von GPVI bei kardialen Risikofaktoren**

Zwischen der thrombozytären Oberflächenexpression des Kollagenrezeptors GPVI und den kardiovaskulären Risikofaktoren arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie, Diabetes mellitus, positive Familienanamnese sowie Nikotinabusus konnte in der vorliegenden Arbeit keine Korrelation gezeigt werden.

Dieses Ergebnis ist nicht verwunderlich, spricht es doch für einen zweizeitigen Prozess in der Entstehung eines akuten Koronarsyndroms. Die Bildung atherosklerotischer Plaques bildet dabei die Grundlage für das Auftreten eines akuten Koronarsyndroms. Erst die GPVI-Kollagenbindung bei Plaqueruptur führt zur Thrombusbildung und damit zum Auftreten eines akuten Koronarsyndroms. Zu diesem Zeitpunkt ist die Plaquebildung jedoch bereits abgeschlossen, daher ist ein direkter Zusammenhang zwischen GPVI-Expressionswerten und kardiovaskulären Risikofaktoren nicht zu erwarten. Der Anstieg der GPVI-Expressionswerte erklärt sich ferner durch die Thrombozytenaktivierung: GPVI wird kontinuierlich auf der Thrombozytenoberfläche exprimiert, nach Plättchenaktivierung werden Freisetzungsrates und Plasmamembranexpression deutlich erhöht (15,56). Ein direkter Zusammenhang zwischen Plättchenaktivierung und kardiovaskulären Risikofaktoren ist nicht bekannt.

Dieses Ergebnis lässt den Umkehrschluss zu, dass die bekannten kardiovaskulären Risikofaktoren keine Risikofaktoren für erhöhte GPVI-Expressionswerte darstellen. Vielmehr kommt als Risikofaktor für erhöhte GPVI-Expressionswerte ein genetischer Polymorphismus von GPVI in Frage. Ollikainen et al. konnten zeigen, dass ein Polymorphismus im T13254C Gen von GPVI mit einem erhöhten Risiko eines Myokardinfarktes assoziiert ist (59).

Ferner konnte in der hier vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass GPVI-Expressionswerte in der Akutphase nicht mit konventionellen Markern für Myokardischämie (initiales Troponin I und initiale CK) korrelieren, wohl aber mit den im Verlauf des Krankenhausaufenthaltes bestimmten Maximalwerten jener Myokardischämie-Marker (maximales Troponin I und maximale CK).

Auch dieses Ergebnis war ein zu Erwartendes, ist doch die Thrombusbildung die unabdingbare Voraussetzung für Myokardischämie, unabhängig von anderen Ursachen für eine koronare Herzkrankheit wie systemische oder primäre Vaskulitiden, Koronarspasmen, Dissektionen der Koronarienwand oder Embolien. Ohne die Aktivierung von GPVI und der daraus resultierenden Thrombusbildung kann es nicht zu einer Myokardischämie kommen.

Die Korrelation zwischen GPVI-Expressionswerten und den maximalen Werten dieser beiden Myokardischämie-Marker lässt sich ebenfalls leicht erklären: Je größer der Thrombus (gemessen an der GPVI-Expression) umso fataler das Resultat für die Sauerstoffversorgung des Myokards (gemessen an der Ausdehnung der Myokardnekrose), je größer die Nekrosefläche des Myokards umso mehr Freisetzung von Troponin I und CK aus den nekrotischen Kardiomyozyten.

Frühere Arbeiten konnten zeigen, dass weitere Biomarker wie C-rP (47), löslicher CD40 Ligand (CD40L) (35), Myeloperoxidase (7), Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) (41), Pregnancy-associated Plasma Protein-A (PAPP-A) (34), Brain Natriuretic Peptide (BNP) (20) und Placental Growth Factor (PGF) (33) mit der Prognose eines akuten Koronarsyndroms assoziiert sind.

Eine Korrelation zwischen GPVI-Expressionswerten und initial erhöhten C-rP Werten konnte die vorliegende Arbeit nicht zeigen. Nachdem frühere Studien Grund zur Annahme gaben, dass die C-rP-Erhöhung unabhängig von Myokardnekrosen induziert wird (47), und über einen Zusammenhang mit Ischämie-induzierten Endothelschäden, oxidiertem LDL (66), Immunkomplexen oder gar Reaktivierung von ruhenden Cytomegalievirus- (36) oder Chlamydieninfektionen (46) spekulierten, lässt sich nun feststellen: das Fehlen einer Korrelation unterstreicht die Annahme einer Myokardnekrosen-unabhängigen C-rP-Erhöhung und schließt einen Ischämie-induzierten Endothelschaden als Ursache einer C-rP-Erhöhung weitgehend aus. Somit ist die fehlende Korrelation auch nicht verwunderlich.

Ein Abgleich mit dem Marker für inflammatorische thrombotische Aktivität, CD40L, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt, da das Interesse auf die

Bindung von GPVI an Kollagen als initialem Trigger für die Plättchenaktivierung und –aggregation abzielte (40,52,56). Ohnehin wird CD40L erst nach Plättchenaktivierung von stimulierten Lymphozyten freigesetzt (42,37). Somit scheint GPVI gegenüber CD40L als Biomarker für ein drohendes akutes Koronarsyndrom vom frühzeitlichen Geschehen überlegen zu sein.

Gleiches gilt für die Myeloperoxidase: Das Hämoprotein ist einer der wichtigsten Mediatoren, die polymorphkernige neutrophile Granulozyten in den Koronarien bei Vorliegen eines akuten Koronarsyndroms freisetzen (7,11). Auch hier geht die Plättchenaktivierung durch GPVI der Degranulation polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten voraus. Somit ist GPVI auch der Myeloperoxidase als Biomarker für ein drohendes akutes Koronarsyndrom überlegen.

Auch die Matrix Metalloproteinasen-9 und PAPP-A greifen erst nach Thrombozytenaktivierung in den Pathomechanismus eines akuten Koronarsyndromes ein (41,34). Obwohl sie als Marker für ein ACS (MMP-9) bzw. als Marker eines ungünstigen Verlaufes eines ACS beschrieben wurden, ist aus diesem Grunde auch ihre Aussagekraft im Vergleich zur Aussagekraft erhöhter GPVI-Expressionswerte eingeschränkt.

Das im ventrikulären Myokard synthetisierte Neurohormon Brain Natriuretic Peptide (BNP) zeigt bei akuten Myokardinfarkten im Verlauf der ersten 24 Stunden nach Infarkt einen rapiden Anstieg und hierauf eine Stabilisierung seiner Plasmalevel (6,53,74,51). Die Bestimmung erhöhter BNP-Plasmalevel innerhalb 40 Stunden nach Einsetzen instabiler pektanginöser Beschwerden bzw. nach Eintreten eines NSTEMI ist zudem ein Prädiktor für ein erhöhtes Todesrisiko (20). Dennoch ist auch die Bestimmung erhöhter BNP-Plasmalevel der Bestimmung von GPVI-Expressionswerten hinsichtlich der Vorhersage und damit auch der Risikostratifizierung unterlegen: Der Anstieg der BNP-Plasmalevel erfolgt deutlich nach dem Anstieg der GPVI-Expressionslevel.

Placental Growth Factor (PGF), Mitglied der Familie der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren, ist als prognostischer Marker des klinischen Outcomes von Patienten mit bekanntem ACS oder mit Verdacht auf ein ACS bekannt (33). PGF erscheint allerdings als ein Hauptverursacher für entzündliche Vorgänge bei Vorliegen einer koronaren Läsion (33). Diese Feststellung zeigt, dass auch PGF erst nach GPVI in der Kaskade eines akuten Koronarsyndromes eingreift und somit erhöhten GPVI-Expressionswerten als Biomarker eines ACS ebenfalls unterlegen ist.

## 6 Zusammenfassung

Der thrombozytäre Kollagenrezeptor Glykoprotein VI (GPVI) ist für die Bildung arterieller Thromben entscheidend. Die vorliegende Arbeit basiert auf einer empirischen Studie, in der die Oberflächenexpression von GPVI auf Thrombozyten bei Patienten mit symptomatischer koronarer Herzkrankheit bestimmt wurde.

Zu diesem Zweck wurde eine konsekutive Kohorte von 367 Patienten beurteilt. Alle Patienten wurden mit symptomatischer koronarer Herzkrankheit vorstellig und unterzogen sich einer Koronarangiographie. Die Oberflächenexpression von Markern thrombozytärer Aktivierung (GPVI, CD62P und CD42b) wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Dabei zeigten Patienten mit akutem Koronarsyndrom (ACS) signifikant erhöhte GPVI-Expressionswerte im Vergleich zu Patienten mit stabiler Angina pectoris. Die signifikante Erhöhung der GPVI-Expressionswerte zeigte sich bei allen Untergruppen des ACS (Troponin positives ACS, STEMI, NSTEMI). Die Expression von GPVI korrelierte mit der Expression von P-Selektin. Eine logistische Regressionsanalyse zeigte, dass zum Zeitpunkt der Krankenhausaufnahme erhöhte GPVI-Expressionswerte unabhängig von Markern myokardialer Nekrose (wie Troponin oder Kreatinkinase) mit dem akuten Koronarsyndrom assoziiert sind. Als Ergebnis einer multifaktoriellen Kovarianzanalyse für den dekadischen Logarithmus von GPVI zeigte sich, dass erhöhte GPVI-Expressionswerte nicht mit den bekannten kardiovaskulären Risikofaktoren (arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie, Diabetes mellitus, positive Familienanamnese, Nikotinabusus) korrelieren.

Die thrombozytäre Oberflächenexpression von GPVI ist bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom erhöht und mit drohenden akuten koronaren Ereignissen assoziiert. Die Bestimmung des Blutplättchen-spezifischen thrombotischen Markers GPVI sollte künftig dabei helfen, Risikopatienten zu identifizieren, bevor es zu einer manifesten Myokardischämie kommt.

## 7 Literaturverzeichnis

- (1) Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F.B., Starke, K.  
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie  
ISBN: 3-437-42521-8  
München, Jena: Urban & Fischer; 9. Auflage, 2004
- (2) Anderson, K.M., Wilson, P.W., Odell, P.M., Kannel, W.B. (1991)  
An updated coronary risk profile. A statement for health professionals.  
Circulation, 83, 356-62
- (3) Andrews, R.K., Lopez, J.A., Berndt, M.C. (1997)  
Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation  
Int. J. Biochem. Cell. Biol., 29, 91-105
- (4) Andrews, R.K., Suzuki-Inoue, K., Shen, Y., Tulasne, D., Watson, S.P., Berndt, M.C. (2002)  
Interaction of calmodulin with the cytoplasmatic domain of platelet glycoprotein VI.  
Blood, 99, 4219-4221
- (5) Aouizerat, B.E., Kulkarni, M., Heilbron, D., Drown, D., Raskin, S., Pullinger, C.R., Malloy, M.J., Kane, J.P. (2003)  
Genetic analysis of a polymorphism in the human apoA-V gene: effect on plasma lipids.  
J Lipid Res., 44, 1167-73
- (6) Arakwa, N., Nakamura, M., Aoki, H., Hiramori, K. (1994)  
Relationship between plasma level of brain natriuretic peptide and myocardial infarct size.  
Cardiology, 85, 334-40
- (7) Baldus, S., Heeschen, C., Meinertz, T., Zeiher, A.M., Eiserich, J.P., Münzel, T., Simoons, M.L., Hamm, C.W. (2003)  
Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes.  
Circulation, 108, 1440-5
- (8) Bona K.H., Njolstad I., Ueland P.M., Schirmer H., Tverdal A., Steigen T., Wang H., Nordrehaug J.E., Arnesen E., Rasmussen K. (2006)  
Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction.  
N Engl J Med., 354, 1578-88
- (9) Briddon, S.J., Watson, S.P. (1999)  
Evidence for the involvement of p59fyn and p53/56lyn in collagen receptor signalling in human platelets.  
Biochem. J., 338, 203-209

- (10) Buccellati, C., Ciceri, P., Ballerio R., Casagrande, G., Folco, G., Nicosia, S. (2002)  
Evaluation of the effects of anti-thromboxane agents in platelet-vessel wall Interaction  
Eur J Pharmacol., 443, 133-41
- (11) Buffon, A., Biasucci, L.M., Liuzzo, G., D'Onofrio, G., Crea, F., Maseri, A. (2002)  
Widespread coronary inflammation in unstable angina.  
N Engl J Med, 374, 5-12
- (12) Bigalke, B., Lindemann, S., Ehlers, R., Seizer, P., Daub, K., Langer, H., Schönberger, T., Kremmer, E., Siegel-Axel, D., May, A., Gawaz, M. (2006)  
Expression of platelet collagen receptor glycoprotein VI is associated with Acute Coronary Syndrome.  
European Heart Journal 2006, 27, 2165-19
- (13) Bigalke, B., Langer, H., Geisler, T., Lindemann, S., Gawaz, M. (2007)  
Platelet glycoprotein VI: a novel marker for acute coronary syndrome.  
Semin Thromb Hemost., 33, 179-84
- (14) Bultmann A., Herdeg C., Li Z., Munch G., Baumgartner C., Langer H., Kremmer E., Geisler T., May A., Ungerer M., Gawaz M. (2006)  
Local delivery of soluble platelet collagen receptor glycoprotein VI inhibits thrombus formation in vivo.  
Thromb Hemost., 95, 763-6
- (15) Cabeza, N., Li, Z., Schulz, C., Kremmer, E., Massberg, S., Bultmann, A., Gawaz, M. (2004)  
Surface expression of collagen receptor Fc receptor-gamma/glycoprotein VI is enhanced on platelets in type 2 diabetes and mediates release of CD40 ligand and activation of endothelial cells.  
Diabetes, 53, 2117-2121
- (16) Canobbio, I., Balduini, C., Torti, M. (2004)  
Signalling through the platelet glycoprotein Ib-V-IX complex.  
Cell Signal., 16, 1329-44
- (17) Clementson, K.J., McGregor, J.L., James, E., Dechavanne, M., Luscher, E.F. (1982)  
Characterization of the platelet membrane glycoprotein abnormalities in Bernard-Soulier syndrome and comparison with normal by surface-labeling techniques and high-resolution two-dimensional gel electrophoresis.  
J Clin Invest., 70, 304-311
- (18) Colman, R.W., Hirsch, J., Mader, V.J., Salzman, E.W. (1982)  
Hemostasis and Thrombosis.  
Philadelphia: Lippincott Co

- (19) Cosemans, J.M., Kuijpers, M.J., Lecut, C., Loubale, S.T., Heeneman, S., Jandrot-Perrus, M., Heemskerk, J.W. (2005)  
Contribution of platelet glycoprotein VI to the thrombogenic effect of collagens in fibrous atherosclerotic lesions.  
*Atherosclerosis.*, 181, 19-27
- (20) de Lemos, J.A., Morrow, D.A., Bentley, J.H., Omland, T., Sabatine, M.S., McCabe, C.H., Hall, C., Cannon, C.P., Braunwald, E. (2001)  
The prognostic value of B-type natriuretic peptide in patients with acute coronary syndromes.  
*N Engl J Med*, 345, 1014-21
- (21) Ezumi, Y., Shindoh, K., Tsuji, M., Takayama, H. (1998)  
Physical and functional association of the Src family kinases Fyn and Lyn with the collagen receptor glycoprotein VI-Fc receptor gamma chain complex on human platelets.  
*J Exp Med.*, 188, 267-276
- (22) Faria-Neto, J.R., Chagas, A.C., Bydlowski, S.P., Lemos Neto, P.A., Chamone, D.A., Ramirez, J.A., da Luz, P.L. (2006)  
Hyperhomocystinemia in patients with coronary artery disease.  
*Braz J Med Biol Res.*, 39, 455-63
- (23) Findlay, I.N., Cunningham, A.D. (2005)  
Definition of acute coronary syndrome.  
*Heart.*, 91, 857-9
- (24) Fujiwara, K. (2006)  
Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 and mechanotransduction in vascular endothelial cells.  
*J Intern Med.*, 259, 373-80
- (25) Furie, B., Furie, B.C. (1992)  
Molecular and cellular biology of blood coagulation.  
*N Engl J Med.*, 326, 800-6
- (26) Gardiner, E.E., Arthur, J.F., Kahn, M.L., Berndt, M.C., Andrews, R.K. (2004)  
Regulation of platelet membrane levels of glycoprotein VI by a platelet-derived metalloproteinase.  
*Blood.*, 104, 3611-7
- (27) Gardiner, E.E, Arthur, J.F., Berndt, M.C., Andrews, R.K. (2005)  
Role of calmodulin in platelet receptor function.  
*Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents.*, 3, 283-7
- (28) Gawaz, M. (2001)  
*Blood Platelets: Physiology, Pathophysiology, Membrane Receptors, Antiplatelet Principles, and Therapy for Arterothrombotic Diseases.*  
ISBN 3-13-105811-0  
Stuttgart; New York: Thieme

- (29) Gawaz, M. (2004)  
Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion in ischemic myocardium.  
Cardiovasc Res 2004, 61, 498-511
- (30) Gawaz, M., Langer, H., May, A.E. (2005)  
Platelets in inflammation and atherogenesis.  
J Clin Invest., 115, 3378-84
- (31) Gawaz, M., Neumann, F.J., Schömig, A. (1999)  
Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease: consequences for diagnosis and therapy.  
Circulation, 99, E1-E11
- (32) Gibbins, J.M. (2004)  
Platelet adhesion signalling and the regulation of thrombus formation.  
J Cell Sci., 117, 3415-25
- (33) Heeschen, C., Dimmeler, S., Fichtlscherer, S., Hamm, C.W., Berger, J., Simoons, M.L., Zeiher, A.M. (2004)  
Prognostic value of placental growth factor in patients with acute chest pain.  
JAMA, 291, 435-41
- (34) Heeschen, C., Dimmeler, S., Hamm, C.W., Fichtlscherer, S., Simoons, M.L., Zeiher, A.M. (2005)  
Pregnancy-associated plasma protein-A levels in patients with acute coronary syndromes: comparison with markers of systemic inflammation, platelet activation, and myocardial necrosis.  
J Am Coll Cardiol, 45, 229-37
- (35) Heeschen, C., Dimmeler, S., Hamm, C.W., van den Brand, M.J., Boersma, E., Zeiher, A.M., Simoons, M.L. (2003)  
Soluble CD40 Ligand in Acute Coronary Syndromes.  
N Engl J Med, 348, 1104-11
- (36) Hendrix M.G.R., Daemen, M., Bruggeman, C.A. (1991)  
Cytomegalovirus nucleic acid distribution within the human vascular tree.  
Am J Pathol, 138, 563-67
- (37) Henn, V., Steinbach, S., Büchner, K., Presek, P., Kroczeck, R.A. (2001)  
The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40.  
Blood, 98, 1047-54
- (38) Jain, A., Wadehra, V., Timmis, A.D. (2003)  
Management of stable angina.  
Postgrad Med J., 79, 332-6

- (39) Jandrot-Perrus, M., Busfield, S., Lagrue, A.H., Xiong, X., Debili, N., Chickering, T., Le Couedic, J.P., Goodearl, A., Dussault, B., Fraser, C., Vainchenker, W., Villeval, J.L. (2000)  
Cloning, characterization, and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the immunoglobulin superfamily.  
*Blood.*, 96, 1798-1807
- (40) Kahn, M.L. (2004)  
Platelet-collagen responses: molecular basis and therapeutic promise.  
*Semin Thromb Hemost*, 30, 419-425
- (41) Kai, H., Ikeda, H., Yasukawa, H., Kai, M., Seki, Y., Kuwahara, F., Ueno, T., Sugi, K., Imaizumi, T. (1998)  
Peripheral blood levels of matrix metalloproteinases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes.  
*J Am Coll Cardiol*, 32, 368-72
- (42) Lee, Y., Lee, W.H., Lee, S.C., Ahn, K.J., Choi, Y.H., Park, S.W., Seo, J.D., Park, J.E. (1999)  
CD40L activation in circulating platelets in patients with acute coronary syndromes.  
*Cardiology*, 92, 11-6
- (43) Lindemann S., Tolley N.D., Dixon D.A., McIntyre T.M., Prescott S.M., Zimmerman G.A., Weyrich A.S. (2001)  
Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis.  
*J Cell Biol*, 154, 485-490
- (44) Lindemann, S., Tolley, N.D., Eyre, J.R., Kraiss L.W., Mahoney T.M., Weyrich A.S. (2001)  
Integrins regulate the intracellular distribution of eukaryotic initiation factor 4E in platelets. A checkpoint for translational control.  
*J Biol Chem*, 276, 33947-33951
- (45) Lindemann, S., Weyrich, A.S., Zimmermann, G.A. (2005)  
Signaling to translational control pathways: diversity in gene regulation in inflammatory and vascular cells.  
*Trends Cardiovasc Med*, 19, 9-17
- (46) Linnanmaki, E., Leinonen, M., Mattila, K., Nieminen, M.S., Valtonen, V., Saikku, P. (1993)  
Chlamydia pneumoniae-specific circulating immune complexes in patients with chronic coronary heart disease.  
*Circulation*, 87, 1130-34

- (47) Liuzzo, G., Biasucci, L.M., Gallimore, J.R., Grillo, R.L., Rebuffi, A.G., Pepys, M.B., Maseri, A. (1994)  
The Prognostic Value of C-Reactive Protein and Serum Amyloid A Protein in Severe Unstable Angina.  
N Engl J Med., 331, 417-24
- (48) Massberg, S., Gawaz, M., Gruner, S., Schulte, V., Konrad, I., Zohlnhofer, D., Heinzmann, U., Nieswandt, B. (2003)  
A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo.  
J Exp Med., 197, 41-49
- (49) Massberg, S., Konrad, I., Bultmann A., Schulz, C., Munch, G., Peluso, M., Lorenz, M., Schneider, S., Besta, F., Muller, I., Hu, B., Langer, H., Kremmer, E., Rudelius, M., Heinzmann, U., Ungerer, M., Gawaz, M. (2004)  
Soluble glycoprotein VI dimer inhibits platelet adhesion and aggregation to the injured vessel wall in vivo.  
Faseb J., 18, 397-99
- (50) Mathieu P., Pibarot P., Despres J.P. (2006)  
Metabolic syndrome: the danger signal in atherosclerosis.  
Vasc Health Risk Manag., 2, 285-302
- (51) Morita, E., Yasue, H., Yoshimura, M., Ogawa, H., Jougasaki, M., Matsumura, T., Mukoyama, M., Nakao, K. (1993)  
Increased plasma levels of brain natriuretic peptide in patients with acute myocardial infarction.  
Circulation, 88, 82-91
- (52) Moroi, M., Jung, S.M. (2004)  
Platelet glycoprotein VI: its structure and function.  
Thromb Res; 114, 221-233
- (53) Motwani, J.G., McAlpine, H., Kennedy, N., Struthers, A.D. (1993)  
Plasma brain natriuretic peptide as an indicator for angiotensin-converting-enzyme inhibition after myocardial infarction.  
Lancet, 341, 1109-13
- (54) Nieswandt, B., Bergmeier, W., Schulte, V., Rackebrandt, K., Gessner, J.E., Zirngibl, H. (2000)  
Expression and function of the mouse collagen receptor glycoprotein VI is strictly dependent on its association with the FcR  $\gamma$  chain.  
J Biol Chem., 275, 23998-24002
- (55) Nieswandt, B., Schulte, V., Bergmeier, W., (2001)  
Long-term antithrombotic protection by in vivo depletion of platelet glycoprotein VI in mice.  
J Exp Med., 193, 459-470

- (56) Nieswandt, B., Watson, S.P. (2003)  
Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor?  
*Blood*, 102, 449-61
- (57) Nurden, A. (1994)  
Human platelet glycoproteins.  
In "Hemostasis and Thrombosis",  
Bloom, A., Forbes, C.D. eds.,  
New York-Churchill Livingstone, 3<sup>rd</sup> edn., 259-285
- (58) O'Leary, D., Polak, J., Kronmal, R., Manolio, T., Burke, G., Wolfson, S. (1999)  
Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial  
infarction and stroke in older adults.  
*N Engl J Med.*, 340, 14-22
- (59) Ollikainen, E., Mikkelsen, J., Perola, M., Penttila, A., Karhunen, P.J. (2004)  
Platelet membrane collagen receptor glycoprotein VI polymorphism is  
associated with coronary thrombosis and fatal myocardial infarction in middle-  
age men.  
*Atherosclerosis*, 176, 95-9
- (60) Oppenheimer, G.M. (2005)  
Becoming the Framingham Study 1947-1950.  
*J Public Health*, 95, 602-610
- (61) Oury, C., Toth-Zsomboki, E., Vermeylen, J., Hoylaerts, M.F. (2006)  
The platelet ATP and ADP receptors.  
*Curr Pharm Des.*, 12, 859-75
- (62) Panteghini, M. (2004)  
Role and importance of biochemical markers in clinical cardiology.  
*Eur Heart J.*, 25, 1187-96
- (63) Paoli, G., Mantovani, P., Ardissino, D. (2005)  
Pathogenesis of acute coronary syndromes: the activated plaque.  
*Ital Heart J.*, 6, 5S-11S
- (64) Penz, S., Reininger, A.J., Brandl, R., Goyal, P., Rabie, T., Bernlochner, I.,  
Rother, E., Goetz, C., Engelmann, B., Smethurst, P.A., Ouweland, W.H.,  
Farndale, R., Nieswandt, B., Siess, W. (2005)  
Human atheromatous plaques stimulate thrombus formation by activating  
platelet glycoprotein VI.  
*FASEB J*, 19, 898-909
- (65) Quek, L.S., Pasquet, J.M., Hers, I., Cornall, R., Knight, G., Barnes, M., Hibbs,  
M.L., Dunn, A.R., Lowell, C.A., Watson, S.P. (2000)  
Fyn and Lyn phosphorylate the Fc receptor gamma chain downstream of  
glycoprotein VI in murine platelets, and Lyn regulates a novel feedback  
pathway.  
*Blood*, 96, 4246-53

- (66) Quinn, M.T., Parthasarathy, S., Fong, L.G., Steinberg, D. (1987)  
Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis.  
Proc Natl Acad Sci USA, 84, 2995-98
- (67) Ruggeri, Z.M. (2002)  
Platelets in artherothrombosis.  
Nat. Med., 8, 1227-1234
- (68) Samaha F.F., Hibbard C., Sacks J., Chen, H., Varello, M.A., George, T., Kahn, M.L. (2005)  
Density of platelet collagen receptors glycoprotein VI and alpha2beta1 and prior myocardial infarction in human subjects, a pilot study.  
Med Sci Monit, 11, CR224-229.
- (69) Savage, B., Almus-Jacobs, F., Ruggieri, Z.M. (1998)  
Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow.  
Cell., 94, 657-66
- (70) Siess, W. (1989)  
Molecular mechanisms of platelet activation.  
Physiol Rev, 69, 50-178
- (71) Smith, J.B., Araki, H., Lefer, A.M. (1980)  
Thromboxane A2, prostacyclin and aspirin: effects on vascular tone and platelet aggregation.  
Circulation, 62, V19-25
- (72) Sulfi, S., Timmis, A.D. (2006)  
Ivabradine – the first selective sinus node I(f) channel inhibitor in the treatment of stable angina.  
Int J Clin Pract., 60, 222-8
- (73) Suzuki-Inoue, K., Tulasne, D., Shen, Y., Bori-Sanz, T., Inoue, O., Jung, S.M., Moroi, M., Andrews, R.K., Berndt, M.C., Watson, S.P. (2002)  
Association of Fyn and Lyn with the proline-rich domain of glycoprotein VI regulates intracellular signaling.  
J. Biol. Chem., 277, 21561-21566
- (74) Talwar, S., Squire, I.B., Downie, P.F., Mccullough, A.M., Campton, M.C., Davies, J.E., Barnett, D.B., Ng, L.L. (2000)  
Profile of plasma N-terminal proBNP following acute myocardial infarction; correlation with left ventricular systolic dysfunction.  
Eur Heart J, 21, 1514-21
- (75) Wilson, W.F., D'Agostino, R.B., Levy, D., Belanger, A.M., Silbershatz, H., Kannel, W.B. (1998)  
Prediction of coronary heart disease using risk factor categories.  
Circulation, 97, 1837-47

## **8 Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. M. Gawaz und Herrn Privatdozent Dr. med. A.E. May möchte ich sehr für die Überlassung dieses interessanten und klinisch relevanten Themas sowie für den ständigen Anspruch, gute Ergebnisse zu erhalten, danken.

Mein besonderer Dank gilt meinem unmittelbaren Betreuer, Dr. med. Boris Bigalke, der zu jeder Zeit für Fragen und Anregungen zur Verfügung stand und der durch seine stets freundliche und verständnisvolle Art wesentlich zum Gelingen der Doktorarbeit beigetragen hat.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei der Laborassistentin Heike Runge und der Diplombiologin Iris Schäfer für die jederzeit freundliche und kompetente Unterstützung bei der Arbeit im Labor bedanken.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, deren Unterstützung ich mir zu jedem Zeitpunkt meiner Ausbildung sicher sein konnte und ohne welche eine Doktorarbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wäre.

## 9 Lebenslauf

### Zur Person

Felix Wilhelm Arnaud Waibel,

geboren am 20.04.1982 in Freiburg i.Br.

Familienstand: ledig

Geschwister:

Charlotte Waibel, Realschullehrerin für Deutsch und Musik,

Lorenz Waibel, Student der Humanmedizin an der Eberhard Karls Universität zu Tübingen,

Vater: Dr. iur. Wolfgang-Wilhelm Waibel, leitender Regierungsdirektor a.D.,

Mutter: Dipl. ing. Erika Waibel, Architektin

### Ausbildung

1988-1992	Vigeliusgrundschule Freiburg
1992-1993	Friedrichgymnasium Freiburg
1993-2001	Bertholdgymnasium Freiburg
	- Allgemeine Hochschulreife am 20.06.2001
09/2001-06/2002	Zivildienst als Pflegehilfskraft in der Abteilung für Innere Medizin des evangelischen Diakoniekrankenhauses Freiburg
09/2002-04/2003	Praktikum an der Staatlichen Schule für Körperbehinderte mit Heim Emmendingen-Wasser
04/2003-10/2009	Studium der Humanmedizin an der Universität Tübingen
	- Ärztliche Vorprüfung am 18.03.2005
	- Erste Famulatur in der Kardiologie / Universitätsklinikum Tübingen (8 Wochen)
	- Zweite Famulatur in der Orthopädie / Loretto Krankenhaus Freiburg (4 Wochen)
	- Dritte Famulatur in der Endokrinologie / Universitätsklinikum Tübingen (4 Wochen)
	- Vierte Famulatur in der Unfallchirurgie (Ambulanz) / Universitätsklinikum Freiburg (4 Wochen)
27.10.2009	Ärztliche Prüfung (2. Staatsexamen)