

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

**Glykoprotein VI – Ein neuer thrombozytärer
Marker im Akuten Koronarsyndrom?**

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

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

**vorgelegt von
Andreas Karl Rolf Schönfeld
aus
Heidelberg
2009**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. May
2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Hofbeck

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Die Rolle von Thrombozyten bei primärer und sekundärer Hämostase	6
1.2	Glykoproteine der Thrombozytenmembran	10
1.3	Aufbau und Funktion des Glykoprotein VI	14
1.3.1	GPVI ist ein bedeutsamer Kollagenrezeptor auf Thrombozyten	17
1.4	Die koronare Herzkrankheit	18
1.5	Thrombozyten und das akute Koronarsyndrom	19
1.6	Laborchemische Marker des akuten Koronarsyndroms	19
1.6.1	Herzenzyme	19
1.6.2	Inflammatorische Marker	20
2	Hintergrund und Zielsetzung dieser Arbeit	22
3	Material und Methodik	24
3.1	Studienpopulation und Auswahlkriterien	24
3.1.1	Kontrollgruppen	25
3.2	Material	26
3.2.1	Monoklonale Antikörper	27
3.2.2	Durchflusszytometrie (FACS)	28
3.3	Analyse der Thrombozyten	31
3.3.1	Probengewinnung	31
3.3.2	Vorbereitung der Blutproben	31
3.3.3	Analyse mittels Durchflusszytometrie	32
3.4	Statistische Analyse	33

4	Ergebnisse	34
4.1	Charakteristika der Studienpopulation	34
4.2	Oberflächenexpression von GPVI auf Thrombozyten	36
4.3	Thrombozytäre GPVI-Expression und Marker der myokardialen Ischämie	40
4.3.1	Korrelation der GPVI-Expression mit Markern der Myokardischämie	40
4.3.2	Unabhängigkeit der GPVI-Expression von Markern der Myokardischämie	44
5	Diskussion	46
5.1	GPVI als früher Marker des akuten Koronarsyndroms	46
5.2	Thrombozytäre GPVI-Expression beim akuten Koronarsyndrom	47
5.3	Die Rolle des löslichen GPVI	49
5.4	Bedeutung für die Diagnostik beim akuten Koronarsyndrom	49
6	Zusammenfassung und Ausblick	52
7	Literaturverzeichnis	53
8	Danksagung	61
9	Lebenslauf	62

1 Einleitung

1.1 Die Rolle von Thrombozyten bei primärer und sekundärer Hämostase

Thrombozyten besitzen ihre Hauptfunktion darin, eine beispielsweise durch eine Schnittverletzung entstandene Blutung auf schnellstmöglichem Wege zum Stillstand zu bringen, um den Blutverlust auf geringstem Niveau zu halten. Dies geschieht im Zusammenspiel mit löslichen Komponenten des Plasmas durch die Bildung eines hämostatischen Thrombus, welcher den Defekt im Gefäß verschließt und dadurch weiteren Blutverlust verhindert. Dabei unterscheidet man den Prozess der primären Hämostase von dem der sekundären Hämostase.

Die primäre Hämostase beinhaltet die Adhäsion, Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten und erreicht durch die Bildung eines thrombozytenreichen, weißen Thrombus eine vorübergehende Blutstillung (18). Der stärkste Trigger für den Ablauf dieser Gerinnungskaskade ist die Beschädigung der Endothelschicht der Gefäßwand und die damit verbundene Freilegung extrazellulärer Matrix (56). Hierbei spielt Kollagen eine herausragende Rolle, da es als Substrat für verschiedene membrangebundene Rezeptoren auf Thrombozyten dient, welche den Adhäsionsprozess einleiten (4). Der erste Kontakt wird durch das Glykoprotein GPIIb-IIIa hergestellt, welches mit kollagengebundenem von-Willebrandt-Faktor (vWF) interagiert (47). Diese Verbindung geschieht sehr rasch, jedoch löst sie sich auch sehr schnell wieder. Vor dem Hintergrund der hohen Scherkräfte in Arteriolen und erkrankten Gefäßen ist diese schnelle Bindung von Thrombozyten an der Gefäßwand entscheidend, durch die umgehende Reversibilität kann jedoch keine stabile Adhäsion erfolgen. Daraus resultiert ein „rolling“ der Thrombozyten entlang der geschädigten Gefäßwand (51). Die hierdurch eingetretene Verlangsamung der Thrombozyten ermöglicht es einem zweiten Glykoprotein, dem Glykoprotein VI (GPVI), direkt mit dem freiliegenden Kollagen des Subendothels zu interagieren

(siehe Abbildung 1 B). Dieser direkte Kontakt vollzieht sich weitaus langsamer, ist aber irreversibel (35). Durch die Bindung von GPVI wechseln die Integrine $\alpha\text{IIb}\beta_3$ und $\alpha_2\beta_1$, weitere wichtige Mediatoren der Blutgerinnung, vom inaktiven in den aktiven Zustand (35). Integrine sind Oberflächenbestandteile fast aller Zellen (23). Im aktiven Zustand binden sie direkt ($\alpha_2\beta_1$), bzw. indirekt über vWF ($\alpha\text{IIb}\beta_3$) an Kollagen. Daher wird ihnen eine wichtige Rolle beim Übergang vom Zustand des „rolling“ in eine stabile Adhäsion zugeschrieben (Abbildung 1 C), wofür die vorhergehende Aktivierung durch GPVI jedoch zwingend erforderlich ist (36).

Die Bindung an freiliegendes Kollagen der verletzten Gefäßwand über den Kollagenrezeptor GPVI führt des Weiteren zu einer Formveränderung und über eine komplexe Signalkaskade (siehe auch 1.3) zur Aktivierung der Thrombozyten (Abbildung 1 D). Einerseits wird hierdurch eine verbesserte Abdichtung des Gefäßwanddefekts erreicht, andererseits setzt der aktivierte Thrombozyt Arachidonsäure frei, welche durch das Enzym Cyclooxygenase zu Thromboxan A₂ umgewandelt wird (18). Dieser Mediator verstärkt den Aktivierungsprozess der Thrombozyten weiterhin und besitzt vasokonstriktive Eigenschaften, wodurch der Blutfluss verlangsamt wird und somit der weiteren Festigung des Thrombus dient (24). Darüber hinaus setzt der aktivierte Thrombozyt granuläre Komponenten wie Adenosindiphosphat (ADP) frei. Hierdurch werden weitere noch ruhende Thrombozyten aktiviert, welche daraufhin mit den schon an der Gefäßwand anhaftenden Thrombozyten aggregieren (Abbildung 1 E). Dies geschieht in Gegenwart von ausreichend Calciumionen (Ca^{2+}) und Fibrinogen durch den GPIIb-IIIa-Komplex, der die Thrombozyten untereinander verbindet (Aggregation). Unter physiologischen Bedingungen enthält das Blutplasma genügend Ca^{2+} sowie Fibrinogen, außerdem sezerniert der aktivierte Thrombozyt hohe Konzentrationen beider Mediatoren. Im Ruhezustand des Thrombozyten kann Fibrinogen nicht an den GPIIb-IIIa-Komplex binden. Ausschließlich im aktivierten Zustand und in Anwesenheit von genügend Ca^{2+} führt diese Interaktion zur Aggregation der Thrombozyten und damit zum Erliegen der Blutung (18).

Letztendlich überleben die anhaftenden Thrombozyten für mehrere Stunden oder sogar Tage an Gefäßläsionen und initiieren durch Lösung von Mikrovesikeln die *de novo* -Proteinsynthese und die Freisetzung von Interleukin-1 β , was zur Erhöhung der entzündlichen Aktivität um den neu gebildeten Thrombus führt (26, 27, 28).

Die sekundäre Hämostase dient dem stabilen Verschluss der Gefäßverletzung und leitet den Heilungsprozess ein. Die aktivierte Thrombozytenoberfläche spielt eine entscheidende Rolle, indem sie über die Expression von Phosphatidylserin die Koagulationskaskade einleitet, an deren Ende die Bildung des Prothrombinase-Komplexes steht. Dieser spaltet proteolytisch Thrombin von Prothrombin ab, welches wiederum Fibrinogen in Fibrin umwandelt. Fibrin vernetzt den anfälligen thrombozytenreichen Thrombus und festigt ihn zu einem fibrinreichen, roten Thrombus (18). Hierdurch wird eine ausreichend stabile Formation des Thrombus erreicht (Abbildung 1 F).

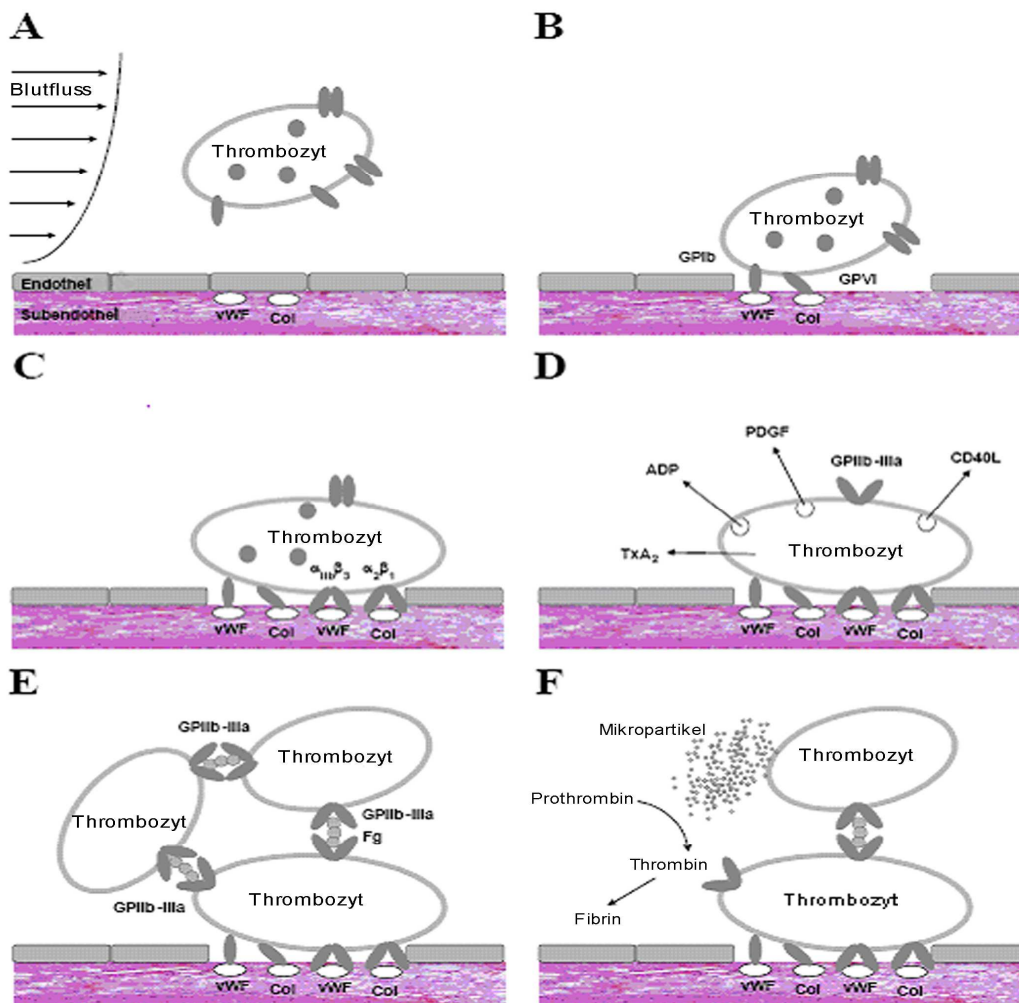


Abbildung 1: Thrombozytenabhängige Thrombusbildung an einer Gefäßwandläsion

Thrombozyten binden unter physiologischen Bedingungen nicht an intaktes Endothel (A). Besteht eine Verletzung, können Thrombozyten über die Kollagenrezeptoren GPIIb/IIIa und GPIIb/IIIa locker an Kollagen binden (B). Dies führt zur Aktivierung des Thrombozyten und der Integrine $\alpha_2\beta_1$ und $\alpha_{IIb}\beta_3$, welche eine stabile Adhäsion ermöglichen (C). Daraufhin verformen sich und degranulieren die Thrombozyten und locken dadurch weitere Thrombozyten an (D). Es bilden sich Mikroaggregate über Fibrinogenbrücken zwischen $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptoren zweier Thrombozyten (E). Die Bildung von Thrombin wird verstärkt angeregt und aus Fibrinogen entsteht Fibrin, welches den Thrombus vernetzt und festigt.

vWF: von-Willebrandt-Faktor; Col: Kollagen; TxA₂: Thromboxan A₂; ADP: Adenosindiphosphat; PDGF: platelet-derived growth factor (Blutplättchen-Wachstumsfaktor); CD40L: CD40-Ligand; Fg: Fibrinogen

(modifiziert nach 19)

1.2 Glykoproteine der Thrombozytenmembran

Der komplexe Prozess der Blutgerinnung erfordert ein enges Zusammenspiel der Thrombozyten untereinander sowie mit ihrer Umgebung. Dabei spielen Rezeptoren der Thrombozytenmembran eine entscheidende Rolle. Über diese Glykoproteine interagieren die Thrombozyten miteinander, sowie mit der subendothelialen Matrix (vWF - Rezeptor, Kollagenrezeptoren), mit plasmatischen Gerinnungsfaktoren (vWF - Rezeptor), und mit endothelialen Zellen (GPIIb-IIIa) oder Leukozyten (P-Selektin) (18).

Glykoproteine der Thrombozytenmembran werden gemäß ihrer charakteristischen Molekularstruktur in verschiedene Gruppen eingeteilt: Integrine, leucinreiche Glykoproteine, Selektine, Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren und lysosomale integrale Membranproteine (25) (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Glykoproteine der Thrombozytenoberfläche

Fb: Fibrinogen; Fn: Fibronektin; Vn: Vitronektin; vWF: von-Willebrand-Faktor; ICAM-2: Intercellular adhesion molecule-2; PECAM-1: Platelet endothelial cell adhesion molecule-1; PSGL-1: P-selectin glycoprotein ligand-1; LFA-1: Lymphocyte function associated antigen-1; GPVI: Glykoprotein VI

(modifiziert nach 18)

Klassifizierung	Elektrophoretische Klassifizierung	CD-Nomenklatur	Rezeptorzahl pro Plättchen	Ligandenspezifität
Integrine				
$\alpha_2\beta_1$	GPIa-IIa	CD49b	1000	Kollagen
$\alpha_5\beta_1$	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
Leucin-reiche Glykoproteine				
--	GPIb-V-IX	CD42a-b-c	25.000	vWF, Thrombin
--	GPIV (GPIIIb)	CD36	15.000-25.000	Kollagen, Thrombospondin
Selektine				
--	P-Selektin	CD62P	12.000	PSGL-1
Immunglobulin-ähnliche Adhäsionsrezeptoren				
--	ICAM-2	CD102	5000	LFA-1
--	PECAM-1	CD31	3000	
--	GPVI		3700	Kollagen
Lysosomale integrale Membranproteine				
--	GP53	CD63	3000	

Integrine sind Adhäsionsrezeptoren, die Strukturen des Zytoskeletts mit der extrazellulären Matrix verbinden. Sie werden auf fast allen Zellen gefunden (23). Integrine bestehen aus einer α - und aus einer β -Untereinheit, wobei sie auf Basis der β -Kette unterteilt werden, welche sich mit einer spezifischen α -Kette zu einem funktionellen Rezeptor verbindet (18). Integrine treten mit zahlreichen Glykoproteinen in Kontakt (z. B. Kollagen, Fibronectin, Fibrinogen, Laminin, Thrombospondin, Vitronectin, vWF) (23). Die Bindungskapazität wird dabei über Veränderung des Affinitätszustandes durch intrazelluläre oder extrazelluläre Signale reguliert. Bisher wurden fünf verschiedene Integrine auf Thrombozyten 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 ($\alpha 11\beta 3$, Fibrinogenrezeptor; $\alpha V\beta 3$, Vitronectinrezeptor) (37).

Thrombozyten enthalten zwei leucinreiche Glykoproteinkomplexe auf ihrer Membran, GPIb-V-IX und GPIV, die durch ihren hohen Gehalt an der Aminosäure Leucin charakterisiert sind (10). Das Glykoprotein GPIb-V-IX spielt eine entscheidende Rolle bei der primären Hämostase, da es auch bei hohen Scherkräften in den Gefäßen durch kurzzeitige Interaktionen mit dem kollagengebundenen vWF das „rolling“ herbeiführt, welches den ersten Schritt der Thrombusbildung darstellt (51). Der GPIb-V-IX-Komplex besteht aus vier Untereinheiten. GPIb α und GPIb β sind über Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden, wobei jedes GPIb-Molekül ein GPIX-Molekül bindet (18). GPV ist die zentrale Einheit des Rezeptorkomplexes, GPIb α trägt entscheidende Bedeutung für die Funktion des Rezeptors, da hier die Bindungsstelle für vWF und Thrombin liegt (46).

Selektine sind eine Gruppe von Adhäsionsmolekülen, welche im Fall einer Entzündung oder Verletzung eines Gefäßes entscheidend zur Adhäsion von Leukozyten an vaskuläres Endothel beitragen. P-Selektin ist mit einem Gewicht von 140 kDa das größte Molekül der Gruppe. Es ist Bestandteil der Membran der thrombozytären α -Granula sowie der endothelialen Weibel-Palade-Körperchen (6). Die Molekularstruktur ist wie bei den anderen Selektinen charakterisiert durch eine

extrazelluläre Lektin-Domäne und einer Struktur ähnlich dem epidermalen Wachstumsfaktor (epidermal growth factor, EGF), gefolgt von kurzen Regionen, die den regulatorischen Komplementfaktoren entsprechen, sowie einem transmembranären Teil (6, 18) (siehe Abbildung 2).



Abbildung 2: Molekularstruktur des P-Selektins

EGF : endothelial growth factor (endothelialer Wachstumsfaktor)

1-9 : regulatorische Regionen

 : transmembranäre Region

(modifiziert nach 6)

Auf ruhenden Thrombozyten wird P-Selektin nicht exprimiert (32). Eine stattfindende Aktivierung führt jedoch zu einer raschen Freisetzung und Oberflächenexpression von P-Selektin sowohl bei Thrombozyten als auch bei Endothelzellen (33). Es spielt eine wichtige Rolle bei der sekundären Hämostase und bei Reparaturprozessen der Gefäße. P-Selektin, welches auf Oberflächen von aktiviertem Endothel oder gebundenen Thrombozyten präsentiert wird, unterstützt das Andocken von Leukozyten an den endothelialen Defekt (18) (siehe Abbildung 3). Darüber hinaus induziert P-Selektin Entzündungsreaktionen in Leukozyten (55).

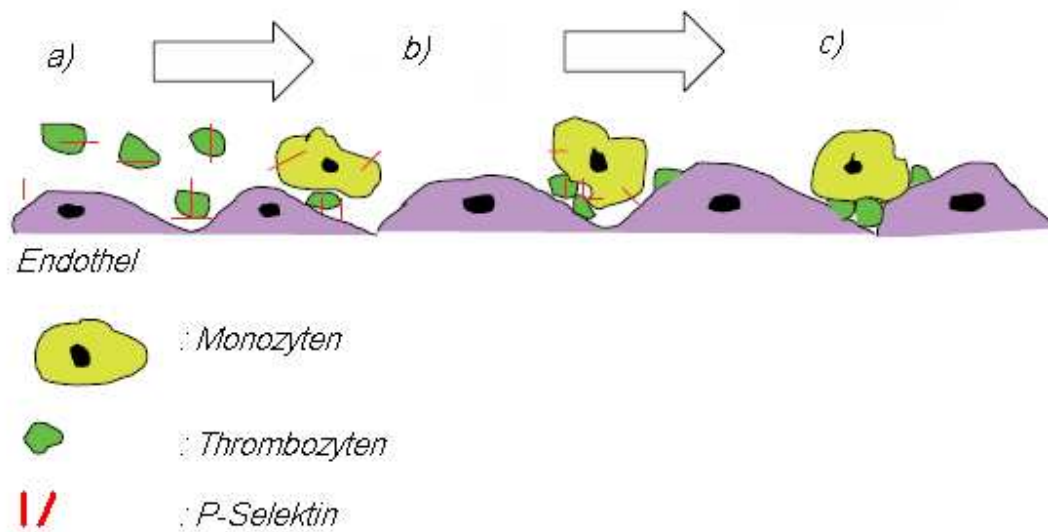


Abbildung 3: Interaktionen zwischen P-Selektin, Thrombozyten, Leukozyten und Atherogenese

- Aktivierung von Thrombozyten mit Expression von P-Selektin auf der Oberfläche und Adhäsion der Thrombozyten auf dem Endothel*
- Vermehrtes „rolling“ von Monozyten und Neutrophilen auf dem Endothel*
- Adhäsion von Monozyten und Neutrophilen auf Thrombozyten und dem Endothel*

(modifiziert nach 6)

1.3 Aufbau und Funktion von GPVI

GPVI wurde zum ersten Mal 1982 erkannt, als Clemetson et al. die Thrombozyten dreier Patienten mit Bernard-Soulier-Syndrom untersuchte, einer Krankheit mit reduzierter Anhaftung der Thrombozyten an das Subendothel und daraus resultierender, verlängerter Blutungsdauer. In der 2D-Gel-Elektrophorese konnte im Vergleich zu Thrombozyten gesunder Probanden das Fehlen eines 60-65 kDa schweren Glykoproteins nachgewiesen werden (12). Das erste Anzeichen,

dass GPVI ein wichtiger Kollagenrezeptor sein könnte, kam durch Untersuchungen an einer Patientin mit einer Autoimmun-Thrombozytopenie, die durch Autoantikörper gegen ein 65 kDa - Protein verursacht wurde, welches als GPVI identifiziert werden konnte (52).

Im Oktober 1999 gelang es Clemetson et al. das menschliche GPVI zu klonen. Es setzt sich aus 339 Aminosäuren zusammen und hat ein Molekulargewicht von 62 kDa. Menschliches GPVI enthält zwei Immunglobulin-C2-ähnliche extrazelluläre Domänen, die durch Disulfidbrücken verbunden sind, einen Mucin-ähnlichen Stiel, eine transmembranäre Region und einen 51 Aminosäuren langen zytoplasmatischen Schwanz (13) (siehe Abbildung 4).

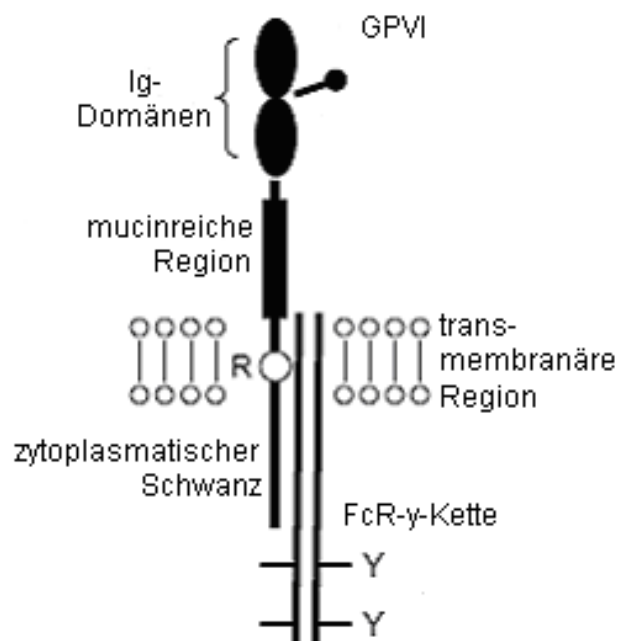


Abbildung 4: Molekularstruktur des GPVI/FcR- γ -Ketten-Komplexes

GPVI enthält zwei Immunglobulin-Domänen, welche an eine mucinreiche Region gebunden sind. Die transmembranäre Region besitzt eine Arginylgruppe, die essentiell ist für die Verbindung mit der FcR- γ -Kette.

*Ig: Immunglobulin; FcR- γ -Kette: Fc-Rezeptor- γ -Kette; R: Arginin; Y: Tyrosin
(modifiziert nach 36)*

In der transmembranären Region besitzt GPVI ein positiv-geladenes Arginin, welches essentiell für die Assoziation mit der Fc-Rezeptor- γ -Kette (FcR- γ -Kette) ist (siehe Abbildung 4) (5, 58). Auch die ersten sechs Aminosäuren nahe der Membran sind unabdingbar für die Interaktion mit der FcR- γ -Kette (7). Der zytosolische Schwanz enthält eine prolinreiche Sequenz, die selektiv die Tyrosinkinasen der Src-Familie bindet, Fyn und Lyn (54). Der zytoplasmatische Teil des GPVI enthält außerdem eine Domäne für die Bindung von Calmodulin (1), welches konstitutiv mit GPVI assoziiert ist, und nach neueren Untersuchungen eine zentrale Rolle bei der Regulation der GPVI-Expression innehat (16, 17).

Die transmembranäre Region und der zytoplasmatische Schwanz treten mit anderen Proteinen zusammen, so z. B. mit verschiedenen Tyrosinkinasen, Calmodulin und vor allem mit der FcR- γ -Kette, die eine entscheidende Rolle bei der Signalübermittlung des Rezeptorkomplexes spielt (5). Aktivierung von GPVI führt zur Phosphorylierung der FcR- γ -Kette durch die Tyrosinkinasen der Src-Familie, Fyn und Lyn (40). Das führt zur Bindung und darauf folgender Aktivierung der Tyrosinkinase Syk, welche eine Signalkaskade einleitet, die in der Aktivierung einiger Effektorenzyme endet, wie PLC γ 2 (Phospholipase-C γ 2), kleinen G-Proteinen und der Phosphoinositid-3-Kinase (53).

Der GPVI/FcR- γ -Ketten-Komplex überträgt also Signale über einen Immunglobulin-ähnlichen Mechanismus, an dessen Ende über Aktivierung verschiedener Effektorenzyme die Aktivierung und somit die Freisetzung von granulären Komponenten der Thrombozyten steht (3).

Neben der thrombozytären, membrangebundenen 62 kDa –Form existiert GPVI ebenso als kleinere, lösliche 52 kDa –Form, welche im Plasma zirkuliert (8). Diese Form entsteht durch Abspaltung von Thrombozyten (17).

1.3.1 GPVI ist ein bedeutsamer Kollagenrezeptor auf Thrombozyten

Der GPVI/FcR- γ -Ketten-Komplex ist für den Prozess der Adhäsion und Aggregation von größter Bedeutung. So konnten Massberg et al. zeigen, dass Thrombozyten von Mäusen in Abwesenheit von GPVI keine stabile Adhäsion bei arteriellen Verletzungen aufweisen (30). Auch Goto et al. zeigten, dass bei Thrombozyten zweier Patienten mit fehlendem GPVI keine Adhäsion an Kollagen erfolgt (21). Dies belegen auch Untersuchungen von Nieswandt et al., in denen Thrombozyten von Mäusen mit fehlender FcR- γ -Kette und fehlendem GPVI trotz ausreichendem Vorhandensein der anderen Adhäsionsrezeptoren GPIb-V-IX, α IIb β 3 und α 2 β 1 praktisch keine Adhäsion an Kollagen aufweisen. Diese kann jedoch durch die Zugabe von Agonisten wie ADP und Manganionen (Mn^{2+}), welche Integrine direkt aktivieren, wiederhergestellt werden (35). Damit hat GPVI neben der Rolle als Adhäsionsrezeptor auch elementare Bedeutung für die Signalübermittlung zur Aktivierung weiterer Mediatoren wie der Integrine, die die stabile Adhäsion vermitteln, und nimmt somit eine zentrale Rolle im gesamten Prozess der Blutgerinnung ein.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass auf der Thrombozytenoberfläche mehrere Kollagenrezeptoren exprimiert werden, die bei einer Gefäßverletzung im Zusammenspiel die Adhäsion, Aggregation und die damit verbundene Thrombusbildung erreichen. Bei hohen Scherkräften sorgt der Rezeptorkomplex GPIb-V-IX für die erste Anhaftung der Thrombozyten an die verletzte Gefäßwand, da diese Verbindung sehr schnell zustande kommen kann (47); das Ergebnis ist ein „rolling“ der Thrombozyten (51). In dieser Zeit interagiert GPVI mit dem freiliegenden Kollagen und geht eine irreversible Bindung ein (35). Hierdurch wird eine Signalkaskade initiiert, an deren Ende der Zustandswechsel von einem niedrig- in einen hochaffinen Status der Integrine α 2 β 1 und α IIb β 3 steht, welche eine stabile Adhäsion der Thrombozyten an Kollagen bzw. an kollagengebundenen vWF ermöglichen (35). Dies stimuliert weiterhin die

Signalkaskade des GPVI, was folglich zu weiterer Integrinaktivierung und Freisetzung weiterer Mediatoren führt. Außerdem wird Thromboxan A₂ und ADP freigesetzt, welche einerseits ebenso die Aktivierung der Integrine induzieren und andererseits weitere Thrombozyten aktivieren und die Aggregation vorantreiben.

Hieraus wird die zentrale Rolle des GPVI ersichtlich. Die früher favorisierte sogenannte „two-site, two-step“ –Theorie (49), welche das Integrin $\alpha 2\beta 1$ zum wichtigsten Kollagenrezeptor ernannte, gilt als überholt. Stattdessen löst erst die Bindung von GPVI an Kollagen die Aktivierung der Integrine über eine Signalkaskade aus und ermöglicht somit die feste Anhaftung von Thrombozyten an die extrazelluläre Matrix (35). Dieses neue Modell hebt GPVI als die Substanz hervor, die in jeder relevanten Phase der Thrombusbildung eine entscheidende Rolle spielt.

1.4 Die koronare Herzkrankheit

Unter einer koronaren Herzkrankheit versteht man die atherosklerotisch bedingte Verengung der Koronararterien. Sie bleibt über Jahrzehnte zunächst klinisch asymptomatisch und wird erst klinisch manifest, wenn eine Myokardischämie auftritt. Diese kann vom Patienten als Angina pectoris wahrgenommen werden oder auch asymptomatisch bleiben (11).

Zu Beginn der atherosklerotischen Läsion steht die endotheliale Dysfunktion, die sich über Einlagerungen von Lipiden, Einwanderung von Makrophagen und T-Lymphozyten sowie Migration und Proliferation glatter Muskelzellen in die Gefäßwand zur atherosklerotischen Plaque entwickelt (11).

In der westlichen Welt sind die koronare Herzkrankheit und ihre Folgen die häufigste Todesursache. Allein in Deutschland sterben jedes Jahr etwa 150.000 Patienten an den Folgen der koronaren Herzkrankheit.

1.5 Thrombozyten und das akute Koronarsyndrom

Der Begriff ‚akutes Koronarsyndrom‘ (ACS) umfasst ein Spektrum zwischen der instabilen Angina pectoris über den nicht-transmuralem Myokardinfarkt bis hin zum transmuralen Infarkt.

In Deutschland erleiden etwa 400.000 Menschen pro Jahr einen Myokardinfarkt, etwa ein Drittel der Infarkte verläuft tödlich. Die häufigste Ursache akuter koronarer Syndrome ist die Thrombozytenadhäsion und -aggregation mit Thrombusbildung in der Koronararterie auf dem Boden einer Plaqueruptur. Diese entsteht als Folge eines Risses der Deckplatte einer lipidreichen, entzündlich aktiven artherosklerotischen Gefäßwandveränderung. Das Blut ist damit der extrem gerinnungsaktiven kollagenen Oberfläche ausgesetzt (11). Thrombozyten bilden einen Thrombus und das Gefäß wird verschlossen. Es kommt zur Minderversorgung des Herzgewebes mit Sauerstoff und anschließender Myokardnekrose.

1.6 Laborchemische Marker des akuten Koronarsyndroms

1.6.1 Herzenzyme

Die Labordiagnose ist von entscheidender Bedeutung für die rasche Sicherung der Diagnose eines ACS. Da die kardiale Ischämie die Zellmembran schädigt, werden aus den Myozyten Enzyme in die Blutbahn freigesetzt, die als Indikatoren für die Schädigung dienen (11).

Etwa zwei Stunden nach Beginn der Ischämie werden im Serum Troponin-I und -T (Tn-I, Tn-T) nachweisbar. Der Labortest ist hochspezifisch und weist, falls positiv, fast immer auf eine Ischämie des Herzmuskels hin.

Die Kreatinkinase (CK) wird etwa vier Stunden nach Ischämiebeginn nachweisbar. Da das Enzym auch Bestandteil der Skelettmuskulatur ist, muss das spezifische kardiale Isoenzym Kreatinkinase-MB (CKMB) mitbestimmt werden. Macht deren Aktivität mehr als sechs Prozent der Gesamt-CK-Aktivität aus, so ist eine kardiale Ursache wahrscheinlich.

Ein weiterer Parameter ist das Myoglobin, welches hochspezifisch ist und erstmals zwei bis vier Stunden nach Ischämiebeginn nachweisbar ist (11).

Die aufgeführten Laborparameter haben gemeinsam, dass sie im Falle eines akuten Koronarsyndroms alle bereits Ausdruck der stattfindenden Myokardnekrose sind.

1.6.2 Inflammatorische Marker

Entzündliche Aktivität spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung, dem Fortschreiten und der Destabilisierung einer atherosklerotischen Plaque sowie bei der Entwicklung eines akuten Koronarsyndroms (45). Aufgrund dieser Erkenntnis könnte die Messung inflammatorischer Marker eine bessere Einschätzung des Risikos für die Entwicklung eines ACS ermöglichen.

Das C-reaktive Protein (CRP) wird in der Leber gebildet und gehört zu den Akute-Phase-Proteinen, welche im Rahmen entzündlicher Erkrankungen ansteigen. Ridker et al. konnten in zahlreichen Studien zeigen, dass ein erhöhtes CRP mit einem erhöhtem Risiko für die Ausbildung eines ACS einhergeht (42, 43, 44).

Ridker et al. untersuchten auch die Rolle des Adhäsionsmoleküls P-Selektin, das auf aktivierten Thrombozyten exprimiert wird (siehe auch 1.2). In einer Follow-

Up-Studie waren die P-Selektin-Werte bei Frauen, welche anschließend ein kardiovaskuläres Ereignis entwickelten, signifikant höher als bei Frauen, bei denen anschließend kein solches Ereignis auftrat (41).

Des Weiteren ist die Expression von Monozyten-Aktivitätsmarkern, wie z. B. MAC-1 (Monocyte Activation Antigen-1), bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt signifikant gesteigert. Dies könnte im Ischämiegebiet zur vermehrten Adhäsion von Monozyten an Endothel beitragen (34).

CD40-Ligand (CD40L) wird von Thrombozyten exprimiert und bei Aktivierung von diesen freigesetzt. Heeschen et al. konnten demonstrieren, dass CD40L-Werte bei Patienten mit ACS signifikant erhöht sind. Des Weiteren hatten Patienten mit gesteigerten CD40L-Werten ein signifikant erhöhtes Risiko innerhalb von sechs Monaten einen Myokardinfarkt zu erleiden (22).

Auch vermehrte Monozyten-Thrombozyten-Aggregate weisen auf die Entwicklung eines ACS hin. So konnten Sarma et al. zeigen, dass bei einer Gruppe von Patienten, welche sich mit Thoraxschmerzen in der Notaufnahme vorstellten, zirkulierende Monozyten-Thrombozyten-Aggregate bei kardialer Ursache signifikant erhöht waren (50). Furman et al. machten in einer weiteren Studie die wichtige Erkenntnis, dass über die Hälfte der von ihnen untersuchten Patienten mit akutem Myokardinfarkt und bereits erhöhten Monozyten-Thrombozyten-Aggregaten noch normale CKMB-Werte aufwiesen (15). Daher können Monozyten-Thrombozyten-Aggregate als frühzeitige Biomarker beim ACS angesehen werden. Darüber hinaus hebt die Bindung von Thrombozyten und Monozyten beim ACS die Interaktion von Thrombose und Inflammation bei kardiovaskulären Erkrankungen hervor.

All diese Marker haben jedoch gemeinsam, dass sie nicht Thrombozyten-spezifisch sind. Es gibt bisher noch keinen Thrombozyten-spezifischen Marker für die Risikoeinschätzung beim ACS.

2 Hintergrund und Zielsetzung dieser Arbeit

Die koronare Herzkrankheit und das daraus resultierende akute Koronarsyndrom sind die häufigste Todesursache der westlichen Welt.

Thrombozyten spielen die Hauptrolle bei der Genese des akuten Koronarsyndroms. Bei Ruptur einer atherosklerotischen Plaque binden die Thrombozyten über Kollagenrezeptoren an das freiliegende Kollagen der extrazellulären Matrix (4). Vermittelt durch Signalkaskaden entsteht eine rasche Okklusion des Gefäßes, die Folge ist ischämischer Untergang des abhängigen Herzgewebes. Hierbei spielt das Thrombozyten-spezifische GPVI eine entscheidende Rolle als Kollagenrezeptor und vor allem auch als zentraler Mediator des gesamten Prozesses (35).

Gegenwärtig erfolgt die Diagnose des akuten Koronarsyndroms über die Anamnese und das klinische Erscheinungsbild, das EKG und über die Laborparameter Kreatinkinase, Kreatinkinase-MB, sowie Troponin-I und -T. Das EKG ist jedoch in etwa 30 % der Fälle nicht richtungsweisend und die Laborparameter werden erst frühestens zwei Stunden nach dem Ereignis positiv und sind, wie Troponin-I und -T, ein Anzeichen des schon stattfindenden Gewebeuntergangs. Daher wäre ein neuer Marker des akuten Koronarsyndroms von immenser Bedeutung für die frühzeitige Diagnose, um umgehend die angemessene Therapie einleiten zu können und damit die Nekrose des myokardialen Gewebes zu verhindern oder zumindest aufzuhalten.

Frühere Untersuchungen ergaben, dass die Expressionsdichte des Kollagenrezeptors GPVI mit dem Bestehen eines Myokardinfarkts zusammenhängen könnte (48). Folglich wäre es möglich, dass eine veränderte GPVI-Expression auf zirkulierenden Thrombozyten auf ein drohendes thrombotisches Ereignis wie z. B. einen Myokardinfarkt hindeutet.

Unsere Studie evaluiert daher die GPVI-Expression auf Thrombozyten in einer großen Anzahl von Patienten mit symptomatischer koronarer Herzkrankheit.

Dementsprechend stellen sich folgende zentrale Fragen:

- a) Ist die GPVI-Expression auf der Thrombozytenoberfläche mit dem Auftreten eines akuten Koronarsyndroms assoziiert?
- b) Wie verhält sich GPVI im Vergleich mit etablierten Markern der myokardialen Ischämie?

3 Material und Methodik

Die Expression der Kollagenrezeptoren GPVI, P-Selektin und GPIIb-IIIa auf der Thrombozytenoberfläche wurde mit Hilfe monoklonaler Antikörper mittels Zweifarben-Vollblut-Durchflusszytometrie festgestellt. Jede Messung wurde zweifach durchgeführt.

3.1 Studienpopulation und Auswahlkriterien

Die untersuchte Studienpopulation enthielt 367 Patienten, die sich im Universitätsklinikum Tübingen mit dem Verdacht auf eine koronare Herzkrankheit (KHK) vorstellten und folglich einer Koronarangiographie unterzogen. Sie wurden konsekutiv in die Studie aufgenommen. Davon besaßen 240 Patienten eine stabile Angina pectoris und 127 ein akutes Koronarsyndrom. Ausschlusskriterien waren Minderjährigkeit (Alter unter 18 Jahren), keine Einverständniserklärung und falsch positive Erhöhung der Laborparameter Kreatinkinase (CK) und Kreatinkinase-MB (CKMB). Dadurch wurden 26 Patienten ausgeschlossen, von denen 19 ihr Einverständnis verweigerten, die sieben verbleibenden fallen unter die anderen Ausschlusskriterien.

Die koronare Herzkrankheit führt zu den Krankheitsbildern der stabilen Angina pectoris (SAP) und des akuten Koronarsyndrom (ACS), welches wiederum in das Troponin-positive ACS (Tn+-ACS), den Nicht-ST-Strecken-Hebungsinfarkt (NSTEMI) und den ST-Strecken-Hebungsinfarkt (STEMI) unterteilt werden kann. Die Einteilung wurde nach folgenden, anerkannten Definitionen vorgenommen:
SAP: Stabile Angina pectoris mit Symptomen bei Belastung, aber ohne Progression und mit gleich bleibender Intensität

ACS: Episoden von Angina pectoris mit Progression über die Zeit über mehr als 20 Minuten oder mit wiederkehrenden Episoden in Ruhe (oder bei minimaler physikalischer Belastung) innerhalb der letzten 24 Stunden

Das Elektrokardiogramm (EKG) zeigt wenigstens eine der folgenden Kriterien in zwei oder mehr Ableitungen:

- a) Neu aufgetretene ST-Strecken-Senkung von mindestens 0,05 mV
- b) Vorübergehende (< 20 Minuten) ST-Strecken-Hebung von mindestens 0,1 mV
- c) Negatives T von mindestens 0,3 mV

Die Laborparameter Kreatinkinase (CK) und Troponin-I (Tn-I) können erhöht, aber auch normal ausfallen. Sind sie erhöht, besteht abhängig von den EKG-Kriterien ein NSTEMI oder ein STEMI.

-NSTEMI: Episoden von Angina pectoris über mehr als 20 Minuten mit folgenden EKG-Kriterien und Laborparametern:

- a) Keine ST-Strecken-Hebung im Standard-EKG
- b) Zweifache Erhöhung der CK verglichen zum Normalwert
- c) Ein erhöhtes Tn-I oder eine signifikante Erhöhung der CKMB

-STEMI: Episoden von Angina pectoris über mehr als 20 Minuten mit folgenden EKG-Kriterien und Laborparametern:

- a) ST-Strecken-Hebung von mindestens 0,1 mV auf zwei oder mehr Ableitungen
- b) Zweifache Erhöhung der CK verglichen zum Normalwert
- c) Ein erhöhtes Tn-I oder eine signifikante Erhöhung der CKMB

3.1.1 Kontrollgruppen

Um Informationen über die normale GPVI-Expression zu erhalten, wurden neben den 367 Patienten mit symptomatischer koronarer Herzkrankheit auch

offensichtlich gesunde Personen untersucht. Zunächst wurde unser Laborpersonal überprüft, welches aus 22 Männern und acht Frauen mit einem Durchschnittsalter von 31,8 Jahren bestand (keine Medikation und keine Risikofaktoren außer vier Rauchern). Diese Gruppe erhielt keine Koronarangiographie.

Danach wurde eine Patientengruppe untersucht, bei denen eine koronare Herzkrankheit ausgeschlossen werden konnte. Sie enthielt neun Männer und sechs Frauen mit einem Durchschnittsalter von 57,4 Jahren. Die Patienten wurden wegen Brustschmerzen koronarangiographiert, es fand sich jedoch keine koronare Herzkrankheit. Sie besaßen die folgenden Risikofaktoren: Arterielle Hypertension (6x), Hyperlipidämie (1x), Diabetes (1x), positive Familienanamnese in Bezug auf eine KHK (1x), Raucher (1x). Außerdem erhielten sie folgende Medikation: Betablocker (5x), Acetylsalicylsäure (1x), Statine (1x), ACE-Hemmer (1x).

Beide Gruppen wurden zu einer 45 Personen umfassenden Kontrollgruppe zusammengefasst.

3.2 Material

Folgende Materialien wurden für die Untersuchungen benötigt:

- Einkanal-Pipetten „Eppendorf Reference“ mit variabler Volumeneinstellung der Firma Eppendorf (22339 Hamburg)
- Pipettenspitzen der Firma Ratiolab (63303 Dreieich-Buchsschlag)
- Monovetten der Firma Sarstedt (51582 Nümbrecht):
 - S-Monovette® 8,5ml, gelb, Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin (CPDA, 1ml)
 - S-Monovette® 9ml, rot, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA); 1,6mg / ml Blut
 - S-Monovette® 7,5ml, weiß, Serum
 - S-Monovette® 9ml, blau, Ammoniumheparin (NH₄); 16 IE Heparin / ml Blut

- Cups der Firma Eppendorf (22339 Hamburg):
 - 2,5ml Cups weiß
 - 2,5ml Cups rot
 - 2,5ml Cups blau
 - 2,5ml Cups gelb
- Paraformaldehyd (PFA) der Firma Merck (64293 Darmstadt)
- Phosphatpuffersaline (PBS) der Firma Invitrogen (76131 Karlsruhe)
- Zentrifuge „Megafuge 1.0R“ der Firma Heraeus Sepatech (63450 Hanau)
- PD10-Säule mit der Trägersubstanz Sephadex G-25M der Firma GE Healthcare Bio-Sciences (SE-75125 Uppsala)
- Fluorescein-Isothiocyanat der Firma Sigma (82041 Deisenhofen)
- Monoklonale Antikörper CD62P-FITC, CD42b-PE, 4C9-FITC (siehe 3.2.1)
- FACS-Röhrchen (5ml) der Firma BD Biosciences Discovery Labware (MA 01730 Bedford, USA)
- Durchflusszytometer „FACSCalibur“ der Firma Becton Dickinson (NJ 07417 Franklin Lakes, USA)

3.2.1 Monoklonale Antikörper

In der gegenwärtigen Studie wurden folgende monoklonale Antikörper entweder als Konjugat mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) oder als Konjugat mit Phycoerythrin (PE) verwendet.

Der Antikörper gegen CD62P bindet an das α -granuläre Glykoprotein der Thrombozytenmembran P-Selektin, welches auf der aktivierten Thrombozytenoberfläche exprimiert wird und somit als Marker von α -Degranulation verwendet wird. Es wurde ein Konjugat mit FITC verwendet (Clone CLB-Thromb/6, Firma Immunotech, F-13009 Marseille).

Der Antikörper gegen CD42b bindet an das Glykoprotein GPIIb-V-IX und ist ein Thrombozytenmarker. Er wurde als Konjugat mit PE verwendet. (Clone SZ2, Firma Immunotech, F-13009 Marseille).

4C9, der Antikörper gegen GPVI, wurde nach etablierter Methode hergestellt (31). Lou/C –Ratten wurden mit dem adenoviral exprimierten menschlichen GPVI/Fc -Fusionsprotein immunisiert. Daraufhin wurde in einem festphasigen Immunoassay ein Screening auf Hybridome durchgeführt, wobei man entweder GPVI/Fc oder Fc ohne externe GPVI-Domäne verwendete. Durch weiteres Screening konnte das Hybridom 5C4 identifiziert werden, welches spezifisch an GPVI/Fc binden konnte, aber nicht an Fc, welchem die externe GPVI-Domäne fehlte. Die Spezifität des Antikörpers wurde durch einen Immunoblot gegen GPVI-Fc und zur Kontrolle gegen Fc verifiziert (31). Der fertige Antikörper wurde daraufhin mit FITC konjugiert, indem 4C9 mit einer gesättigten FITC-Lösung zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Die Isolierung des gelabelten Antikörpers erfolgte über eine PD10-Säule mit der Trägersubstanz Sephadex G-25M.

3.2.2 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie oder Fluorescence-activated-cell-sorter (FACS) ist ein Verfahren, das es ermöglicht, Zellen oder andere mikroskopische Partikel anhand ihrer Größe, Struktur, Oberflächeneigenschaften und auch ihrer intrazellulären Zusammensetzung zu unterscheiden. So lässt es sich auch zur Untersuchung von Thrombozyten anwenden. Man nutzt Antikörper, die gegen bestimmte Strukturen der Zellen gerichtet sind, und koppelt sie mit einem Fluoreszenzfarbstoff, der dann im Gerät erkannt werden kann. Unabhängig davon lässt sich eine Aussage über die Größe der Zelle und deren Granularität treffen.

Grundvoraussetzung einer Messung ist die Detektion von Partikeln und Zellen und der gegebenenfalls vorhandenen fluoreszenzmarkierten Markern mittels eines Lasers. Das ausgesandte monochromatische Licht trifft auf die in der Probe enthaltenen Bestandteile und wird dadurch gestreut. Hiernach ist das optische System geschaltet, welches zahlreiche Linsen, Spiegel, Filter und Detektoren enthält und so die gestreuten Strahlen auffängt und verwertet. Die nach vorne abgelenkten Strahlen sind ein Maß für die Größe der gemessenen Zellen (Vorwärtsstreulicht oder Forwardscatter (FSC)), das in einem 90°-Winkel abgestrahlte Seitwärtsstreulicht wird als Sidescatter (SSC) bezeichnet und dient als Maß für die Zellgranularität. Sind die Zellen mit bestimmten fluoreszenzgekoppelten Antikörpern markiert, wird ein Teil der Lichtenergie durch das entsprechende Fluorochrom absorbiert und Fluoreszenzlicht einer höheren Wellenlänge emittiert, welches ebenso von Linsen des optischen Systems gesammelt wird. Die beiden gängigsten Fluoreszenzfarbstoffe sind das Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), ein gelbgrüner Farbstoff mit einem Emissionsmaximum um 519 nm und das Phycoerythrin (PE), rot, mit einem Emissionsmaximum von etwa 578 nm.

Sind die Proben entsprechend vorbereitet und gegebenenfalls mit einem oder mehreren Fluoreszenzfarbstoffen versetzt, kann eine Messung durchgeführt werden. Tausende Zellen und Mikropartikel werden innerhalb kürzester Zeit in einem laminaren Probenstrom einzeln an dem Laser vorbeigeleitet und durch die gestreute Strahlung charakterisiert.

Das Ergebnis kann auf verschiedene Weise dargestellt werden. Eine Möglichkeit ist das eindimensionale Histogramm. Dabei handelt es sich um eine einfache Häufigkeitsverteilung, bei der die Stärke eines Fluoreszenzsignals gegen die Anzahl der Ereignisse entweder linear oder logarithmisch aufgetragen wird (siehe Abbildung 5).

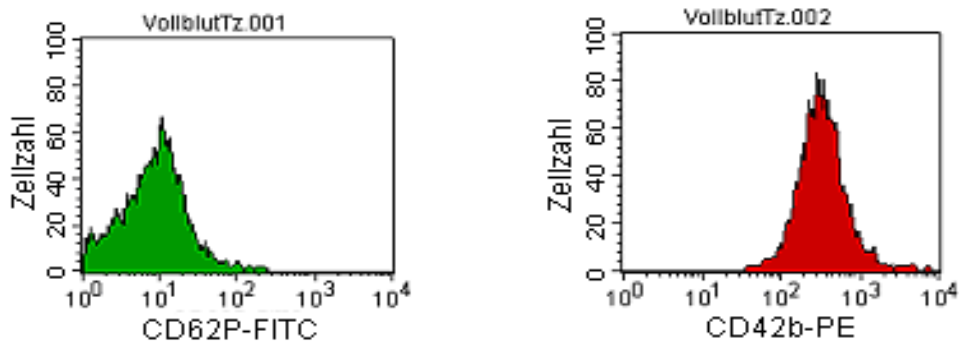


Abbildung 5: Histogramme einer FACS-Messung mit anti-CD62P-FITC und anti-CD42b-PE (logarithmische Auftragung)

Eine weitere Möglichkeit bietet der zweidimensionale Dot-Plot. Hiermit kann man verschiedene Eigenschaften einer Zelle gegenüberstellen, z. B. die Beziehung von Größe und Granularität einer Zelle (siehe Abbildung 6).

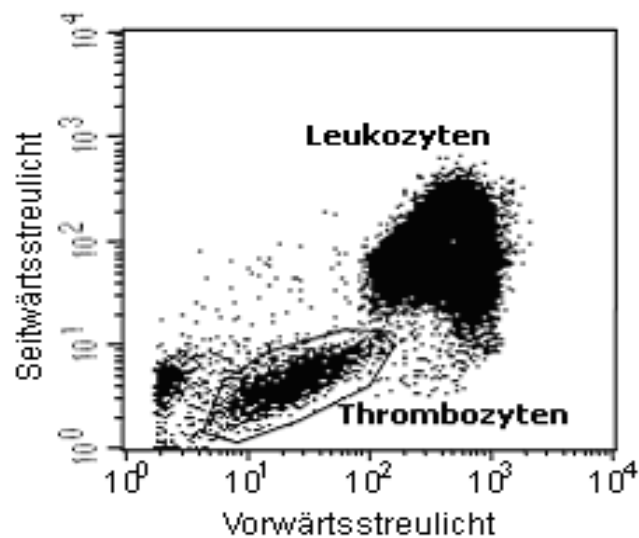


Abbildung 6: Dot-Plot einer FACS-Analyse mit Vollblut

Die großen Vorteile, die ein Durchflusszytometer gegenüber anderen Methoden der Zellcharakterisierung besitzt, sind zum einen der hohe Durchsatz an Zellen innerhalb kürzester Zeit, zum anderen die gleichzeitige Erfassung der verschiedensten Parameter einer jeden Zelle (29).

3.3 Analyse der Thrombozyten

3.3.1 Probengewinnung

Der Studienpopulation wurde bei Beginn der Koronarangiographie arterielles Blut aus der arteriellen Schleuse in der Femoralarterie entnommen. Bei Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom wurde die Koronarangiographie direkt nach Eintreffen im Krankenhaus eingeleitet. Patienten mit stabiler Angina pectoris wurden nach Plan untersucht.

Bei der offensichtlich kardiovaskulär gesunden Kontrollgruppe aus dem Laborpersonal wurde venöses Blut durch Venenpunktion der Vena cubitalis abgenommen.

Das Blut wurde in eine CPDA-Monovette (5 ml) gefüllt, innerhalb kürzester Zeit ($\leq \frac{1}{2}$ Stunde) nach gültigem Assay pipettiert und innerhalb der nächsten 48 Stunden mittels Durchflusszytometrie untersucht.

3.3.2 Vorbereitung der Blutproben

Die gewonnenen Blutproben der Studienpopulation sowie der Kontrollgruppe wurden umgehend ($\leq \frac{1}{2}$ Stunde) nach im Folgenden beschriebenen Assay für die

Evaluierung mit der Durchflusszytometrie vorbereitet. Jede Bestimmung erfolgte zweifach.

Das CPDA-Blut wurde im Verhältnis 1:50 mit Phosphatpuffersaline (PBS) verdünnt. Je 35 µl dieser Suspension gaben wir in vier FACS-Röhrchen und fügten weitere 5 µl PBS hinzu. Daraufhin wurde in jeweils zwei der Behälter 5 µl entweder des FITC-markierten CD62P-Antikörper oder des FITC-markierten GPVI-Antikörpers 4C9 hinzugegeben. Anschließend wurden in jedes FACS-Röhrchen 5 µl des PE-markierten CD42b-Antikörpers als Thrombozytenmarker hinzugefügt. Das ergibt vier Proben von jeweils 50 µl, zwei mit 4C9-FITC und zwei mit CD62P-FITC versetzt. Danach wurden die Proben für 25 Minuten im Dunkelraum bei Raumtemperatur inkubiert, bevor wir sie mit jeweils 300 µl 0,5 % Paraformaldehyd konservierten. Bis zur FACS-Messung, die spätestens 48 Stunden nach der Probenentnahme erfolgte, wurden die Proben im Kühlschrank (+4 °C) bei Dunkelheit aufbewahrt.

3.3.3 Analyse mittels Durchflusszytometrie

Nach spätestens 48 Stunden erfolgte die Probenanalyse mittels Durchflusszytometrie. Hierzu kam das Gerät „FACSCalibur“ der Firma Becton Dickinson, USA, zur Anwendung. Die Instrumenteneinstellungen wurden beim Vorwärtsstreulicht (FSC, P1) auf E00 log, beim Seitwärtsstreulicht (SSC, P2) auf 261 log, bei FITC (P3) auf 600 log und bei PE (P4) auf 520 log festgesetzt. Die Anzahl der Ereignisse wurde auf etwa 300 pro Sekunde gestellt und pro Messung bei 10.000 Ereignissen begrenzt. Die ‚Mittlere Fluoreszenzintensität‘ (MFI) diente als Maß für die Rezeptordichte.

3.4 Statistische Analyse

Mit nicht-parametrischen Tests wurden paarweise Gegenüberstellungen von akutem Koronarsyndrom (ACS), Troponin-positivem ACS (Tn+-ACS), Nicht-ST-Hebungsinfarkt (NSTEMI) und ST-Hebungsinfarkt (STEMI) mit stabiler Angina pectoris (SAP) durchgeführt (Kruskall-Wallis-Test). Für die Korrektur des multiplen Testens wurde eine Bonferroni-Holm-Korrektur angewandt. Ein Wahrscheinlichkeitswert von $\leq 0,05$ galt als statistisch signifikant. Der Vergleich von GPVI mit den klinischen Parametern wurde mit der Spearman-Korrelation durchgeführt. Eine multifaktorielle Kovarianzanalyse für den dekadischen Logarithmus von GPVI wurde vorgenommen, um mögliche Einflussfaktoren abzugleichen. Darüber hinaus wurde eine logistische Regressionsanalyse durchgeführt, um die Assoziation von GPVI mit konventionellen Laborparametern zu prüfen.

Alle statistischen Analysen wurden mit SPSS, Version 13, durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Charakteristika der Studienpopulation

Die thrombozytäre Oberflächenexpression des Kollagenrezeptors GPVI wurde konsekutiv in einer Gruppe von 367 Patienten mit symptomatischer koronarer Herzkrankheit untersucht. Bei allen Patienten wurde eine Koronarangiographie durchgeführt und damit die Diagnose verifiziert sowie die Schwere der Erkrankung festgestellt.

Bei Aufnahme in die Studie wurden die kardiovaskulären Risikofaktoren arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie, Diabetes, Rauchen und positive Familienanamnese in Bezug auf eine koronare Herzkrankheit (KHK) erfasst.

Außerdem wurde die verbleibende linksventrikuläre Auswurffraktion aufgenommen. Dabei bedeutet ‚normal‘ eine verbliebene Auswurffraktion von über 60 %, ‚leicht reduziert‘ von 45 – 60 %, ‚mittelgradig reduziert‘ von 35 – 45 % und ‚hochgradig reduziert‘ von ≤ 35 %.

Die zugrunde liegende KHK kann grundsätzlich jedes Koronargefäß betreffen. Die drei relevanten, großen Gefäße sind das rechte Herzkranzgefäß (RCA), der Ramus interventricularis anterior (RIVA) und der Ramus circumflexus (RCX). Demnach wird die KHK in eine Ein-Gefäß-, Zwei-Gefäß und Drei-Gefäß-Erkrankung unterteilt.

Darüber hinaus wurde die Medikation der Patienten bei der Krankenhausaufnahme in die Auswertung mit eingeschlossen (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Charakteristika der Patienten und Medikation bei Aufnahme

Charakteristika	Total (n=367)	SAP (n=240)	ACS (n=127)
Alter – in Jahren	67,1±10,1	66,9±9,4	67,5±11,3
Geschlecht – Anzahl (%)			
Weiblich	96 (26,2)	59 (24,6)	37 (29,1)
Männlich	271 (73,8)	181 (75,4)	90 (70,9)
Kardiovaskuläre Risiko- faktoren – Anzahl (%)			
Keine Risikofaktoren	31 (8,4)	17 (7,1)	14 (11)
Arterielle Hypertension	260 (70,8)	176 (73,3)	84 (66,1)
Hyperlipidämie	201 (54,8)	151 (62,9)	50 (39,4)
Diabetes	134 (36,5)	88 (36,7)	46 (36,2)
Positive Familienanamnese	88 (24,0)	59 (16,1)	29 (22,8)
Nikotinabusus	116 (31,6)	75 (24,6)	41 (32,3)
KHK – Anzahl (%)			
1-Gefäß-KHK	83 (22,6)	47 (19,6)	36 (28,4)
2-Gefäß-KHK	117 (31,9)	80 (33,3)	37 (29,1)
3-Gefäß-KHK	167 (45,5)	113 (47,1)	54 (42,5)
Linksventrikuläre Aus- wurffraktion – Anzahl (%)			
Normal	201 (54,8)	135 (56,3)	66 (52)
Leicht reduziert	92 (25,1)	61 (25,4)	31 (24,4)
Mittelgradig reduziert	47 (12,8)	27 (11,2)	20 (15,7)
Hochgradig reduziert	27 (7,4)	17 (7,1)	10 (7,9)
Medikation – Anzahl (%)			
Keine Medikation	113 (30,8)	52 (21,7)	61 (48)
ACE-Hemmer	174 (47,4)	129 (53,8)	45 (35,4)
Angiotensin-Rezeptor - Blocker	30 (8,2)	28 (11,7)	2 (1,6)
Betablocker	216 (58,9)	165 (68,8)	51 (40,2)
Statine	204 (55,6)	159 (66,3)	45 (35,4)
Acetylsalicylsäure	216 (58,9)	162 (67,5)	54 (42,5)
Clopidogrel	75 (20,4)	63 (26,3)	12 (9,4)
Vitamin K -Antagonist	21 (5,7)	15 (6,3)	6 (4,7)

4.2 Oberflächenexpression von GPVI bei koronarer Herzkrankheit

Wir untersuchten in dieser Studie die Oberflächenexpression von GPVI auf Thrombozyten in einer Gruppe von 367 Patienten, welche konsekutiv zu jeder Tages- und Nachtzeit in die Studie aufgenommen wurden. Anhand von bestehenden Definitionen wurden sie in Patienten mit stabiler Angina pectoris und Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom unterteilt. Bei letzterem wird weiterhin zwischen Troponin-positivem ACS (Tn+-ACS), Nicht-ST-Strecken-Hebungsinfarkt (NSTEMI) und ST-Strecken-Hebungsinfarkt (STEMI) unterschieden (siehe auch 3.1 ‚Studienpopulation und Auswahlkriterien‘).

Der monoklonale Antikörper 4C9-FITC ist gegen den Kollagenrezeptor GPVI gerichtet und wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Wie in Abbildung 7 zu sehen, ist die Oberflächenexpression von GPVI auf Thrombozyten bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom (ACS) im Vergleich zu Patienten mit stabiler Angina pectoris (SAP) signifikant erhöht (ACS [Mittlere Fluoreszenzintensität, MFI \pm Standardabweichung, SD]: $21,4 \pm 9,7$; SAP: $18,6 \pm 7,1$; $p=0,004$). Die Erhöhung beträgt 17,4 %. Um Informationen über die normale Expression von GPVI auf Thrombozyten zu erhalten, wurde zunächst unser Laborpersonal untersucht ($n=30$; MFI \pm SD: $15,6 \pm 4,7$). Daraufhin überprüften wir eine Gruppe von Patienten, bei denen im Rahmen einer Koronarangiographie eine koronare Herzkrankheit ausgeschlossen wurde ($n=15$; MFI \pm SD: $16,2 \pm 2,7$). Die beiden Gruppen zusammengenommen ergibt dies einen GPVI-Expressionswert von $15,8 \pm 4,3$ bei einer Anzahl von 45 Kontrollpersonen (siehe Abbildung 7, gestrichelte Linie).

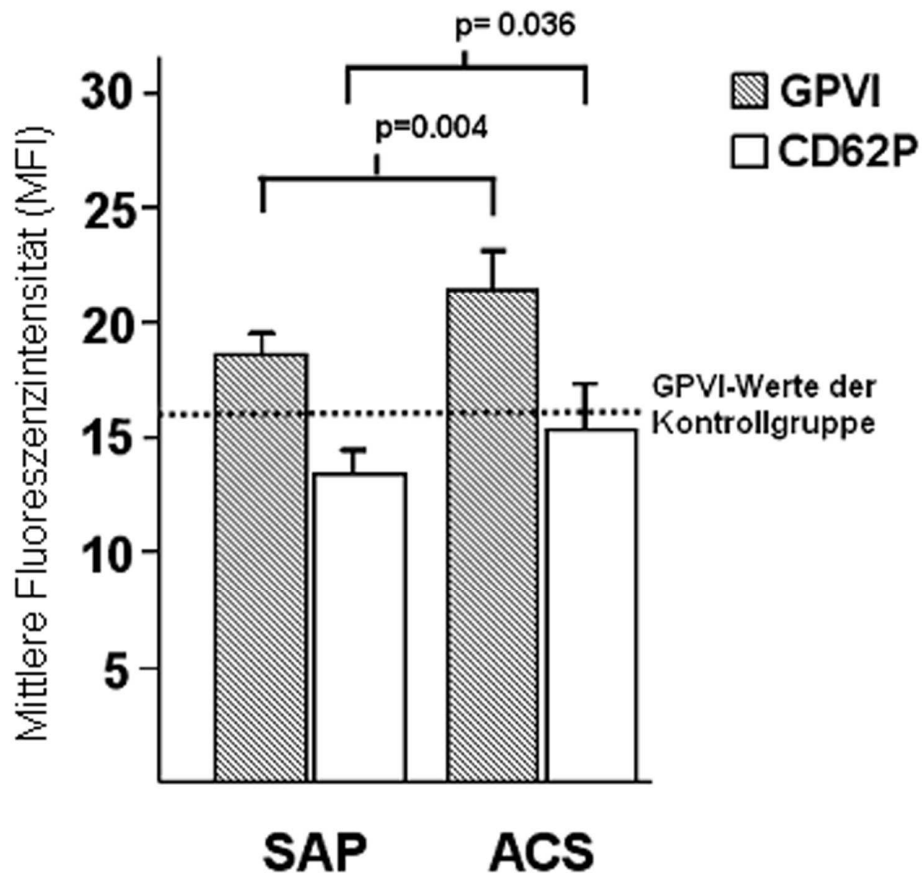


Abbildung 7: Die Expression des Kollagenrezeptors Glykoprotein VI auf Thrombozyten ist bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom erhöht

Thrombozyten von Patienten mit stabiler Angina pectoris (SAP), akutem Koronarsyndrom (ACS) und kardiovaskulär gesunden Personen (GPVI-Werte der Kontrollgruppe: $15,8 \pm 4,3$; $n=45$, gestrichelte Linie) wurden auf den Kollagenrezeptor GPVI und P-Selektin (CD62P) untersucht. Dafür wurden monoklonale Antikörper verwendet, gebunden entweder an FITC oder an PE, und Zweifarben-Vollblut-Durchflusszytometrie gemäß einem standardisierten Protokoll durchgeführt. Die Messergebnisse wurden in Mittlerer Fluoreszenzintensität (MFI) dargestellt.

Patienten mit akutem Myokardinfarkt, insbesondere mit STEMI, wiesen dabei im Vergleich zu Patienten mit geringerer myokardialer Ischämie (Troponin-positives ACS) die höchsten GPVI-Expressionswerte auf, wenngleich dies keine statistische Signifikanz erreichte (Tn+-ACS [n=57]: $21,6 \pm 9,2$; NSTEMI [n=51]: $20,7 \pm 8,2$; $p=0,672$; STEMI [n=19]: $24 \pm 14,2$; $p=0,894$) (siehe Abbildung 8).

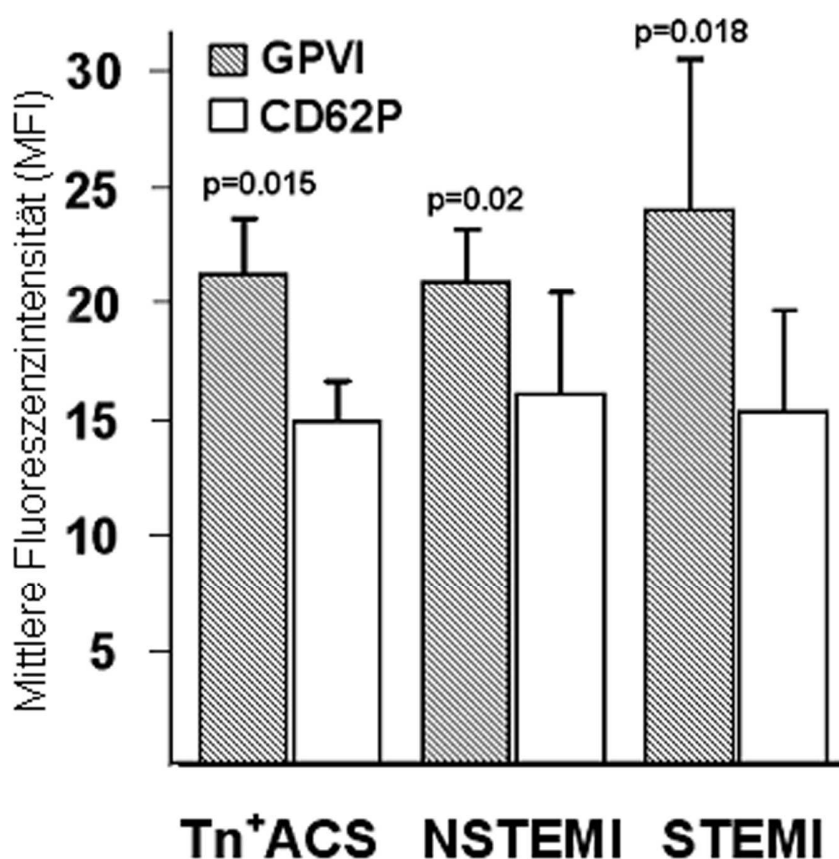


Abbildung 8: Die Expression des Kollagenrezeptors Glykoprotein VI und P-Selektin (CD62P) auf Thrombozyten bei Patienten mit Troponin-positivem ACS (Tn+ACS) und Myokardinfarkt mit oder ohne ST-Strecken-Hebung (STEMI bzw. NSTEMI)

Der Antikörper anti-CD62P ist gegen das thrombozytäre Oberflächenprotein P-Selektin gerichtet, welches bei Aktivierung vermehrt exprimiert wird. P-Selektin gilt damit als wichtiger Marker für die Aktivierung von Thrombozyten. Dementsprechend war die Oberflächenexpression von P-Selektin (CD62P) bei Patienten mit ACS im Vergleich zu Patienten mit SAP signifikant erhöht (ACS [MFI \pm SD]: $15,4 \pm 11,4$; SAP: $13,5 \pm 8,3$; $p=0,036$) (siehe Abbildungen 7 und 8).

Die Expressionswerte von GPVI korrelieren mit den Werten von P-Selektin ($r=0.702$; $p=0.001$) (siehe Abbildung 9).

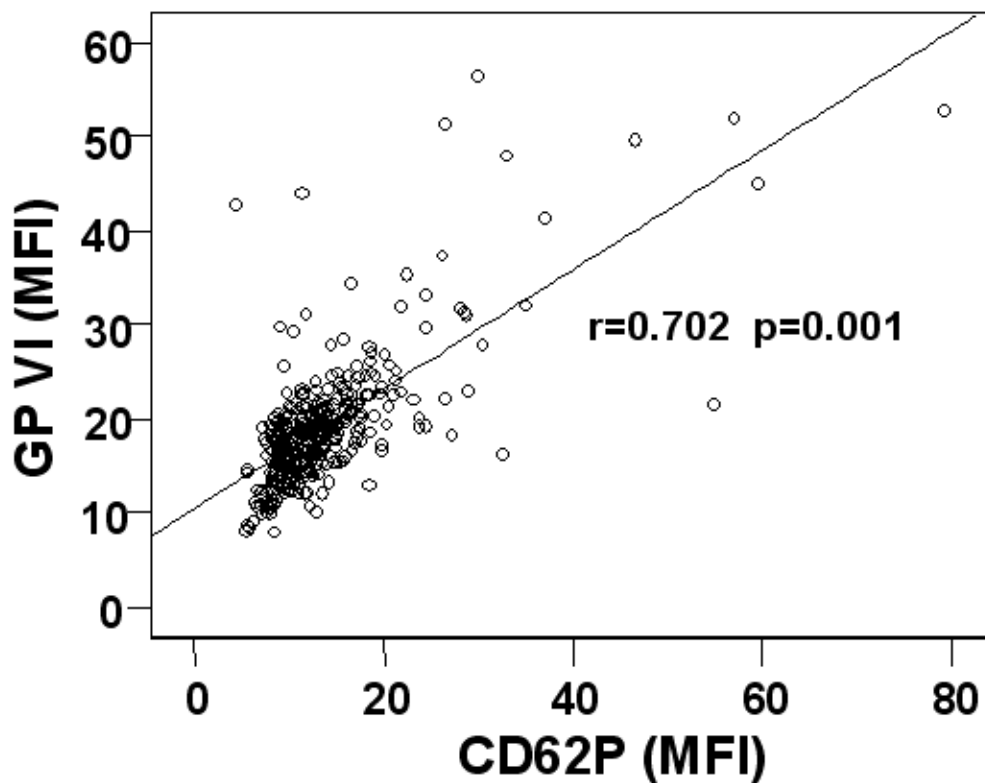


Abbildung 9: Korrelation der Oberflächenexpression von GPVI und CD62P

MFI: Mittlere Fluoreszenzintensität

4.3 Thrombozytäre GPVI-Expression und Marker der myokardialen Ischämie

4.3.1 Korrelation der GPVI-Expression mit Markern der Myokardischämie

Darüber hinaus wurde geprüft, ob die thrombozytäre GPVI-Expression mit Markern der myokardialen Ischämie wie Troponin-I (Tn-I) oder Kreatinkinase (CK) korrelieren. Es stellte sich heraus, dass GPVI-Expressionswerte bei Aufnahme in die Klinik mit den entsprechenden initialen Tn-I- oder CK –Werten nicht korrelieren (initiales Tn-I: $r=0.035$, $p=0.567$; initiale CK $r=0.069$, $p=0.232$) (siehe Tabelle 3 und Abbildungen 10a und 10b).

Tabelle 3: Initiale Laborparameter bei Aufnahme in die Klinik

MFI: Mittlere Fluoreszenzintensität

Parameter	SAP (n=240)	Tn+-ACS (n=57)	MI (n=70)
Kreatinkinase (U/l)	103,4 ± 68,3	158,7 ± 296,9	500,8 ± 703,9
Kreatinkinase-MB (U/l)	17,7 ± 7,5	36,7 ± 72,1	85,1 ± 113,1
Troponin-I (ng/ml)	0,2 ± 0,5	1,3 ± 7,3	15,8 ± 57,4
Glykoprotein VI (MFI)	18,6 ± 7,1	21,2 ± 9,2	21,6 ± 10,1
CD62P (MFI)	13,5 ± 8,3	14,8 ± 6,9	15,8 ± 14,1
CD42b (MFI)	314,5 ± 80,5	311,7 ± 73,3	305,9 ± 85,9

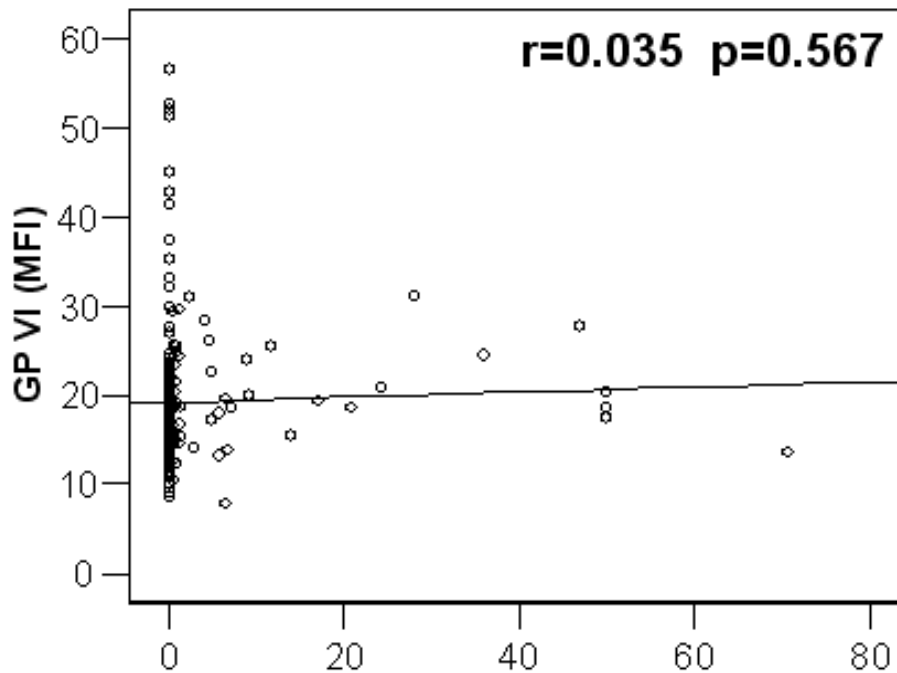


Abbildung 10a: Troponin-I bei Aufnahme in die Klinik (ng/ml)

MFI: Mittlere Fluoreszenzintensität

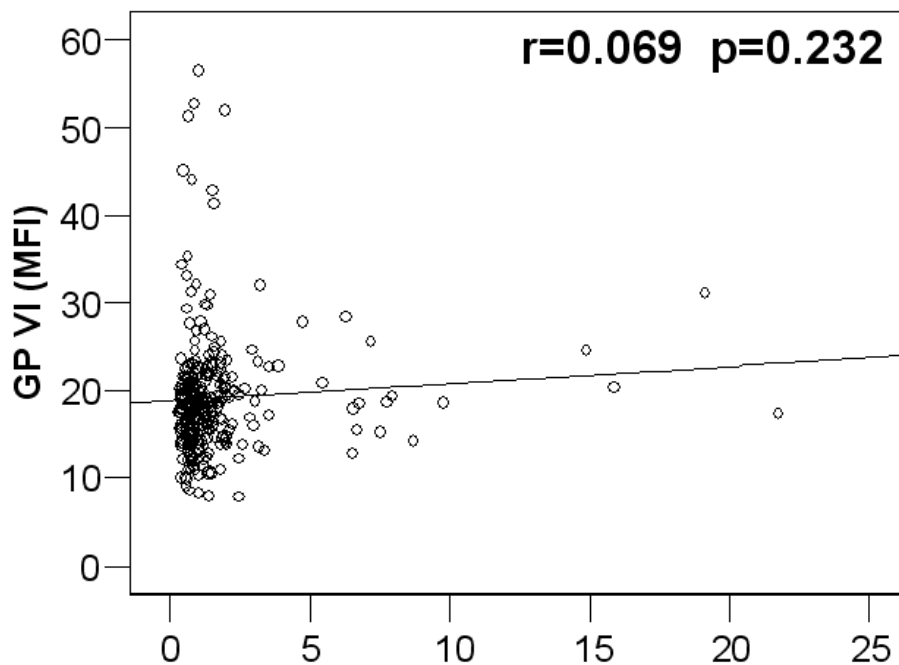


Abbildung 10b: Kreatinkinase bei Aufnahme in die Klinik (x10² U/l)

MFI: Mittlere Fluoreszenzintensität

Dagegen konnte gezeigt werden, dass Werte für GPVI mit den maximalen Tn-I- und CK –Werten korrelieren, die im Verlauf des Klinikaufenthaltes bestimmt wurden (maximales Tn-I: $r=0.178$, $p=0.031$; maximale CK: $r=0.181$, $p=0.047$) (siehe Tabelle 4 und Abbildungen 11a und 11b).

Tabelle 4: Maximale Laborparameter im Verlauf des Klinikaufenthaltes

Kreatinkinase (U/l)	$142,7 \pm 201,9$	$242,5 \pm 429$	$1407,6 \pm 2489,9$
Kreatinkinase-MB (U/l)	$32,6 \pm 44,6$	$44,6 \pm 65,6$	$176,6 \pm 158,3$
Troponin-I (ng/ml)	$1,4 \pm 4,1$	$2,1 \pm 11,4$	$32,5 \pm 68,2$

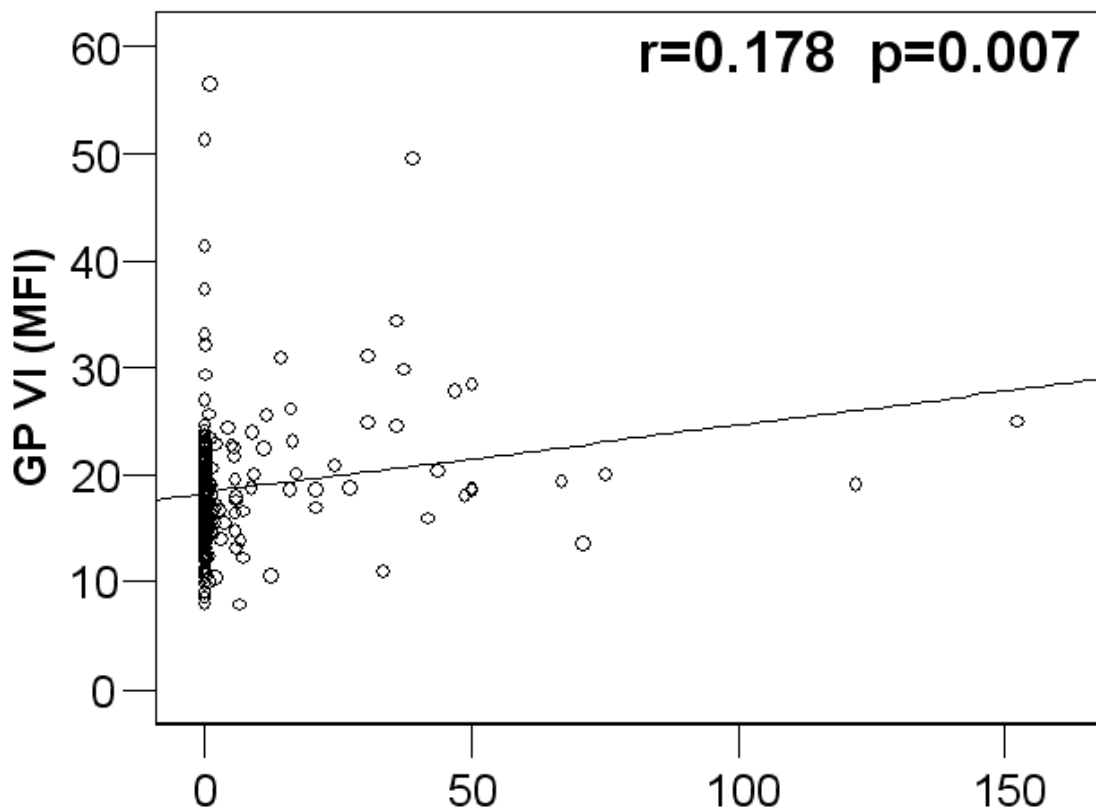
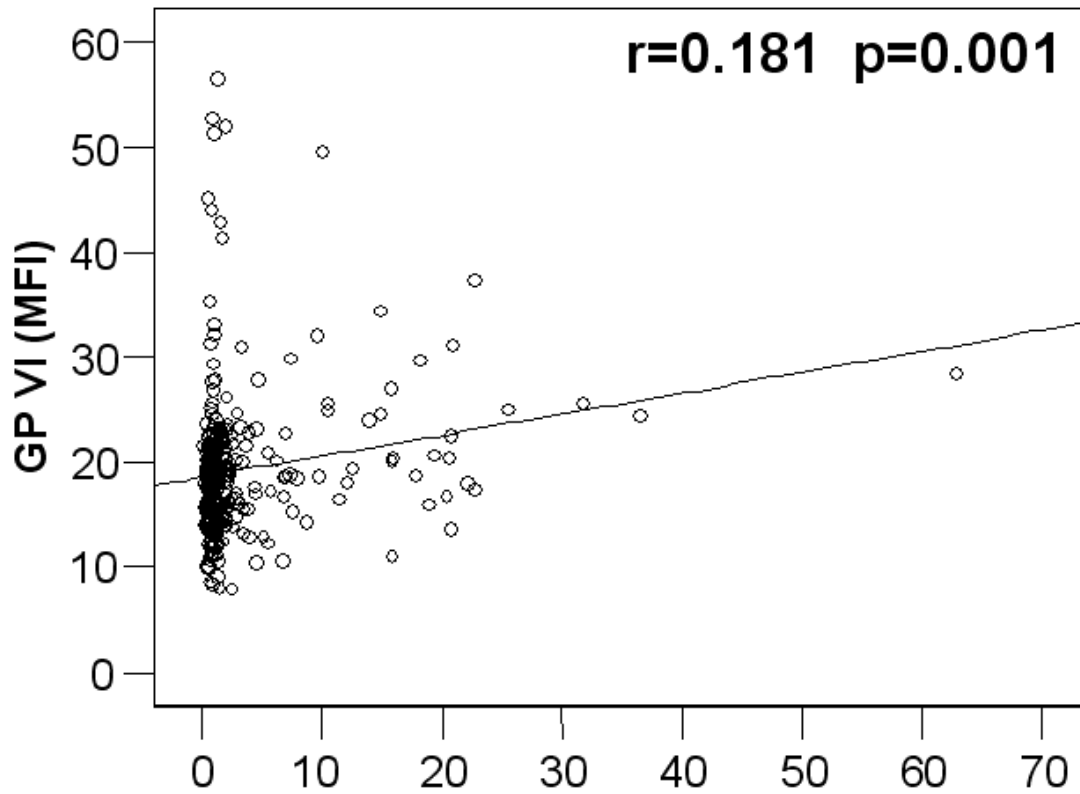


Abbildung 11a: Maximales Troponin-I im Verlauf des Klinikaufenthaltes (ng/ml)

MFI: Mittlere Fluoreszenzintensität



**Abbildung 11b: Maximale Kreatinkinase im Verlauf des Klinikaufenthaltes
(x 10² U/l)**

MFI: Mittlere Fluoreszenzintensität

Keine Korrelation wurde zwischen GPVI und dem C-reaktiven Protein festgestellt.

4.3.2 Unabhängigkeit der GPVI-Expression von Markern der Myokardischämie

Die Gegenüberstellung des dekadischen Logarithmus von GPVI zwischen ACS und SAP wurde auf mögliche Einflussfaktoren abgeglichen (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Multifaktorielle Kovarianzanalyse für den Logarithmus von GPVI

Kategorie	Faktor	<i>P</i> -Wert
Medikation	ACE-Hemmer	0,061
	Angiotensin-Rezeptor-Blocker	0,844
	Beta-Blocker	0,546
	Statine	0,912
	Aspirin	0,456
	Clopidogrel	0,121
	Vitamin-K-Antagonist	0,586
Kardiovaskuläre Risikofaktoren	Arterielle Hypertonie	0,713
	Hyperlipidämie	0,622
	Diabetes	0,969
	Positive Familienanamnese in Bezug auf eine KHK	0,370
	Rauchen	0,872
Konventionelle Laborparameter	Initiales Troponin-I (ng/ml)	0,110
	Initiale Kreatinkinase (U/l)	0,484
	Initiales C-reaktives Protein (mg/dl)	0,216
Gruppen	ACS vs. SAP	0,024

Um zu testen, ob GPVI unabhängig von konventionellen Laborparametern mit einem ACS assoziiert ist, wurde eine logistische Regressionsanalyse durchgeführt, welche Troponin-I, Kreatinkinase und C-reaktives Protein bei Aufnahme in die Klinik beinhaltet. Es konnte gezeigt werden, dass die thrombozytäre Oberflächenexpression von GPVI unabhängig mit dem ACS assoziiert ist (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Assoziation von GPVI nach Abgleichung mit konventionellen Laborparametern

OR: Odds Ratio; KI: Konfidenzintervall, MFI: Mittlere Fluoreszenzintensität

Parameter	P-Wert	Odds Ratio (OR)	95% KI für OR	
			Unteres	Oberes
GPVI (MFI)	0,013	1,021	1,021	1,189
Initiales Troponin-I (ng/ml)	0,167	1,966	0,754	5,124
Initiale Kreatinkinase (U/l)	0,025	1,007	1,001	1,014
Initiales C-reaktives Protein (mg/dl)	0,882	1,009	0,899	1,132

5 Diskussion

Neuere Studien beschreiben das Glykoprotein VI (GPVI) als den zentralen Kollagenrezeptor, welcher die Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten am Ort einer atherosklerotischen Plaqueruptur vermittelt (14, 39). Die Hemmung von GPVI resultiert in einer beträchtlichen Verminderung der Thrombozytenadhäsion an atherosklerotischem Gewebe (39). Obwohl GPVI konstitutiv auf der Oberfläche exprimiert wird, führt die Aktivierung von Thrombozyten zu einer deutlichen Erhöhung der Expression von GPVI auf der Plasmamembran (9, 36). Frühere Untersuchungen ergaben, dass die Expressionsdichte des Kollagenrezeptors GPVI mit dem Bestehen eines Myokardinfarkts zusammenhängen könnte (48). Es wurde gezeigt, dass bei einer begrenzten Anzahl von Patienten mit vorübergehendem Myokardinfarkt die GPVI-Expression im Vergleich zu einer Kontrollgruppe 14 % höher war. Folglich wäre es möglich, dass eine erhöhte GPVI-Expression auf zirkulierenden Thrombozyten auf ein drohendes thrombotisches Ereignis wie z. B. einen Myokardinfarkt hinweisen kann.

5.1 GPVI als früher Marker des akuten Koronarsyndroms

Die vorliegende Arbeit ist eine konsekutive Studie von 367 Patienten mit akutem Koronarsyndrom (ACS) oder stabiler Angina pectoris (SAP).

Die wichtigsten Ergebnisse dieser Studie sind:

Die thrombozytäre GPVI-Expression ist bei Patienten mit ACS im Vergleich zu Patienten mit SAP signifikant erhöht.

Die GPVI-Expression ist zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Klinik mit der Entwicklung eines ACS und eines Myokardinfarkts assoziiert, unabhängig von

Labormarkern der myokardialen Ischämie wie Troponin-I (Tn-I) und Kreatinkinase (CK).

Die vorhandenen Resultate demonstrieren die Beteiligung des GPVI bei der Entwicklung eines ACS und lassen es möglich erscheinen, GPVI als neuen, frühzeitigen Marker beim ACS in Betracht zu ziehen.

5.2 Thrombozytäre GPVI-Expression beim akuten Koronarsyndrom

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die thrombozytäre Oberflächenexpression von GPVI bei Patienten mit ACS im Vergleich zu Patienten mit SAP signifikant erhöht ist. Die GPVI-Expression, die bei Aufnahme in die Klinik ermittelt wurde, ist mit der Ausbildung eines ACS assoziiert, unabhängig von etablierten Markern der Myokardischämie wie Tn-I und CK. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das thrombozytäre GPVI ein frühzeitiger Biomarker für die Erkennung von Patienten mit einem ACS sein könnte. Da die GPVI-Werte bei Patienten schon zum Zeitpunkt der Krankenhausaufnahme erhöht sein können, wenn sich Marker der Myokardnekrose noch im Normalbereich befinden, lässt sich darüber spekulieren, ob ein Thrombozyten-spezifischer Thrombosemarker dabei behilflich sein könnte, Patienten mit hohem Risiko abzugrenzen, bevor eine Myokardischämie unausweichlich ist.

Die Aktivierung von Thrombozyten und die durch Thrombozyten gesteuerte Bildung eines Thrombus an der Stelle einer Plaqueruptur sind die ersten Trigger-Ereignisse beim ACS (20). Am Ort einer Plaqueruptur werden subendotheliale extrazelluläre Matrixproteine, insbesondere Kollagen, dem Blutstrom ausgesetzt und anschließend umgehend von einer Schicht aktivierter Thrombozyten bedeckt (47). In dem gesamten Prozess ist GPVI der wichtigste Kollagenrezeptor, welcher die Aktivierung der Thrombozyten und deren Adhäsion an das freiliegende

Kollagen vermittelt (30, 31, 36). Die Expression von GPVI ist auf das megakaryozytäre System begrenzt und ist daher spezifisch für Thrombozyten.

Bis heute gibt es nur wenige Daten, welche die Veränderung bei der GPVI-Expression auf zirkulierenden, menschlichen Thrombozyten belegen. Bisher konnte herausgefunden werden, dass GPVI-Expressionswerte bei Patienten mit Typ-2-Diabetes verändert sind (9). Darüber hinaus konnten Samaha et al. zeigen, dass GPVI-Werte bei Patienten, welche einen Myokardinfarkt erlitten hatten, erhöht sind (48).

Abgesehen davon scheinen genetische Aspekte eine wichtige Rolle bei der Entwicklung einer Koronarthrombose und eines letalen Myokardinfarkts zu spielen, wie aus einer Studie über GPVI-Polymorphismen hervorgeht (38). Die vorliegende Studienpopulation wurde nicht auf GPVI-Polymorphismen untersucht, aber solche Polymorphismen könnten maßgeblich zum Risiko einer KHK beitragen, unabhängig von der thrombozytären GPVI-Expression.

In der vorliegenden Studie kam ein spezifischer monoklonaler GPVI-Antikörper, 4C9, zur Anwendung. Es wurde an einer großen, konsekutiv untersuchten Patientengruppe mit symptomatischer koronarer Herzkrankheit nachgewiesen, dass die thrombozytäre Oberflächenexpression von GPVI bei Patienten mit ACS im Vergleich zu Patienten mit SAP signifikant erhöht ist. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die GPVI-Expressionswerte bei Aufnahme in die Klinik mit der Ausbildung eines ACS assoziiert sind, unabhängig von myokardialen Nekrosemarkern wie Tn-I oder CK. Diese Daten untermauern die These, dass ein ACS mit der Aktivierung von Thrombozyten einhergeht und dies entscheidend für das Fortschreiten der Erkrankung ist.

5.3 Die Rolle des löslichen GPVI

In der vorliegenden Studie wurde die Expression des membrangebundenen GPVI auf der Thrombozytenoberfläche mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers mittels Durchflusszytometrie festgestellt. Die ‚Mittlere Fluoreszenzintensität‘ (MFI) diene als Maß für die GPVI-Expression. Allerdings ist die laufende Messung mit einem Durchflusszytometer im Krankenhausalltag in der Akutsituation nur schwer praktikabel. In Zukunft sollte die Analyse von thrombozytären prognostischen Markern in weiteren klinischen Studien an die Durchführbarkeit in der Krankenhausroutine angepasst werden. Daher könnten sich zukünftige Studien vorzugsweise auf lösliches GPVI konzentrieren, welches sich in einem gewöhnlichen ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) messen lässt, da die Durchflusszytometrie in der Laborroutine normalerweise nicht zu jeder Tageszeit verfügbar ist.

Die kleinere, lösliche 52 kDa –Form des GPVI zirkuliert im Plasma und ist im Gegensatz zur thrombozytären 62 kDa –Form nicht membrangebunden (8). Das lösliche GPVI entsteht durch Abspaltung von Thrombozyten (17). Bei Zentrifugation der Vollblutprobe trennt sich das Blutplasma von den korpuskulären Bestandteilen und kann abgetrennt werden. Mit dem auf diese Weise gewonnenen Plasma kann ein ELISA durchgeführt werden. Das resultierende Ergebnis könnte zügig zur Diagnostik herangezogen werden.

5.4 Bedeutung für die Diagnostik beim akuten Koronarsyndrom

An der koronaren Herzkrankheit (KHK) sowie aus dem daraus resultierenden akuten Koronarsyndrom (ACS) sterben in Deutschland jedes Jahr etwa 150.000 Menschen. Es stellt die häufigste Todesursache in der westlichen Welt dar. Die

Diagnose des ACS erfolgt gegenwärtig über die Anamnese und das klinische Erscheinungsbild, das EKG und über die Laborparameter Kreatinkinase (CK), Kreatinkinase-MB (CKMB), sowie Troponin-I und -T (Tn-I, -T). Das EKG fällt jedoch in 30 % der Fälle falsch negativ aus und ist daher nicht richtungsweisend. Stellen sich Patienten mit Brustschmerzen oder ähnlichen Symptomen in einer Notfallambulanz vor, muss stets eine kardiale Ursache in Erwägung gezogen werden, da eine verfehlte Diagnose eines ACS gravierende Folgen für den Patienten nach sich ziehen kann. Die zuvor genannten Biomarker haben die Möglichkeiten, ein ACS zu diagnostizieren bzw. auszuschließen, bereits erheblich verbessert. Dennoch ist ein normaler Tn-I-Wert keinesfalls mit einer Risikofreiheit für die Ausbildung eines ACS gleichzusetzen. Auf der anderen Seite entstehen nach wie vor hohe Kosten, wenn Patienten im Falle einer unsicheren Befundlage in die Klinik aufgenommen werden bzw. eine Koronarangiographie erhalten müssen (2). Darüber hinaus besteht das Restrisiko eines nicht erforderlichen, invasiven Eingriffs für den Patienten. Weitere, neuere Marker könnten die Möglichkeit eröffnen, die Diagnostik bei Patienten mit Brustschmerzen oder ähnlichen Symptomen zu optimieren und somit den Ausschluss bzw. die Diagnose eines ACS zu erleichtern. Auf diesem Wege könnten unnötige sowie kostspielige Krankenhausaufnahmen und eventuelle Behandlungsmaßnahmen reduziert werden. Auf der anderen Seite könnte sich die Sicherheit bei der Diagnostik des ACS erhöhen und somit die Zahl verfehlter Diagnosen eines ACS weiter verringert werden.

Des Weiteren werden die etablierten Biomarker wie Tn-I und CK frühestens zwei Stunden nach einem koronaren Ereignis positiv und sind bereits ein Anzeichen des stattfindenden Gewebeuntergangs. Daher wären neue Biomarker auch von immenser Bedeutung für die frühzeitige Diagnosestellung eines ACS, um die umgehende und angemessene Therapie einleiten zu können und damit den Untergang des myokardialen Gewebes aufzuhalten.

Durch die vorliegende Studie konnte gezeigt werden, dass die GPVI-Expression mit dem Auftreten eines ACS assoziiert ist und schon zu einem

Zeitpunkt erhöht ist, an dem die etablierten Marker wie Tn-I und CK noch im Normbereich liegen. Dies könnte es ermöglichen, Patienten mit hohem Risiko für ein ACS zu erkennen, bevor die Myokardnekrose eintritt.

Auch andere Biomarker wie Parameter der entzündlichen Reaktion (wie z. B. das C-reaktive Protein, CD40L und der Monozyten-Aktivitätsmarker MAC-1) oder der myokardialen Dehnung (B-Typ natriuretisches Peptid, BNP), die ebenso vor den Markern der Myokardnekrose (wie Tn-I und CK) Erhöhungen aufweisen, könnten nach neuen Untersuchungen eine frühere Einschätzung des Patientenrisikos möglich machen (2, 22, 34, 43, 57). Die bisherigen inflammatorischen Marker haben jedoch gemeinsam, dass sie nicht Thrombozyten-spezifisch sind, sondern von verschiedenen Geweben exprimiert werden.

Mit der vorliegenden Studie wurde der Beweis erbracht, dass mit GPVI ein erster Thrombozyten-spezifischer Marker, welcher eine entscheidende pathophysiologische Rolle bei der Entstehung des ACS spielt, als Biomarker für die bevorstehende Myokardischämie dienen könnte, um die Risikoeinschätzung bei Patienten mit entsprechenden Symptomen zu erleichtern.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Der thrombozytäre Kollagenrezeptor Glykoprotein VI (GPVI) ist entscheidend für die Ausbildung einer arteriellen Thrombose. In der vorliegenden Studie wurde die Expression von membrangebundenem GPVI auf der Thrombozytenoberfläche bei Patienten mit symptomatischer koronarer Herzkrankheit gemessen. Es wurde eine große Gruppe von Patienten untersucht, welche sich alle einer Koronarangiographie unterzogen. Die Oberflächenexpression von Markern für die Aktivierung von Thrombozyten (GPVI, P-Selektin und GPIIb-V-IX) wurde mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern mittels Durchflusszytometrie festgestellt. Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom zeigten bei Aufnahme ins Krankenhaus im Vergleich zu Patienten mit stabiler Angina pectoris eine signifikant erhöhte GPVI-Expression. Die Expression von GPVI korrelierte mit der von P-Selektin. Durch logistische Regressionsanalyse konnte demonstriert werden, dass die GPVI-Expression auf Thrombozyten bei Aufnahme ins Krankenhaus mit dem akuten Koronarsyndrom assoziiert ist, unabhängig von Markern der myokardialen Nekrose wie Troponin-I und Kreatinkinase. Nach zahlreichen anderen Markern (C-reaktives Protein, MAC-1, CD40L) ist GPVI der erste Thrombozyten-spezifische Marker beim akuten Koronarsyndrom. Da GPVI-Werte bei Patienten schon zum frühen Zeitpunkt der Aufnahme in die Klinik erhöht sein können, während sich etablierte Marker der Myokardnekrose noch im Normbereich befinden, könnte GPVI eine frühere Therapieentscheidung beim akuten Koronarsyndrom ermöglichen, noch bevor myokardiale Ischämie eintritt.

Die vorliegende Pilotstudie wurde inzwischen um eine große prospektive, noch nicht veröffentlichte Studie mit über 1000 Patienten ergänzt, welche die vorliegenden Ergebnisse nach derzeitigem Stand der Auswertung bestätigt. Weitere zukünftige Projekte könnten darüber hinaus verstärkt auf das lösliche GPVI eingehen, welches sich im ELISA messen lässt und dadurch in der Akutsituation leichter praktikabel ist.

7 Literaturverzeichnis

- 1) Andrews, R. K., Suzuki-Inoue, K., Shen, Y., Tulasne, D., Watson, S. P., Berndt, M. C. (2002)
Interaction of calmodulin with the cytoplasmic domain of platelet glycoprotein VI
Blood, 99, 4219-4221
- 2) Apple, F. S., Wu, A. H., Mair, J., Ravkilde, J., Panteghini, M., Tate, J., Pagani, F., Christenson, R. H., Mockel, M., Danne, O., Jaffe, A. S.; Committee on Standardization of Markers of Cardiac Damage of the IFCC (2005)
Future biomarkers for detection of ischemia and risk stratification in acute coronary syndrome
Clin. Chem., 51, 810-824
- 3) Asselin, J., Gibbins, J. M., Achison, M., Lee, Y. H., Morton, L. F., Farndale, R. W., Barnes, M. J., Watson, S. P. (1997)
A collagen-like peptide stimulates tyrosine phosphorylation of syk and phospholipase C gamma2 in platelets independent of the integrin alpha2beta1
Blood, 89, 1235-1242
- 4) Baumgartner, H. R. (1977)
Platelet interaction with collagen fibrils in flowing blood. I. Reaction of human platelets with alpha chymotrypsin-digested subendothelium
Thromb. Haemost., 37, 1-16
- 5) Berlanga, O., Tulasne, D., Bori, T., Snell, D. C., Miura, Y., Jung, S., Moroi, M., Frampton, J., Watson, S. P. (2002)
The Fc receptor gamma-chain is necessary and sufficient to initiate signalling through glycoprotein VI in transfected cells by the snake C-type lectin, convulxin.
Eur. J. Biochem., 269, 2951-2960
- 6) Blann, A. D., Nadar, S. K., Lip, G. Y. (2003)
The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease
Eur. Heart J., 24, 2166-2179
- 7) Bori-Sanz, T., Inoue, K. S., Berndt, M. C., Watson, S. P., Tulasne, D. (2003)
Delineation of the region in the glycoprotein VI tail required for association with the Fc receptor gamma-chain
J. Biol. Chem., 278, 35914-35922

- 8) Boylan, B., Chen, H., Rathore, V., Paddock, C., Salacz, M., Friedman, K. D., Curtis, B. R., Stapleton, M., Newman, D. K., Kahn, M. L., Newman, P. J. (2004)
Anti-GPVI-associated ITP: an acquired platelet disorder caused by autoantibody-mediated clearance of the GPVI/FcRgamma-chain complex from the human platelet surface
Blood, 104, 1350-1355
- 9) 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
- 10) Canobbio, I., Balduini, C., Torti, M. (2004)
Signalling through the platelet glycoprotein Ib-V-IX complex.
Cell. Signal., 16, 1329-1344
- 11) Classen, M., Diehl, V. Kochsiek, K. (2004)
Innere Medizin
Urban & Fischer Verlag
München – Jena, 5. Auflage, 221-251
- 12) Clemetson, 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
- 13) Clemetson, J. M., Polgar, J., Magnenat, E., Wells, T. N., Clemetson, K. J. (1999)
The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to FcalphaR and the natural killer receptors
J. Biol. Chem., 274, 29019-29024
- 14) Cosemans, J. M., Kuijpers, M. J., Lecut, C., Loubele, 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

- 15) Furman, M. I., Barnard, M. R., Krueger, L. A., Fox, M. L., Shilale, E. A., Lessard, D. M., Marchese, P., Frelinger, A. L. 3rd, Goldberg, R. J., Michelson, A. D. (2001)
Circulating monocyte-platelet aggregates are an early marker of acute myocardial infarction
J. Am. Coll. Cardiol., 38, 1002-1006
- 16) 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, 283-287
- 17) 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, 3611-3617
- 18) Gawaz, M. (2001)
Blood Platelets
Thieme Verlag
Stuttgart - New York, 4-37
- 19) Gawaz, M. (2004)
Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium
Cardiovasc. Res., 61, 498-511
- 20) Gawaz, M., Langer, H., May, A. E. (2005)
Platelets in inflammation and atherogenesis
J. Clin. Invest., 115, 3378-3384
- 21) Goto, S., Tamura, N., Handa, S., Arai, M., Kodama, K., Takayama, H. (2002)
Involvement of glycoprotein VI in platelet thrombus formation on both collagen and von Willebrand factor surfaces under flow conditions
Circulation, 106, 266-272
- 22) Heeschen, C., Dimmeler, S., Hamm, C. W., van den Brand, M. J., Boersma, E., Zeiher, A. M., Simoons, M. L.; CAPTURE Study Investigators (2003)
Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes
N. Engl. J. Med., 348, 1104-1111
- 23) Hynes, R. O. (1992)
Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion
Cell., 69, 11-25

- 24) Kawai, C. (1994)
Pathogenesis of acute myocardial infarction. Novel regulatory systems of bioactive substances in the vessel wall
Circulation, 90, 1033-1043
- 25) Kieffer, N., Phillips, D. R. (1990)
Platelet membrane glycoproteins: functions in cellular interactions
Annu. Rev. Cell. Biol., 6, 329-357
- 26) 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
- 27) 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 (2001)
J. Biol. Chem., 276, 33947-33951
- 28) Lindemann, S. W., Weyrich, A. S., Zimmerman, G. A. (2005)
Signaling to translational control pathways: diversity in gene regulation in inflammatory and vascular cells
Trends Cardiovasc. Med., 15, 9-17
- 29) Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M., Myrtek, D. (2006)
Der Experimentator 'Immunologie'
Spektrum Akademischer Verlag
Heidelberg, 2. Auflage, 75-101
- 30) 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
- 31) 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, 397-399

- 32) McEver, R. P. (1994)
Role of selectins in leukocyte adhesion to platelets and endothelium
Ann. N. Y. Acad. Sci., 714, 185-189
- 33) McGregor, L., Martin, J., McGregor, J. L. (2006)
Platelet-leukocyte aggregates and derived microparticles in inflammation, vascular remodelling and thrombosis
Front. Biosci., 11, 830-837
- 34) Meisel, S. R., Shapiro, H., Radnay, J., Neuman, Y., Khaskia, A. R., Gruener, N., Pauzner, H., David, D. (1998)
Increased expression of neutrophil and monocyte adhesion molecules LFA-1 and Mac-1 and their ligand ICAM-1 and VLA-4 throughout the acute phase of myocardial infarction: possible implications for leukocyte aggregation and microvascular plugging
J. Am. Coll. Cardiol., 31, 120-125
- 35) Nieswandt, B., Brakebusch, C., Bergmeier, W., Schulte, V., Bouvard, D., Mokhtari-Nejad, R., Lindhout, T., Heemskerk, J. W., Zirngibl, H., Fassler, R. (2001)
Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen
EMBO. J., 20, 2120-2130
- 36) Nieswandt, B., Watson, S. P. (2003)
Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor?
Blood, 102, 449-461
- 37) Nurden, A. (1994)
Hemostasis and Thrombosis
Bloom, A., Forbes, C. D. eds.,
New York – Churchill Livingstone, 3rd edn., 259-285
- 38) Ollikainen, E., Mikkelsson, 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-aged men
Atherosclerosis, 176, 95-99
- 39) Penz, S., Reiningger, A. J., Brandl, R., Goyal, P., Rabie, T., Bernlochner, I., Rother, E., Goetz, C., Engelmann, B., Smethurst, P. A., Ouwehand, 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

- 40) 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, 4246-4253
- 41) Ridker P. M., Buring, J. E., Rifai, N. (2001)
Soluble P-selectin and the risk of future cardiovascular events
Circulation, 103, 491-495
- 42) Ridker, P. M., Cushman, M., Stampfer, M. J., Tracy, R. P., Hennekens, C. H. (1997)
Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men
N. Engl. J. Med., 1997, 336, 973-979
- 43) Ridker, P. M., Hennekens C. H., Buring J. E., Rifai, N. (2000)
C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women.
N. Engl. J. Med., 342, 836-843
- 44) Rifai N., Ridker, P. M. (2001)
High-sensitivity C-reactive protein: a novel and promising marker of coronary heart disease
Clin. Chem., 47, 403-411
- 45) Ross, R. (1999)
Atherosclerosis--an inflammatory disease
N. Engl. J. Med., 340, 115-126
- 46) Ruggeri, Z. M. (1997)
Mechanisms initiating platelet thrombus formation
Thromb. Haemost., 78, 611-616
- 47) Ruggeri, Z. M. (2002)
Platelets in atherothrombosis
Nat. Med. 8, 1227-1234
- 48) 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, 224-229

- 49) Santoro, S. A., Walsh, J. J., Staatz, W. D., Baranski, K. J. (1991)
Distinct determinants on collagen support alpha 2 beta 1 integrin-mediated platelet adhesion and platelet activation
Cell Regul., 2, 905-913
- 50) Sarma, J., Laan, C. A., Alam, S., Jha, A., Fox, K. A., Dransfield, I. (2002)
Increased platelet binding to circulating monocytes in acute coronary syndromes
Circulation, 105, 2166-2171
- 51) Savage, B., Saldivar, E., Ruggeri, Z. M. (1996)
Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor
Cell., 84, 289-297
- 52) Sugiyama, T., Okuma, M., Ushikubi, F., Sensaki, S., Kanaji, K., Uchino, H. (1987)
A novel platelet aggregating factor found in a patient with defective collagen-induced platelet aggregation and autoimmune thrombocytopenia
Blood, 69, 1712-1720
- 53) Suzuki-Inoue, K., Inoue, O., Frampton, J., Watson, S. P. (2003)
Murine GPVI stimulates weak integrin activation in PLCgamma2^{-/-} platelets: involvement of PLCgamma1 and PI3-kinase.
Blood, 102, 1367-1373
- 54) 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
- 55) Wagner, D. D. (2005)
New links between inflammation and thrombosis
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 25, 1321-1324
- 56) Weiss, H. J. (1975)
Platelet physiology and abnormalities of platelet function (first of two parts)
N. Engl. J. Med., 293, 531-541
- 57) Wu, A. H. (2005)
Markers for early detection of cardiac diseases
Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl., 240, 112-121

- 58) Zheng, Y. M., Liu, C., Chen. H., Locke. D., Ryan, J. C., Kahn, M. L. (2001)
Expression of the platelet receptor GPVI confers signaling via the Fc
receptor gamma-chain in response to the snake venom convulxin but not to
collagen
J. Biol. Chem., 276, 12999-13006

8 Danksagung

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

Ein besonderer Dank gebührt meinem unmittelbaren Betreuer Dr. med. Boris Bigalke, der durch seine Unterstützung sehr zum Zustandekommen dieser Doktorarbeit beigetragen hat und zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Verfügung stand.

Weiterhin danke ich herzlich den Laborassistentinnen Heike Runge und Iris Schäfer für deren exzellente fachliche Unterstützung bei der Arbeit im Labor.

Zu guter Letzt möchte ich vor allem meinen Eltern dafür danken, dass sie mich nicht nur während dieser Doktorarbeit, sondern während meiner gesamten Ausbildung in jeder Hinsicht unterstützen.

Lebenslauf

Zur Person

Andreas Schönfeld

- geboren am 22. November 1982 in Heidelberg
- Familienstand: ledig

Ausbildungsweg

1989 - 1993 Grundschule Gaiberg

1993 - 2002 Helmholtz - Gymnasium Heidelberg

- Auslandsjahr in Indiana, USA 1999/2000
- Allgemeine Hochschulreife am 21. Juni 2002

07/2002 - 04/2003 Grundwehrdienst als Sanitäter in Ulm

- nach der Grundausbildung sechsmonatige Tätigkeit in der Notfallaufnahme im Bundeswehrkrankenhaus Ulm
- Ausbildung zum Rettungssanitäter

04/2003 – 10/2009 Studium der Humanmedizin an der Universität Tübingen

- Ärztliche Vorprüfung am 30. März 2005
- Famulaturen in der Kardiologie, Infektiologie, Chirurgie-Ambulanz und Radiologie
- Auslandjahr in Guadalajara, Mexiko, 02/2007 – 12/2007
- Praktisches Jahr
 - Chirurgie: McGill University, Montreal, Kanada / Kreiskliniken Reutlingen
 - Tropenmedizin: Universitätsklinikum Tübingen
 - Innere Medizin: Kantonsspital Graubünden, Chur
- Ärztliche Prüfung am 28. Oktober 2009