

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin III
(Schwerpunkt: Kardiologie und Angiologie)

**Polymorphismen des GP6 Gens in Assoziation
mit der thrombozytären Expression des
Glykoproteins VI und kardiovaskulären
Ereignissen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Schäfer, Katharina

2022

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. T. Geisler

2. Berichterstatterin: Professorin Dr. K. Klingel

Tag der Disputation: 27.10.2021

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	iii
Abbildungsverzeichnis	v
Tabellenverzeichnis	vi
1 Einleitung	1
1.1 Der Thrombozyt allgemein	1
1.2 Thrombozyten und Hämostase	3
1.2.1 Primäre Hämostase	4
1.2.2 Sekundäre Hämostase	5
1.3 Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche	7
1.4 Das Glykoprotein VI	8
1.4.1 Molekularer Aufbau des Glykoproteins VI und die durch das Glykoprotein VI induzierte Signalkaskade	8
1.4.2 Funktion des Glykoproteins VI	11
1.5 Thrombozyten, Glykoprotein VI und kardiovaskuläre Ereignisse . . .	13
1.6 GP6 Gen und Einzelnukleotidpolymorphismen	15
1.6.1 Exkurs in die zugrunde liegende Genetik	15
1.6.2 Das GP6 Gen	18
1.7 Fragestellung	20
2 Material und Methoden	22
2.1 Patientenpopulation und Einschlusskriterien	22
2.2 Nachverfolgungszeitraum der Patienten	22
2.3 Follow-up Ereignisse	23
2.3.1 Akutes Koronarsyndrom	23
2.3.2 Ischämischer Schlaganfall	24
2.3.3 Schwere kardiale Komplikation	25

2.4	Material	25
2.4.1	Laborgeräte	25
2.4.2	Verbrauchsmaterial	26
2.4.3	Substanzen	26
2.4.4	Monoklonale Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse	27
2.5	Methoden	27
2.5.1	Durchflusszytometrie	27
2.5.2	Genanalyse und Polymorphismen im GP6 Gen	30
2.5.3	Gewinnung der Blutproben	31
2.5.4	Vorbereitung der Blutproben	31
2.5.5	Antikörperfärbung	31
2.5.6	Analyse der Proben mittels Durchflusszytometrie	32
2.5.7	Statistische Analyse	32
3	Ergebnisse	33
3.1	Patientencharakteristika	33
3.2	Nachverfolgung der Patienten und klinische Ereignisse	37
3.3	Linkage Disequilibrium der analysierten Einzelnukleotidpolymorphismen	38
3.4	Uni- und multivariate Analyse	39
3.5	Ergebnisse der FACS-Analyse und Glykoprotein VI-Expressionslevel	41
4	Diskussion	47
4.1	Einzelnukleotidpolymorphismus rs1613662	48
4.2	Einzelnukleotidpolymorphismus rs1654419	53
4.3	Einzelnukleotidpolymorphismus rs1671153	54
4.4	Einzelnukleotidpolymorphismus rs12610286	54
4.5	Linkage Disequilibrium	55
4.6	Uni- und multivariate Analyse	56
4.7	Limitationen dieser Studie	56
5	Zusammenfassung und Ausblick	58
6	Literaturverzeichnis	62
7	Erklärung zum Eigenanteil	82

Abkürzungsverzeichnis

ACS	acute coronary syndrome
ADP	Adenosindiphosphat
Ak	Antikörper
ANOVA	analysis of variance
a.u.	willkürliche Einheit („arbitrary units“)
DNA	Desoxyribonukleinsäure („deoxyribonucleic acid“)
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CPDA	Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin
DM	Diabetes mellitus
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EF	Ejektionsfraktion
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward Scatter
FXa	aktivierter Faktor X
GP	Glykoprotein
GPVI	Glykoprotein VI
GP6	Glykoprotein 6 Gen
HLP	Hyperlipoproteinämie
IAP	instabile Angina pectoris
Ig	Immunglobulin
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
JAM	junctional adhesion-molecule-A
KHK	Koronare Herzkrankheit
MACE	major adverse cardiac event
MALDI-TOF MS	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - time of flight mass spectrometry

Abkürzungsverzeichnis

MFI	mean fluorescence intensity
NSTE-ACS	Non-ST-Elevation Acute Coronary Syndrome
NSTEMI	Nicht-ST-Hebungsinfarkt
PBS	phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PECAM-1	platelet endothelial cell adhesion molecule-1
RGS	regulators of G-protein signaling
SAP	stabile Angina pectoris
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus („single nucleotide polymorphism“)
SSC	Side Scatter
STEMI	ST-Hebungsinfarkt
TIA	transitorische ischämische Attacke
TRAP	Thrombin Receptor Activating Peptide
vWF	von-Willebrand-Faktor
4c9	Glykoprotein VI-Antikörper

Abbildungsverzeichnis

1.1	Ruhender und aktivierter Thrombozyt	3
1.2	Sekundäre Hämostase	6
1.3	Schematischer molekularer Aufbau des Glykoprotein VI-Rezeptors . .	10
1.4	Intrazelluläre Signalkaskade und ihre Auswirkungen	11
1.5	Schematische Darstellung von Auszügen der Gensequenz des GP6 Gens	17
2.1	Schematische Darstellung FACS-Analyse	28
2.2	Schematische Ergebnisdarstellung mittels Dot-Plot	30
3.1	Graphische Darstellung der FACS-Analyse einer exemplarischen Probe	41
3.2	Histogramme der Fluoreszenzintensität der FACS-Analyse einer exemplarischen Probe	42
3.3	Graphische Darstellung der GPVI-Expressionslevel des rs1613662 - Durchflusszytometrie	43
3.4	Graphische Darstellung der GPVI-Expressionslevel des rs1654419 - Durchflusszytometrie	44
3.5	Graphische Darstellung der GPVI-Expressionslevel des rs1671153 - Durchflusszytometrie	45
3.6	Graphische Darstellung der GPVI-Expressionslevel des rs12610286 - Durchflusszytometrie	46

Tabellenverzeichnis

1.1	Ausgewählte thrombozytäre Oberflächenrezeptoren	7
1.2	Übersicht der untersuchten Einzelnukleotidpolymorphismen des GP6 Gens	18
2.1	Verwendete Laborgeräte	25
2.2	Verwendete Verbrauchsmaterialien	26
2.3	Verwendete Substanzen	26
3.1	Patientencharakteristika Übersicht	34
3.2	Patientencharakteristika rs1613662	35
3.3	Patientencharakteristika rs1654419	35
3.4	Patientencharakteristika rs1671153	36
3.5	Patientencharakteristika rs12610286	36
3.6	Klinische Ereignisse nach 12 Monaten Nachverfolgung - separate Ana- lyse der Einzelnukleotidpolymorphismen	37
3.7	Analyse des Linkage Disequilibriums	38
3.8	Ergebnisse der univariaten Analyse	40
3.9	Ergebnisse der multivariaten Analyse	40
3.10	Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der FACS-Analyse einer ex- emplarischen Probe	42
3.11	GPVI-Expressionslevel rs1613662	43
3.12	GPVI-Expressionslevel rs1654419	44
3.13	GPVI-Expressionslevel rs1671153	45
3.14	GPVI-Expressionslevel rs12610286	46

1 Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen verursachen in den westlichen Industrieländern die meisten Todesfälle.

Der 31. Deutsche Herzbericht 2019 schreibt in seinem Bericht über die zehn häufigsten Todesursachen im Jahr 2018, dass an erster Stelle der häufigsten Todesursachen in Deutschland die chronisch ischämische Herzkrankheit mit 76 273 (8 %) Verstorbenen und an zweiter Stelle der akute Myokardinfarkt (Herzinfarkt) mit 46 207 (4,8 %) Verstorbenen liegt [1].

Aufgrund dieser hohen Mortalitätsrate bei den Herz-Kreislaufkrankungen ist die Forschung nach dem besseren Verständnis der Entstehung und der Therapie für die Bevölkerung von großer Bedeutung. Diese wissenschaftliche Arbeit beschäftigt sich mit Polymorphismen des GP6 Gens in Assoziation mit der thrombozytären Expression des Glykoproteins VI und kardiovaskulären Ereignissen. Glykoprotein VI ist ein Kollagenrezeptor der äußeren Thrombozytenmembran und spielt in der physiologischen Hämostase eine wichtige Rolle. Insbesondere ist das Glykoprotein VI entscheidend für die Initiierung der Aktivierung der Thrombozyten und hieraus folgender Thrombusbildung im Bereich verletzter Gefäßwandareale. Zudem ist Glykoprotein VI an der Entstehung thrombembolischer und ischämischer kardiovaskulärer Ereignisse beteiligt. Genetische Aspekte des Glykoproteins VI und hieraus resultierende funktionale und klinische Auswirkungen wurden im Laufe der Zeit evident.

Die erfolgreiche Forschung im genetischen Bereich könnte ein Baustein für eine personalisierte Medizin und damit einen Weg für eine individuelle Therapie für die Patienten vorgeben oder zumindest eine Prognose für den weiteren Verlauf der Erkrankung weisen.

1.1 Der Thrombozyt allgemein

Thrombozyten stellen die kleinsten korpuskulären Bestandteile des Blutes dar und werden durch Abschnürung von Megakaryozyten im Knochenmark gebildet [2, 3].

Die physiologische Funktion der Thrombozyten besteht darin, Blutungen durch Bildung eines Gefäßwandthrombus zu stillen. Auf diese Weise sollen Blutverluste auf ein Minimum beschränkt und die Integrität der Blutgefäße aufrechterhalten werden [3]. Thrombozyten leisten somit einen wichtigen Beitrag zur Aufrechterhaltung von Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des Gewebes im menschlichen Körper [3].

Die Blutstillung wird durch ein enges Zusammenspiel zwischen den Thrombozyten, dem Endothel sowie den plasmatischen Faktoren gewährleistet [3, 4]. Bei Verletzung der Gefäßwand bilden die Thrombozyten zusammen mit solchen plasmatischen Gerinnungsfaktoren eine Art Pfropf, welcher die Läsion abdichtet [3, 4]. Im physiologischem Zustand halten sich hierbei pro- und antithrombotische Komponenten die Waage und der gebildete Gefäßthrombus bleibt auf den Bereich des verletzten Gefäßwandabschnittes begrenzt [4, 5].

Ruhende Thrombozyten können durch Agonisten wie Thrombin [6] und Adenosindiphosphat (ADP) oder durch Adhäsionsvorgänge, wie z.B. Adhäsion an verletztes Gefäßendothel oder an bereits aktivierte Thrombozyten, aktiviert werden [3]. Abbildung 1.1 zeigt elektronenmikroskopische Bilder eines ruhenden und eines aktivierten Thrombozyten, sowie ein Fibrinnetz und ein sich hierin befindlicher Thrombozyt. Thrombozyten verfügen in ihrem Inneren über diverse Speichergranula [3]. Diese Granula enthalten verschiedene Substanzen, die beispielsweise proaggregatorisch wirksam sind (ADP, Ca^{2+} , Serotonin) oder Einfluss auf biologische Funktionen, wie Thrombozytenadhäsion, -aggregation und Inflammation, haben [3].

Thrombozyten tragen darüber hinaus durch ihre Fähigkeit proangiogenetische Zytokine und Wachstumsfaktoren freisetzen zu können zur Aufrechterhaltung der Intaktheit von Blutgefäßen bei [3].

Neben ihrer Funktion der Aufrechterhaltung vaskulärer Integrität sind Thrombozyten auch an der Pathogenese der Atherosklerose und thrombembolischer Ereignisse beteiligt [3, 7–14]. Die hierbei entstehenden Blutgerinnsel können zu lebensbedrohlichen Krankheitsbildern, wie dem akuten Myokardinfarkt und ischämischen Schlaganfall führen [12].

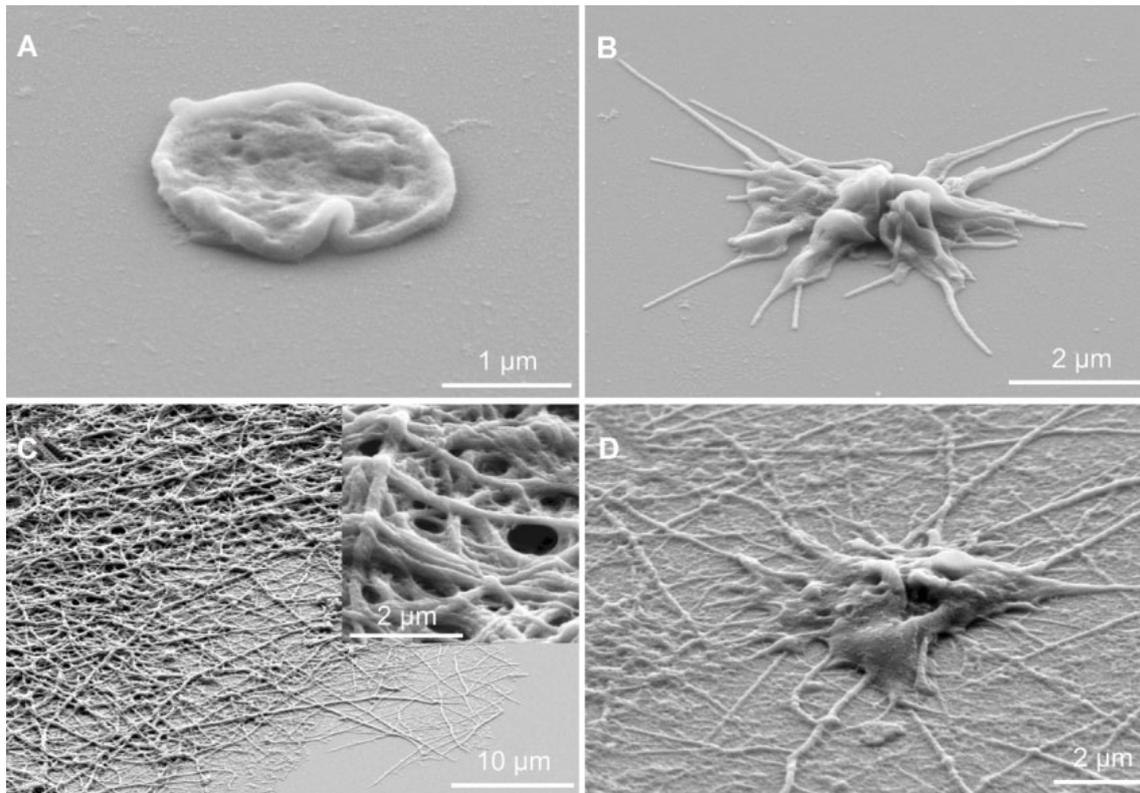


Abbildung 1.1: Mit einem Durchmesser von 2-4 μm stellen Thrombozyten die kleinsten korpuskulären Blutbestandteile dar [2]. Im peripheren Blut eines Menschen finden sich physiologischerweise 150.000 bis 400.000 Thrombozyten pro μl Blut. Nach Aktivierung bilden Thrombozyten Pseudopodien aus. Die Abbildungen A bis D zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen eines ruhenden Thrombozyten (A), eines durch Kollagen aktivierten Thrombozyten mit Pseudopodien (B), eines Fibrinnetzwerks (C) und eines aktivierten Thrombozyten mit Pseudopodien im Fibrinnetzwerk (D). Abbildung aus [15]. Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Eble.

1.2 Thrombozyten und Hämostase

Thrombozyten stellen, wie bereits dargelegt, eine wichtige Komponente im physiologischen Prozess der Blutstillung dar, welcher auch als Hämostase bezeichnet wird. Die Hämostase ist ein komplexer Vorgang, der sich in primäre und sekundäre Hämostase gliedern lässt, welche fließend ineinander übergehen. Diese sollen nun im Folgenden genauer erläutert werden.

1.2.1 Primäre Hämostase

Durch Läsionen der Gefäßwand jedweder Ursache wird die endotheliale Integrität des Blutgefäßes aufgehoben und es werden auf diese Weise Komponenten der extrazellulären Matrix freigelegt. Dieser Vorgang stellt den Hauptauslöser für die Bildung eines hämostatischen Thrombus dar [7]. Dieser soll zu einem primären Verschluss der verletzten Gefäßstelle führen und exzessive Blutverluste verhindern.

Der Vorgang der primären Hämostase beinhaltet mehrere Teilschritte, bei denen die Thrombozyten und deren Interaktion mit dem Gefäßendothel im Vordergrund stehen [3]. Diese Schritte lassen sich in Thrombozytenadhäsion, -aktivierung und -aggregation zusammenfassen und resultieren in der Bildung eines thrombozytenreichen, eines sogenannten weißen, Thrombus [3].

Unter den Bedingungen eines hohen Blutflusses [16] müssen die im Blut zirkulierenden Thrombozyten in einem ersten Schritt zunächst an die betroffene Gefäßstelle rekrutiert werden [3, 9, 16]. Dies geschieht durch Interaktionen zwischen dem thrombozytären GPIIb/IIIa alpha Rezeptor und dem von-Willebrand-Faktor (vWF), welcher am freigelegten Kollagen der extrazellulären Matrix vorliegt [3, 16, 17]. Die Wichtigkeit dieser initialen Bindung wird bei Patienten deutlich, die einen Defekt im GPIIb/IIIa alpha Rezeptor aufweisen und aus diesem Grund unter einer erhöhten Blutungsneigung leiden [3, 18]. Die Bindung zwischen dem GPIIb/IIIa alpha Rezeptor und dem vWF verfügt jedoch über eine große Dissoziationsrate und kann daher keine stabile Adhäsion vermitteln [16, 19]. Dies macht zusätzliche Ligand-Rezeptor-Interaktionen zwischen den Thrombozyten und der exponierten extrazellulären Matrix erforderlich [17]. Durch diese schwache Bindung „rollen“ die Thrombozyten in gewisser Weise zunächst über die beschädigte Gefäßstelle und werden verlangsamt [16]. Nun ergibt sich die Möglichkeit, dass das ebenfalls auf der Thrombozytenoberfläche lokalisierte Glykoprotein VI direkt an seinen Liganden das freigelegte Kollagen der extrazellulären Matrix binden kann [4, 20–22]. Diese direkte Glykoprotein VI-Kollageninteraktion ist unabdingbar für die initiale Thrombozytenrekrutierung und die darauffolgende Initiierung der stabilen Thrombozytenadhäsion und -aggregation, sowie des Thrombuswachstums [14, 19].

Durch den Kontakt von Glykoprotein VI mit Kollagen werden intrazelluläre Signalkaskaden induziert, welche dazu führen, dass die auf der Thrombozytenmembran lokalisierten Integrine $\alpha2\beta1$ und $\alphaIIb\beta3$ ihren Zustand von einem niedrig-affinen in einen hoch-affinen Status ändern [22]. Die Bindungen von Integrin $\alpha2\beta1$ an Kollagen und von Integrin $\alphaIIb\beta3$ an den vWF stellen die Grundlage der stabilen, irre-

versiblen Adhäsion dar [17]. Zudem initiiert die Glykoprotein VI-Signalkaskade (s. Kap. 1.4.1) die Aktivierung und Formänderung der adhärenen Thrombozyten sowie die Ausschüttung von Inhaltsstoffen aus thrombozytären Speichergranula [3, 4, 19]. Lösliche Agonisten wie Adenosindiphosphat (ADP) und Thromboxan A₂ werden in die unmittelbare Umgebung freigesetzt, wo sie den Aktivierungsprozess verstärken und die Rekrutierung noch ruhender Thrombozyten sowie das Thrombuswachstum fördern [3, 19, 23, 24]. Darüber hinaus wird die Aktivierung der Integrine induziert, was zum Adhäsionsprozess beiträgt [19, 22, 25, 26]. Die verbesserte Adhäsion ihrerseits führt wiederum zu einer verbesserten Glykoprotein VI-Kollageninteraktion. Es kommt zur vermehrten Signalwirkung und somit zu einem Prozess, der sich selbst verstärkt [19, 27, 28].

Noch im Blut zirkulierende Thrombozyten treten durch die aktivierten Integrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, auch als GPIIb/IIIa bezeichnet, mit den bereits an der Gefäßläsion adhärenen Thrombozyten in Verbindung [4]. Nur wenn die Thrombozyten aktiviert sind, kann die irreversible Verknüpfung von Thrombozyten miteinander via GPIIb/IIIa und Fibrinogen erfolgen [3, 4].

1.2.2 Sekundäre Hämostase

Der primär entstandene thrombozytenreiche Thrombus ist relativ instabil [3]. Erst in der sekundären Hämostase kommt es zur Konsolidierung dieses Thrombus und zu einer effizienten und anhaltenden Blutstillung [3]. Die sekundäre Hämostase besteht aus einer komplexen Gerinnungskaskade, die in der Bildung von Thrombusstabilisierenden Fibrinnetzen resultiert [3]. Thrombozyten tragen entscheidend zur Initiierung dieser Gerinnungskaskade bei [3, 4, 29]. Sie stellen hierbei die katalytische Oberfläche für das Zusammenfügen von funktionstüchtigen Enzymkomplexen der plasmatischen Gerinnungskaskade dar, welche für die Bildung von alpha Thrombin benötigt wird [3, 4, 9, 30, 31]. Dieses Thrombin gehört zu den potentesten Plättchenaktivatoren [3, 4, 6]. Darüber hinaus stabilisiert es den bereits existenten primären weißen Thrombus durch die Bildung von Fibrinpolymeren [3, 4]. Hieraus entstehen feste Fibrinnetze und es kommt zur Bildung des stabilen, sekundären Thrombus [3, 4].

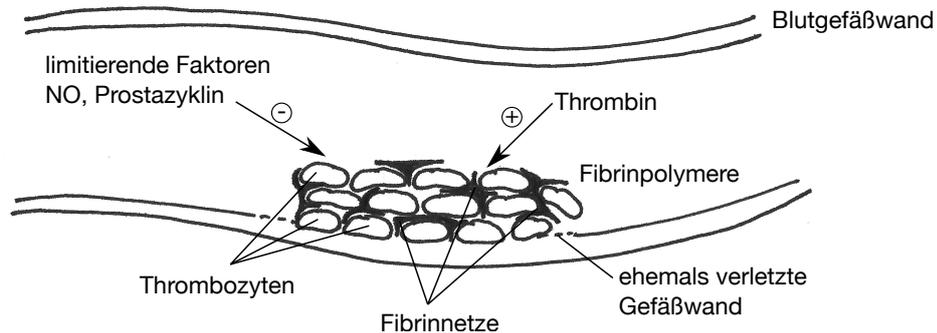


Abbildung 1.2: Nach Bildung des primären, thrombozytenreichen Thrombus erfolgt in der sogenannten sekundären Hämostase die Konsolidierung des entstandenen Thrombus. Im Rahmen der plasmatischen Gerinnungskaskade wird Thrombin generiert, welches den Thrombus durch die Bildung von Fibrinnetzen festigt (Schematische Darstellung angelehnt an Abbildung 5 aus [32]).

Physiologischerweise tragen mehrere Faktoren zur Begrenzung des entstehenden Thrombus auf die verletzte Gefäßstelle bei [3–5]. Thrombozyten verfügen über Mechanismen, welche die Antwort auf Kollagen und damit den Thrombus in seinem Ausmaß begrenzen [4, 7, 33]. Das Risiko einer unkontrollierten Thrombusformation soll somit vermieden werden. Zusätzlich tragen Endothelzellen zur Aufrechterhaltung einer Balance zwischen Blutfluss und Blutstillung bei und stellen die Aktivierung der Thrombozyten unter eine strenge, negative Kontrolle [3–5, 7, 34]. Dies erfolgt durch hemmende Substanzen wie beispielsweise Prostazyklin und Stickstoffmonoxid (NO) [3, 5, 34], welche zur Limitierung der Thrombusbildung auf das verletzte Gefäßareal beitragen [3–5, 7]. Abbildung 1.2 stellt die sekundäre Hämostase in einer Übersicht schematisch dar.

Thrombozyten spielen nicht nur eine wichtige Rolle bei der Hämostase, sondern Thrombozyten sind auch durch die Sekretion diverser Enzyme, wie beispielsweise Elastase und hydrolysierende Thrombozytenenzyme [3], auch an der Pathogenese atherosklerotischer Prozesse beteiligt [3, 8]. In atherosklerotisch veränderten Arterien kann es im Rahmen einer Thrombozytenaktivierung auch zur Thrombusbildung und Okklusion von Blutgefäßen kommen [7, 8, 12]. Diese arteriellen Blutgerinnsel bestehen hauptsächlich aus Thrombozyten und Fibrin [7] und können thromboembolische Ereignisse, wie beispielsweise einen akuten Myokardinfarkt oder ischämischen Schlaganfall, auslösen [12].

1.3 Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche

Thrombozyten sind anukleäre Zellen [3]. In Thrombozyten ist die Proteinsynthese daher in der Weise, wie sie in anderen größeren Blutzellen stattfindet, nicht möglich [3]. Aus diesem Grund verfügen Thrombozyten von vornherein über eine große Vielzahl an verschiedenen Oberflächenrezeptoren, mit denen sie mit ihrer Umwelt in Kontakt treten können [3, 4, 35]. Mit diesen Rezeptoren sind Thrombozyten in der Lage mit anderen Thrombozyten, Bestandteilen der extrazellulären Matrix, anderen plasmatischen Komponenten, Endothelzellen oder gar Leukozyten zu interagieren [3, 4, 35, 36].

Die Glykoproteine, welche auf der thrombozytären Plasmamembran sitzen, werden anhand ihrer molekularen Struktur in verschiedene Gruppen eingeteilt. So verfügen Thrombozyten beispielsweise über Integrine, Leuzin-reiche Glykoproteine, Selektine und immunglobulinähnliche Rezeptoren [3]. In Tabelle 1.1 findet sich ein Auszug wichtiger Rezeptoren der thrombozytären Oberfläche.

Den Kollagenrezeptoren auf der thrombozytären Membranoberfläche kommt eine besondere Bedeutung zu, da sie an der initialen Kontaktherstellung zwischen Thrombozyten und einer verletzten Gefäßwand beteiligt sind und so die Ausbildung eines hämostatischen Thrombus ermöglichen [4, 19, 22, 25, 35]. Die Kollagene der extrazellulären Matrix, welche bei endothelialen Läsionen dem Blutfluss exponiert werden, sind wichtige Aktivatoren von Thrombozyten [4, 35, 41]. Thrombozyten verfügen über zwei Hauptrezeptoren, die Kollagen binden: das Integrin $\alpha 2\beta 1$, welches zur stabilen Adhäsion beiträgt, sowie das Glykoprotein VI, welches hauptsächlich für Signalwirkung und konsekutiver Thrombozytenaktivierung verantwortlich ist [4, 19, 35]. Abgesehen hiervon kann der GP Ib-V-IX Komplex als in-

Klassifizierung	Elektrophoretische Klassifizierung	Ligand	Anzahl pro Thrombozyt
Integrine: $\alpha 2\beta 1$	GPIa-IIa	Kollagen	1000
Integrine: $\alpha I Ib\beta 3$	GPIIb-IIIa	vWF, Fb, u.a.	60.000 - 100.000
Leuzin-reiche Glykoproteine	GPIb-V-IX	vWF, Thrombin	25.000
Selektine	P-Selektin	PSGL-1, u.a.	12.000
immunglobulinähnliche Adhäsionsrezeptoren	GPVI	Kollagen	3700-9600

Tabelle 1.1: Glykoproteine der Thrombozytenoberfläche (modifiziert nach Tabelle 4.1 auf Seite 31 in [3]) Anmerkung: vWF: von-Willebrand-Faktor, Fb: Fibrinogen, PSGL-1: P-Selektin Glycoprotein Ligand 1, GPVI: Glykoprotein VI. [3, 37–40]

direkter Kollagenrezeptor bezeichnet werden, da er über den von-Willebrand-Faktor als überbrückendes Molekül ebenfalls indirekt an Kollagen binden kann [35]. In dieser wissenschaftlichen Arbeit wird der Fokus auf das Glykoprotein VI gelegt und in den nachfolgenden Kapiteln ausführlicher dargestellt.

1.4 Das Glykoprotein VI

Das Glykoprotein VI ist ein bedeutender Kollagenrezeptor der äußeren Thrombozytenmembran. Seine Expression ist auf Megakaryozyten und Thrombozyten begrenzt [19, 42–44]. Tabelle 1.1 liefert einen kurzen Überblick über die Glykoproteine der Thrombozytenoberfläche und deren Liganden.

1982 wurde Glykoprotein VI durch Clemetson et al. mittels 2-D-Gel-Elektrophorese entdeckt [45]. Bei Untersuchungen eines Patienten mit autoimmuner Thrombozytopenie konnten Autoantikörper gegen ein ca. 60-65 kDa großes Protein gefunden werden, welches sich als Glykoprotein VI herausstellen sollte [46]. Die Thrombozyten dieses Patienten waren nicht in der Lage, korrekt mit Kollagen zu interagieren. Diese frühen Forschungsergebnisse deuteten erstmals darauf hin, dass es sich bei Glykoprotein VI um einen wichtigen Kollagenrezeptor handeln muss [46].

In der Folge wurden einige Fälle von Patienten mit erniedrigten Glykoprotein VI-Levels untersucht, wobei sich hier lediglich eine milde Blutungstendenz abzeichnete [19, 47–49]. Die Vermutung, dass es sich bei Glykoprotein VI um einen Kollagenrezeptor handelt, wurde zudem dadurch unterstützt, dass diese Patienten eine gestörte Antwort auf eine Kollagenstimulation aufwiesen [19, 47–49].

Bald wurde deutlich, dass das Glykoprotein VI sogar eine Schlüsselrolle in der Gerinnungskaskade einnimmt [19]. Es trägt zur initialen Thrombozytenadhäsion an die verletzte Gefäßwand bei [14, 19, 22] und ist maßgeblich an der Induktion der Folgeschritte beteiligt, welche zur Thrombozytenaktivierung, -aggregation und Bildung eines hämostatischen Thrombus führen [4, 19].

1.4.1 Molekularer Aufbau des Glykoproteins VI und die durch das Glykoprotein VI induzierte Signalkaskade

Glykoprotein VI ist ein Kollagenrezeptor, welcher direkt mit Kollagen interagiert [3, 19, 47]. Glykoprotein VI wird aufgrund seines molekularen Aufbaus und seiner Funktionsweise zu den immunglobulinähnlichen Rezeptoren gezählt [44]. Die Ent-

deckung der molekularen Struktur von Glykoprotein VI gelang Clemetson et al. 1999 [44], als das menschliche Glykoprotein VI erfolgreich geklont werden konnte. Glykoprotein VI besteht aus 339 Aminosäuren und verfügt über ein Molekulargewicht von 60-65 kDa [19, 44, 45]. Die Anzahl an Glykoprotein VI-Rezeptoren auf der äußeren Membran eines Thrombozyten variiert [19, 50]. In einer quantitativen Analyse konnte gezeigt werden, dass pro Thrombozyt hochgerechnet bis zu 9600 Glykoprotein VI-Rezeptoren exprimiert werden [38–40].

Auf der Thrombozytenoberfläche kommt Glykoprotein VI sowohl als monomere, als auch als dimere Form vor [21, 51, 52]. Die dimere Form des Glykoproteins VI bindet hierbei mit deutlich höherer Affinität an Kollagen, als die monomere Form [51]. Die dimere Glykoprotein VI-Form wird auch auf ruhenden Thrombozyten exprimiert, allerdings in geringerer Anzahl [53]. Zusätzlich kommt es zur Dimerisierung einzelner Glykoprotein VI-Rezeptoren, sowohl im Rahmen der Thrombozytenaktivierung [52–54], als auch ADP-getriggert [54]. Die Thrombozytenadhäsion an Kollagen führt zudem auch zur Bildung regelrechter Glykoprotein-VI-Dimer-Cluster, was die Kollagenavidität zusätzlich erhöht [52].

Abbildung 1.3 bildet den schematischen molekularen Aufbau des Glykoprotein VI ab. Auf der Thrombozytenmembran bildet Glykoprotein VI einen funktionalen Komplex mit einer sogenannten FcR gamma-Kette [55–57]. Diese fungiert als signaltransduzierender Teil des Rezeptorkomplexes [19, 58–60]. Der Glykoprotein VI-Rezeptor selbst besitzt zwei immunoglobulin-C2-ähnliche Extrazellulärdomänen, welche durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind und an einem Muzin-ähnlichen Stiel befestigt sind [19]. Über einen transmembranären Anteil wird die Verbindung zu einem kurzen, zytosolischen Schwanz hergestellt [42, 44, 61]. Die transmembranäre Region wird für die Assoziation mit der FcR gamma-Kette benötigt [62–64]. Der zytosolische Schwanz des Glykoprotein VI-Rezeptors verfügt ebenfalls über Interaktionsstellen, u.a. für die FcR gamma-Kette aber auch andere Proteine [19, 60, 63].

Die Aktivierung des Glykoprotein VI-Rezeptors löst umfangreiche Schritte aus, die letztlich zur Thrombozytenaktivierung und Thrombozytenaggregation führen und für eine erfolgreiche Hämostase notwendig sind. Im ersten Schritt der durch Glykoprotein VI induzierten Signalkaskade werden bestimmte Komponenten der FcR gamma-Kette durch die Tyrosinkinasen Fyn und Lyn phosphoryliert [19].

Diese Komponenten sind die „immunoreceptor tyrosin-based activation motifs“ (ITAM). Im zweiten Schritt wird daraufhin die Tyrosinkinase Syk gebunden und aktiviert [19]. Dadurch werden komplexe intrazelluläre Vorgänge im Thrombozyten

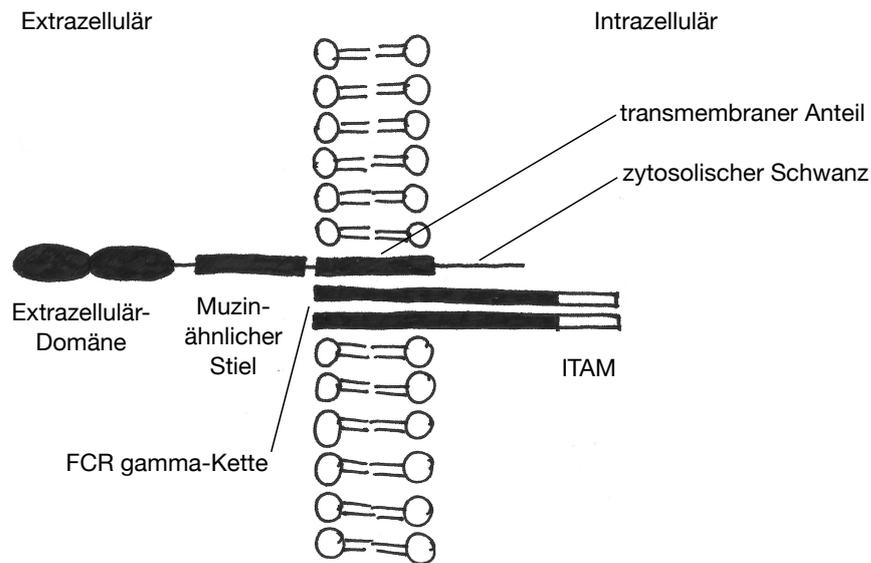


Abbildung 1.3: Glykoprotein VI wird aufgrund seines molekularen Aufbaus zu den immunglobulinähnlichen Rezeptoren gezählt. Auf der äußeren Thrombozytenmembran bildet Glykoprotein VI einen funktionalen Komplex mit der FcR gamma-Kette, welche als signaltransduzierender Teil des Rezeptors fungiert. Zwei immunglobulin-C2-ähnliche Extrazellulärdomänen sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden und hängen an einem Muzin-ähnlichen Stiel. Dieser wiederum tritt über den transmembranären Rezeptoranteil mit dem zytosolischen Schwanz im Inneren des Thrombozyten in Verbindung. Die Aktivierung des Glykoprotein VI Rezeptors führt zur Phosphorylierung bestimmter Komponenten der FcR gamma-Kette (ITAM = „immunoreceptor tyrosine-based activation motif“) durch die Tyrosinkinasen Fyn und Lyn, was eine wichtige Komponente der durch das Glykoprotein VI induzierten intrazellulären Signalkaskade darstellt. Die Signalkaskade mündet in der Aktivierung von Thrombozyten und Granulafreisetzung. Schematische Abbildung, angelehnt an Abbildung 1 aus [19].

ausgelöst, welche letztlich zur Aktivierung verschiedener Effektorenzyme, wie z.B. kleine G-Proteine und Phospholipase-Cy2, führt. Dieser gesamte Prozess zielt darauf ab, die Thrombozyten zu aktivieren und Granula freizusetzen [19, 52, 54, 65–67].

Glykoprotein VI existiert darüber hinaus auch als kleinere, lösliche Form (55 kDa), die im Plasma zirkuliert [68, 69]. Lösliches Glykoprotein VI entsteht durch Abspaltung, sogenanntes „shedding“, von der Thrombozytenoberfläche [70]. Dies kann durch verschiedene Faktoren ausgelöst werden, wie beispielsweise durch die Bindung an Kollagen [68, 71], hohe Scherkräfte [72] und durch den aktivierten Faktor X (FXa) [38, 68, 70, 73, 74].

1.4.2 Funktion des Glykoproteins VI

Glykoprotein VI spielt eine wichtige Rolle bei der primären Hämostase und insbesondere bei der Initiierung der Thrombozytenaktivierung, wie es bereits in Kapitel 1.2. beschrieben wurde. Fibrilläres Kollagen, der Ligand des Glykoprotein VI-Rezeptors, ist Bestandteil der extrazellulären Matrix und wird bei Gefäßwandschäden dem Blutstrom exponiert [35, 41]. Im Blut zirkulierende Thrombozyten binden mittels Glykoprotein VI an hierdurch freigelegtes Kollagen, was zu deren Adhäsion, aber vor allem zu deren Aktivierung und Aggregation führt [4, 19].

Die direkte Bindung von Glykoprotein VI an freigelegtes Kollagen ist entscheidend für die erste lockere Bindung der Thrombozyten an die verletzte Gefäßwand [19, 22]. Diese Interaktion führt zur Initiierung einer komplexen intrazellulären Signalkaskade [19, 54, 65–67]. Diese resultiert unter anderem in der Thrombozytenaktivierung und Überführung der Integrine $\alpha 2\beta 1$ und $\alpha \text{IIb}\beta 2$ in einen hochaffinen Zustand [3, 19, 26]. Die so aktivierten Integrine können nun eine feste dauerhafte Plättchenadhäsion vermitteln [4, 19, 22, 25, 75]. Darüber hinaus induziert die Glykoprotein VI-vermittelte Signalkaskade eine Formänderung der Thrombozyten [3, 4]. Es kommt zur Pseudopodienausbildung und Degranulation von ADP und Thromboxan A₂, was die Thrombozytenaggregation weiter fördert [19, 76–78].

Die Aktivierung der Thrombozyten durch ADP (oder auch TRAP, thrombin receptor-activating peptide) führt zusätzlich zu einer Verstärkung der thrombozytären Glykoprotein VI-Expression [38, 54]. Die Abfolge von Thrombozytenadhäsion, Signalkaskade und konsekutiver Thrombusbildung wird in Abbildung 1.4 skizziert.

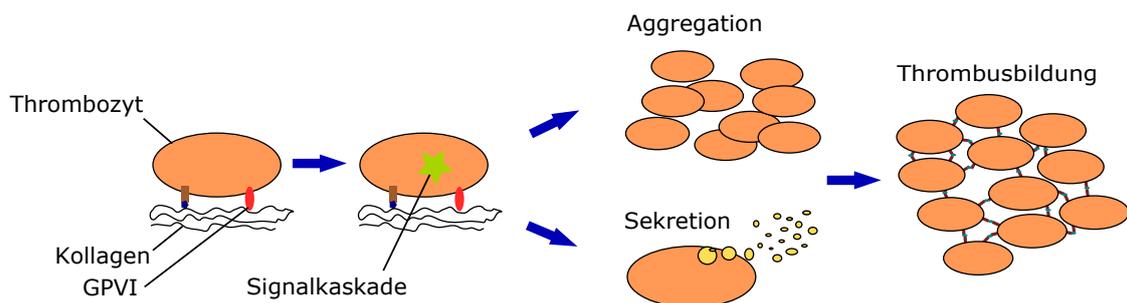


Abbildung 1.4: Bindet Glykoprotein VI an seinen Liganden Kollagen, wird eine komplexe intrazelluläre Signalkaskade in Gang gesetzt. Diese führt zur Thrombozytenaktivierung, Sekretion (Granulafreisetzung) und Thrombozytenaggregation. Die Schritte münden schließlich in der Thrombusbildung.

Glykoprotein VI und seine Signalwirkung sind also elementar für den Adhäsionsprozess und die nachfolgenden Schritte, die für die Bildung eines Thrombus im Rahmen der Hämostase benötigt werden. Dies wurde durch diverse Studien gezeigt: Massberg et al. stellten beispielsweise fest, dass Thrombozyten in Mäusen in Abwesenheit von Glykoprotein VI keine stabile Adhäsion an geschädigten Arterienwänden aufweisen [14]. Die Wichtigkeit der durch Glykoprotein VI induzierten Signalwirkung und deren Auswirkungen auf die Thrombozytenfunktion wurden durch die Forschungsergebnisse von Nieswandt et al. demonstriert [22]. In den Untersuchungsmodellen konnten Thrombozyten unter simulierten Flussbedingungen nicht an Kollagen binden oder aggregieren, wenn Glykoprotein VI antikörpervermittelt ausgeschaltet wurde, oder komplett fehlte. Die Wichtigkeit von Glykoprotein VI wurde zudem dadurch unterstrichen, dass bei reduziertem Glykoprotein VI bzw. FcR gamma-Kette die Thrombozyten trotz Vorhandensein von Integrin $\alpha 2\beta 1$, einem weiteren Adhäsionsrezeptor, nicht zur Aggregation fähig waren [22]. Dies stellt Glykoprotein VI als Schlüsselrolle im Ablauf des Adhäsionsprozesses dar.

Darüber hinaus zeigten die Untersuchungen von Moroi und Jung et. al an einer Patientin mit diskreter Verlängerung der Blutungszeit, dass die Menge an Glykoprotein VI ihrer Thrombozyten um etwa 50% reduziert war [47]. Diese Thrombozyten waren nicht in der Lage Kollagen zu binden. Eine kollageninduzierte Thrombozytenaggregation blieb aus [47]. Dies indiziert, dass Glykoprotein VI als wichtiger Initiator der Thrombozytenaktivierung, welche in die Aggregation mündet, zu sehen ist. Ähnliche Resultate ergaben sich bei den Untersuchungen von Thrombozyten eines weiteren Patienten, welche nur rund 10% der normalen Glykoprotein VI-Menge aufwiesen [48].

Diese Beobachtungen konnten unter künstlichen Bedingungen nachgestellt und bestätigt werden. In einem Experiment mit simulierten Blutflusssituationen konnten Thrombozyten mit mangelndem membranären Glykoprotein VI praktisch nicht an eine kollagenbedeckte Fläche binden [79].

Eine in 2015 publizierte Studie von Mammadova-Bach et al. gewann neue Kenntnisse über die Funktion von Glykoprotein VI und identifizierte es zudem als Rezeptor für polymerisiertes Fibrin [80]. Unabhängig von der Bindung an Kollagen führte die Interaktion von Glykoprotein VI mit polymerisiertem Fibrin in den Untersuchungen zu einer Verstärkung der Bildung von Thrombin und Rekrutierung weiterer Thrombozyten an den entstehenden Thrombus an der verletzten Gefäßwandstelle [80].

Neben oben genannten Aspekten existieren ebenfalls Mechanismen, im Sinne negativer Regulatoren, welche die Glykoprotein VI-Signalwirkung kontrollieren und sie so in Grenzen halten [5, 7, 30, 33, 81, 82]. Auf diese Weise soll eine übermäßige Aktivität und hieraus potenziell entstehende, negative Folgen vermieden werden [5, 30]. Beispielhaft zu nennen sind vor allem die Freisetzung der Thrombozytenantagonisten Stickstoffmonoxid (NO) und Prostaglandin I₂ durch intaktes Endothel sowie das Vorhandensein intrathrombozytärer Kontrollpunkte. Zu diesen intrathrombozytären Kontrollpunkten zählen beispielsweise die Aufrechterhaltung niedriger Ca²⁺-Konzentrationen in ruhenden Thrombozyten und intrathrombozytäre regulatorische Moleküle, wie z.B. „regulators of G-protein signaling“ (RGS), „junctional adhesion-molecule-A“ (JAM), „platelet endothelial cell adhesion molecule-1“ (PECAM-1) [5].

Es wird zudem diskutiert, dass das Abspalten („shedding“) des Glykoproteins VI von der Thrombozytenoberfläche und somit die Bildung von löslichem Glykoprotein VI eine weitere Art sein könnte, die Thrombozytenreaktivität herunterzuregulieren [5, 30, 71, 83]. Eine experimentelle Studie von Rabie et al. zeigte zudem, dass Mechanismen existieren, welche Glykoprotein VI auch in vivo herunterregulieren können [84].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Glykoprotein VI eine wichtige Komponente beim Adhäsionsvorgang der Thrombozyten an verletztes Endothel darstellt. Darüber hinaus ist Glykoprotein VI noch viel entscheidender für die Aktivierung der Thrombozyten mit hieraus resultierender Thrombusbildung. Kurzum verfügt Glykoprotein VI über eine zentrale Rolle im Prozess der Hämostase.

1.5 Thrombozyten, Glykoprotein VI und kardiovaskuläre Ereignisse

Glykoprotein VI ist neben seiner physiologischen Funktion bei der Hämostase auch wesentlich an der Pathogenese thrombembolischer Ereignisse, wie beispielsweise dem akuten Myokardinfarkt und ischämischen zerebralen Schlaganfall, beteiligt [7, 11, 85]. Diese Krankheiten stellen weltweit die führende Todesursache dar [12, 86, 87].

Eine verstärkte Reagibilität der Thrombozyten und überschießende Thrombozytenaktivierung stellen Hauptfaktoren bei der Entstehung solcher atherothrombo-

tischen Komplikationen dar [12, 38, 88]. Beim akuten Koronarsyndrom und dem ischämischen Schlaganfall ist die verstärkte Thrombozytenaktivierung zudem mit einem schlechteren klinischen Outcome assoziiert [38, 89–91]. Thrombembolische Komplikationen entstehen in der Folge arterieller Thrombosen, welche sich oft im Bereich rupturierter atherosklerotischer Plaques bilden [12, 30]. Durch die Plaque-ruptur wird thrombogenes Material dem Blutstrom exponiert, werden Thrombozyten an die Läsion rekrutiert und die Thrombusbildung in Gang gesetzt [7, 12]. Glykoprotein VI ist bei der Entstehung solch pathologischer Thrombosen und bei der Atheroprogression maßgeblich beteiligt [10, 38, 92, 93]. Auch bei hohen Scherkräften, wie sie typischerweise im Bereich arterieller Plaques vorkommen [94], ist Glykoprotein VI in der Lage, an die reichlich im Plaque vorkommenden Kollagene zu binden und so zur Thrombozytenaktivierung zu führen [10, 12, 14, 38, 92]. Diese zentrale Funktion von Glykoprotein VI bei der Adhäsion von Thrombozyten an Plaque-Komponenten wurde durch verschiedene *in vitro* Untersuchungen offenbart [30, 95–97].

Diverse *in vivo* Studien lieferten weitere Belege für die Schlüsselrolle von Glykoprotein VI. Im Bereich von rupturierten Plaques konnte eine Thrombusbildung verhindert werden, indem Glykoprotein VI durch verschiedene Weisen ausgeschaltet wurde, wie beispielsweise durch Inhibierung mittels spezifischer Glykoprotein VI-Antikörper oder durch Verwendung von Glykoprotein VI-Knockout-Mäusen [14, 30, 38, 98, 99]. In einem weiteren *in vivo* Modell schienen Glykoprotein VI-Knockout-Mäuse immun gegenüber der Induktion eines thrombembolischen Ereignisses zu sein [100]. In der Studie bewahrte das Fehlen von Glykoprotein VI die Mäuse vor einer tödlichen Lungenarterienembolie [100].

Weiterführende klinische Studien zeigten, dass die thrombozytäre Glykoprotein VI-Expression bei Patienten mit kardiovaskulärer Erkrankung erhöht ist [38, 101, 102], ebenso beim Auftreten eines akuten Koronarsyndroms [91]. Zudem war eine erhöhte thrombozytäre Glykoprotein VI-Expression in einer Studie bei Patienten mit symptomatischer koronararterieller Herzerkrankung mit einem schlechteren klinischen Outcome assoziiert [103]. Glykoprotein VI fungierte hier als prognostischer Biomarker für das Auftreten von kardiovaskulärem Tod [103]. Die Glykoprotein VI-Expression konnte darüber hinaus in Studien von Bigalke und Geisler et al. erfolgreich als potenzieller neuer Marker für ein drohendes akutes Koronarsyndrom erprobt werden [91, 104]. Schlussendlich bewährte sich Glykoprotein VI als vielversprechender diagnostischer Indikator beziehungsweise Marker bei Patienten mit

akutem Koronarsyndrom und nicht eindeutigen EKG Veränderungen, was diese Diagnosestellung unterstützen konnte [105].

Auch bei der Pathogenese des ischämischen Schlaganfalls scheint Glykoprotein VI eine entscheidende Komponente zu sein [30, 106, 107]. Sowohl beim ischämischen Schlaganfall, als auch bei der transitorischen ischämischen Attacke konnten in Studien erhöhte Glykoprotein VI-Expressionslevel nachgewiesen werden [106]. Des Weiteren gibt es Untersuchungen, die darauf hinweisen, dass die thrombozytäre Expression von Glykoprotein VI an der Ausprägung der Infarktgröße beteiligt ist [30, 108]. Man geht hierbei davon aus, dass die Glykoprotein VI-vermittelte Thrombozytenaktivierung zur Freisetzung proinflammatorischer Botenstoffe und so zur, am ehesten entzündlich vermittelten, Gehirnschädigung im Rahmen des Reperfusionsschadens beiträgt [30, 109–112].

1.6 GP6 Gen und Einzelnukleotidpolymorphismen

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem GP6 Gen, das die Grundlage des Glykoprotein VI- Rezeptors auf genetischer Ebene darstellt. Genetische Varianten, hier begrenzt auf Einzelnukleotidpolymorphismen, des GP6 Gens sollen in Hinblick auf eine mögliche Assoziation mit der thrombozytären Glykoprotein VI-Expression und kardiovaskulären Ereignissen untersucht werden.

1.6.1 Exkurs in die zugrunde liegende Genetik

Die Erbinformation eines Individuums wird von sogenannten Chromosomen getragen, die sich im Zellkern befinden. In den kernhaltigen Zellen des Menschen befinden sich 46 Chromosomen, die paarweise angeordnet sind. Die ersten 22 Chromosomenpaare sind durchnummeriert und werden als Autosomen bezeichnet. Die Geschlechtschromosomen bilden das Paar Nummer 23. Die Chromosomen bestehen aus zwei langen Strängen aus Desoxyribonukleinsäure (DNA), die als Doppelhelix angeordnet sind [113–115].

Unter einem Gen versteht man einen Abschnitt auf der DNA, der beispielsweise bestimmte Proteine kodiert oder über regulatorische Funktionen verfügen kann. Auf einem Chromosom nimmt ein solches Gen in der Regel einen ganz definierten Abschnitt ein, der auch als Genlocus oder Genort bezeichnet wird [113–115].

Die paarweise vorliegenden Chromosomen passen hinsichtlich Form, Struktur und

Abfolge der Genorte genau zueinander. Man nennt diese daher auch homologe („gleichartige“) Chromosomen [113–115].

Ein wichtiger Baustein der DNA sind die Nukleinbasen. Im menschlichen Organismus existieren hiervon vier verschiedene Nukleinbasen: Adenin (A), Guanin (G), Thymin (T) und Cytosin (C) [113–115].

Die Erbinformation wird durch die spezielle Abfolge der vier Nukleinbasen auf dem DNA-Strang festgelegt. Die Doppelhelix besteht aus zwei DNA-Strängen. Einer wird als codogener Strang bezeichnet, da dieser als Matrize für die Transkription und Translation im Prozess der Proteinbiosynthese dient. Der andere Strang der Doppelhelix wird als nichtcodogener Strang bezeichnet [113–115].

Die Nukleinbasen sind auf der Doppelhelix immer komplementär angeordnet. Dabei steht Adenin immer Guanin gegenüber und Thymin steht Cytosin gegenüber. Die Basenabfolge des codogenen Stranges wird damit auf dem nichtcodogenen Strang komplementär abgebildet. Da Chromosomen immer paarweise vorliegen, gibt es auch zwei codogene Stränge [113–115].

Die Variation eines einzelnen Basenpaares innerhalb eines definierten DNA-Abschnittes eines Gens wird als Einzelnukleotidpolymorphismus (aus dem Griechischen „Vielgestaltigkeit“) bezeichnet. Das bedeutet, dass an einer bestimmten Nukleinbasenposition in der menschlichen Erbanlage zum Beispiel Guanin (G) steht und dass bei anderen Menschen an dieser Stelle ein Adenin (A) steht. Dies ist beispielhaft am GP6 Gen in Chromosom 19 in Abbildung 1.5 dargestellt.

Diese Varianten an einem bestimmten Genort werden auch als Allele bezeichnet (exemplarisch hier Allel „G“ und Allel „A“). Steht an beiden codogenen Strängen an derselben Basenposition dieselbe Nukleinbase, wird dies als homozygot bezeichnet (s. Abb. 1.5). Sind diese Nukleinbasen verschieden, wird dies als heterozygot bezeichnet [113–117].

Als Haplotyp bezeichnet man eine Variante einer Nukleotidsequenz auf dem gleichen Chromosom im Genom.

In dieser Arbeit wurde das GP6 Gen untersucht, das dem Glykoprotein VI-Rezeptor auf genetischer Ebene zugrunde liegt. Dieses Gen befindet sich auf dem Chromosom Nummer 19 [42, 118]. Es werden hierbei vier verschiedene Einzelnukleotidpolymorphismen betrachtet, die an vier verschiedenen Stellen der Doppelhelix auf dieser Gensequenz lokalisiert sind. Siehe hierzu auch die Tabelle 1.2 und die Abbildung 1.5.

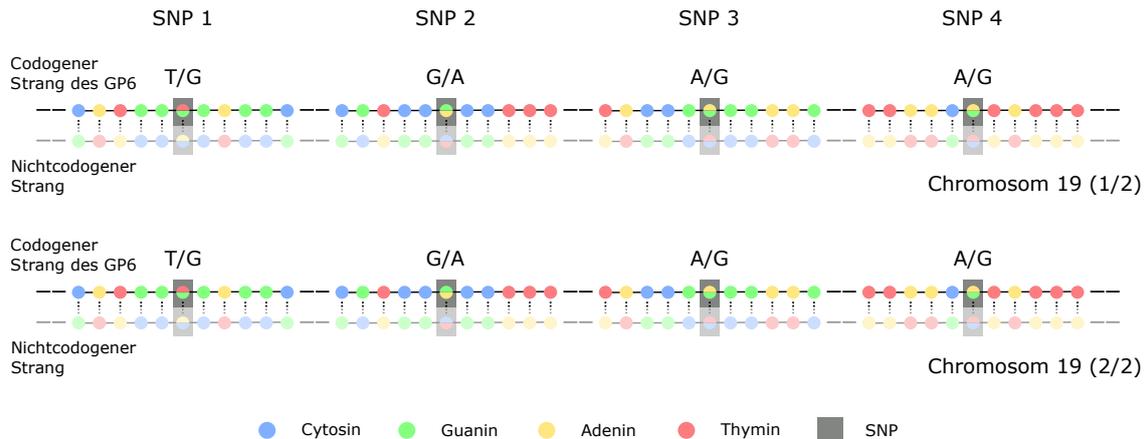


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung von Auszügen der Gensequenz des GP6 Gens auf dem Chromosom 19 mit den vier hier untersuchten Einzelnukleotidpolymorphismen (SNP 1-4, vgl. Tab. 1.2). Die Darstellung beinhaltet beide Chromosomen mit ihrer Doppelhelix und dem jeweiligen codogenen und nichtcodogenen Strang. Vor und nach jedem SNP sind die Basensequenzen auf den codogenen Strängen identisch. Jeder explizite SNP unterscheidet sich nur in einem einzigen Basenpaar. Vergleicht man die beiden codogenen Stränge für das explizite SNP 1 in dieser Abbildung ergeben sich die Kombinationen TT, TG und GG.

Jedes dieser einzelnen Einzelnukleotidpolymorphismen verfügt wiederum über unterschiedliche Varianten (unterschiedliche Allele). Diese Allele treten in einer Population in unterschiedlichen Häufigkeiten auf. Das häufigste Allel wird als Major-Allel und das am wenigsten vorkommende Allel als Minor-Allel bezeichnet. Für jeden Einzelnukleotidpolymorphismus kann dementsprechend ein Major- und ein Minor-Allel definiert werden [117].

Die hier untersuchten vier verschiedenen Einzelnukleotidpolymorphismen des GP6 Gens sind die folgenden:

- rs1613662
- rs1654419
- rs1671153
- rs12610286

In der Tabelle 1.2 ist die genaue Position dieser Einzelnukleotidpolymorphismen auf dem Chromosom 19 und das dazugehörige Major- und Minor-Allel angegeben.

	SNP	Lokalisation	Major/Minor Allel	SNP Sequenz
SNP 1	rs1671153	chr19:55015821	T/G	CATGG ^T _G GAGGC
SNP 2	rs1654419	chr19:55024513	G/A	CGTCC ^G _A CCTTT
SNP 3	rs1613662	chr19:55025227	A/G	TACCG ^A _G GGAAG
SNP 4	rs12610286	chr19:55030031	A/G	TTAAC ^A _G TATTT

Tabelle 1.2: Die Tabelle stellt die in dieser Arbeit untersuchten Einzelnukleotidpolymorphismen vor. Aufgeführt sind ihre genaue Lokalisation auf dem Chromosom 19. Die Einzelnukleotidpolymorphismen sind hier nach ihrer Lokalisation geordnet. Es werden die jeweiligen Major- und Minor-Allele aufgezeigt und jeweils fünf Nukleobasen vor und nach dem Einzelnukleotidpolymorphismus aufgeführt (SNP-Sequenz). Daten aus [117, 119–122].

1.6.2 Das GP6 Gen

Das GP6 Gen (GP6 = offizielles Symbol, HUGO Gene Nomenclature Committee [123]) liegt dem thrombozytären Kollagenrezeptor Glykoprotein VI auf genetischer Ebene zugrunde. Es ist auf dem langen Arm des Chromosoms 19, Region 1, Band 3 (19q13.4), lokalisiert [42, 118]. Bereits in den 1990er Jahren begannen die Analysen des Glykoprotein VI-kodierenden Gens: Clemetson et al. gelang 1999 neben der Darlegung des molekularen Aufbaus des Rezeptors auch die Klonung der cDNA von Glykoprotein VI [19, 44]. Untersuchungen der Forschungsgruppe von Ezumi et al. resultierten 2000 in der Offenbarung der genomischen Struktur des GP6 Gens und der Genlokalisierung auf dem Chromosom 19 [35, 118]. Schon früh konnte gezeigt werden, dass das GP6 Gen polymorph ist, was bedeutet, dass mehrere Genvarianten existieren [124]. Bis heute wurde bereits eine Vielzahl an Einzelnukleotidpolymorphismen (SNP) entdeckt [124, 125]. Bei einem Einzelnukleotidpolymorphismus handelt es sich um eine Variation eines einzigen Basenpaares innerhalb eines DNA-Stranges und demzufolge um eine genetische Variante [126].

Einzelnukleotidpolymorphismen können unabhängig von ihrer Lokalisation im Gen als potenzielle Risikomarker untersucht bzw. angewandt werden.

Genetische Komponenten sind bereits bei der koronaren Herzerkrankung (KHK) und der arteriellen Thrombose bekannt [127–131]. In einigen Studien scheinen Einzelnukleotidpolymorphismen von diversen thrombozytären Oberflächenproteinen einen Einfluss auf die Rezeptorfunktionalität, Rezeptorexpression und das Auftre-

ten thrombembolischer Ereignisse zu haben [132]. In einer Metaanalyse hingegen konnten klinische Auswirkungen einiger dieser genetischen Varianten zum Teil nicht bestätigt werden [125, 133].

Aufgrund der maßgeblichen Beteiligung von Glykoprotein VI bei der Thrombozytenaktivierung im Rahmen der physiologischen Hämostase (s. Kap. 1.2), sowie bei der Entstehung thrombembolischer Ereignisse (s. Kap. 1.5), rückte das zugrunde liegende Gen GP6 in den Fokus genomweiter Assoziationsstudien. Diese Studien untersuchen einen möglichen Einfluss dieser genetischen Variationen auf die Glykoprotein VI- und Thrombozytenfunktion, sowie daraus resultierende, potenzielle klinische Auswirkungen [124, 132, 134–136]. Im Rahmen dieser genomweiten Assoziationsstudien konnten einige GP6 Genpolymorphismen identifiziert werden, die mit einem erhöhten Risiko für ischämische und thrombotische Ereignisse einhergehen [117, 124, 125, 136–140].

Im Gegensatz dazu gibt es Untersuchungen, die bei bestimmten Einzelnukleotidpolymorphismen keinen Zusammenhang mit dem Auftreten kardiovaskulärer beziehungsweise thrombembolischer Ereignisse herstellen konnten [136, 141–143], oder gar ein vermindertes Risiko hierfür feststellen konnten [134, 138, 141, 143].

Funktionsstudien demonstrieren, dass genetische Varianten im GP6 Gen zu einer veränderten thrombozytären Glykoprotein VI-Expression, sowie zu funktionalen Unterschieden führen können [40, 132, 144, 145].

Darüber hinaus existieren einige wenige Fallberichte, die Patienten mit genetischen Mutationen des Glykoprotein VI beschreiben, welche unter einer Blutgerinnungsstörung leiden [146–148].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die bisherigen Untersuchungen des GP6 Gens teilweise widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich der Auswirkung der genetischen Variationen auf die Entstehung pathologischer Ereignisse ergeben. Da das Glykoprotein VI jedoch eine Schlüsselrolle bei der Blutgerinnung und der Entstehung thrombembolischer Ereignisse darstellt, sind weiterführende Untersuchungen auf genetischer Ebene des Glykoprotein VI ein bedeutsames Forschungsgebiet mit möglicherweise lebenswichtiger klinischer Relevanz.

Diese Doktorarbeit untersucht den Zusammenhang zwischen den folgenden vier Einzelnukleotidpolymorphismen des GP6 Gens, rs12610286, rs1613662, rs1654419 und rs16711523.

Diese vier genetischen Varianten wurden in bisherigen wissenschaftlichen Studien in der Regel isoliert betrachtet. Das hier vorliegende Studiendesign umschließt ne-

ben der isolierten Betrachtung auch mögliche Auswirkungen des gemeinsamen Vorkommens (Kombination) der hier untersuchten Einzelnukleotidpolymorphismen bei einem Individuum im Hinblick auf das Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen. Zusätzlich wurde der Zusammenhang zwischen den Einzelnukleotidpolymorphismen und der thrombozytären Glykoprotein VI-Expression untersucht.

1.7 Fragestellung

Das Glykoprotein VI ist ein thrombozytärer Kollagenrezeptor und ist wichtiger Bestandteil der physiologischen Hämostase. Es spielt ebenfalls bei der Pathogenese thrombembolischer und ischämischer kardiovaskulärer Ereignisse, wie beispielsweise dem akuten Myokardinfarkt und ischämischen Schlaganfall, eine große Rolle. Aus diesen Gründen rückte das Glykoprotein VI bereits vor vielen Jahren in den Fokus klinischer Forschungen und wird bis heute untersucht.

In der westlichen Welt stellen trotz medizinischen Fortschritts der akute Myokardinfarkt und der ischämische Schlaganfall weiterhin eine der häufigsten Todesursachen dar und erfordern die Weiterentwicklung therapeutischer und präventiver Ansätze.

Glykoprotein VI könnte bei der Behandlung und Prävention kardiovaskulärer Ereignisse als potenzielles therapeutisches Target Verwendung finden. Mittels Glykoprotein VI-Inhibition konnte bereits in in-vivo Untersuchungen das Entstehen arterieller Thrombosen reduziert werden, ohne dabei ein hohes Blutungsrisiko zu verursachen.

Auf genetischer Ebene liegt dem Glykoprotein VI das polymorphe GP6 Gen zugrunde. Bisher wurden diverse Einzelnukleotidpolymorphismen dieses Gens identifiziert und Zusammenhänge zu kardiovaskulären Ereignissen hergestellt. Auch hinsichtlich der Rezeptorfunktionalität und Rezeptorexpression scheint es genetische Komponenten zu geben, die hierauf Einfluss nehmen. Die Analyse des genetischen GP6 Genprofils eines Patienten könnte demnach in Zukunft eine nützliche Komponente personalisierter Medizin und Therapie darstellen.

In dieser wissenschaftlichen Arbeit soll untersucht werden, ob es einen Zusammenhang zwischen Genvariationen des GP6 Gens und der thrombozytären Expression des Glykoprotein VI-Rezeptors sowie dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse gibt.

Hierfür wurden die vier Einzelnukleotidpolymorphismen, rs12610286, rs1613662,

rs1654419 und rs1671153 ausgewählt. Bei Patienten mit symptomatischer koronarer Herzerkrankung wurde die genomische DNA aus Ethylendiamintetraazetat (EDTA)- Blut isoliert und die Genotypisierung mit MALDI-TOF Massenspektrometrie durchgeführt (s. Kap. 2.5.2). Die thrombozytäre Glykoprotein VI-Expression wurde mittels Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) ermittelt. Weiterhin wurden die Patienten für zwölf Monate nachverfolgt und das Auftreten thrombembolischer und ischämischer Ereignisse sowie Todesfälle erfasst.

Diese vier Einzelnukleotidpolymorphismen werden hierbei einzeln und auch in der Gesamtschau auf oben genannte Fragestellung analysiert und diskutiert.

2 Material und Methoden

In diesem Kapitel wird auf die Patientenpopulation mit ihren Erkrankungen eingegangen und es werden das für die Analysen benötigte Material und die angewandten Untersuchungsmethoden vorgestellt.

In die Patientenpopulation sind beide Geschlechter aufgenommen worden. In dieser Arbeit wird sprachlich das generische Maskulin verwendet und bezieht beide Geschlechter mit ein, außer diese sind ausdrücklich als männlich oder weiblich definiert.

2.1 Patientenpopulation und Einschlusskriterien

In die Studie wurden 690 Patienten eingeschlossen, die in der kardiologischen Abteilung der Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Tübingen mit symptomatischer koronarer Herzkrankheit aufgenommen und unabhängig von dieser Studie einer medizinisch notwendigen Koronarangiographie unterzogen wurden. Die Rekrutierung dieser Patienten für die Studie erfolgte im Zeitraum zwischen November 2011 und Januar 2013. Die Studienaufnahme geeigneter Patienten wurde bei gegebener Einverständniserklärung konsekutiv durchgeführt. Die Zustimmung für die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität und des Universitätsklinikums Tübingen erteilt (Nummer des Ethikantrags: 270/2011B01 vom 09.08.2011).

2.2 Nachverfolgungszeitraum der Patienten

Die in der Studie eingeschlossenen Patienten wurden jeweils über einen Zeitraum von zwölf Monaten nachverfolgt. Die Informationen wurden telefonisch eingeholt oder mittels Krankengeschichte, die über das elektronische Patientendatensystem der Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Tübingen einsehbar ist, oder

vorliegenden Arztbriefen eruiert. Erhoben und analysiert wurden folgende Ereignisse ischämischen Hintergrundes: Myokardinfarkt, ischämischer Schlaganfall (Stroke) und erneute Revaskularisation. Todesfälle wurden ebenfalls erfasst.

2.3 Follow-up Ereignisse

Im Zeitraum der Nachverfolgung der Patienten wurde das Auftreten ausgewählter ischämischer Ereignisse dokumentiert. Hierzu zählen der akute Myokardinfarkt, der ischämische Schlaganfall und erneute Durchführung einer Revaskularisation der Koronarien. Todesfälle wurden ebenfalls verzeichnet.

2.3.1 Akutes Koronarsyndrom

Beim akuten Koronarsyndrom (ACS, „acute coronary syndrome“) handelt es sich um die Phasen der koronaren Herzkrankheit, welche für den Patienten lebensbedrohlich sein können. Hierzu zählen die instabile Angina pectoris sowie der akute Myokardinfarkt, welcher in Hebungs- und Nicht-Hebungsinfarkte eingeteilt werden kann [149–151]. Da diese Unterformen fließend ineinander übergehen, werden die Patienten gemäß ihren Veränderungen im Elektrokardiogramm (EKG) in zwei Kategorien eingeteilt: EKG mit ST-Hebungen, also ST-Hebungsinfarkt (STEMI), und EKG ohne ST-Hebungen, zusammengefasst als Nicht-ST-Hebungsinfarkt (NSTEMI) und instabiler Angina pectoris (IAP) [149–151]. Der akute Thoraxschmerz als Leitsymptom ist bei allen drei Gruppen vorhanden [149, 152]. Dieser kann durch vier verschiedene klinische Formen definiert sein und bedarf immer einer weiterführenden klinischen Abklärung [152–154]:

1. > 20 Minuten anhaltende Angina pectoris im Ruhezustand
2. neu aufgetretene schwerwiegende Angina pectoris (CCS III, siehe auch [155])
3. Zustand nach kürzlich eingetretener Destabilisierung einer stabilen Angina pectoris (CCS III)
4. Angina pectoris bei Zustand nach Myokardinfarkt

Die Kategorisierung der Patienten in STEMI und NSTEMI erfolgt gemäß den aktuellen Leitlinien. Anhand des Vorhandenseins beziehungsweise Fehlens von ST-Streckenhebungen im EKG werden die Patienten wie folgt in diese zwei Gruppen unterteilt:

1. Der ST-Hebungsinfarkt (STEMI) [149–151]:

Von einem STEMI ist auszugehen, wenn der Patient typische Brustschmerzen aufweist und sich im EKG einer der beiden folgenden Befunde für länger als 20 Minuten zeigt: erstens eine ST-Streckenhebung von $\geq 0,1$ mV in mindestens zwei zusammenhängenden Extremitätenableitungen oder zweitens eine ST-Streckenhebung $\geq 0,2$ mV in mindestens zwei zusammenhängenden Brustwandableitungen. Ein STEMI kann sich zudem auch als neu aufgetretener Linksschenkelblock mit infarkttypischer klinischer Symptomatik präsentieren [133, 135].

2. Der Nicht-Hebungsinfarkt (NSTEMI) [149, 150, 154]:

Bei typischen Brustschmerzen ohne anhaltende ST-Streckenhebung im EKG ist von einem sogenannten NSTEMI auszugehen [150]. Im EKG zeigen sich hierbei dynamische oder persistierende ST-Strecken-Senkungen, T-Wellen-Abnormalitäten oder transiente ST-Streckenhebungen [150, 153, 154]. Ein „unauffälliges“ EKG schließt ein NSTEMI jedoch nicht aus [150, 153, 154]. Unter Berücksichtigung des Laborparameters Troponin erfolgt hier eine zusätzliche Unterteilung in NSTEMI und instabile Angina pectoris [149, 150, 153, 154]. Bei einem Troponinanstieg über den oberen Normalwert handelt es sich um einen NSTEMI [150, 153, 154]. Im EKG zeigen sich typischerweise ST-Streckensenkungen $\geq 0,05$ mV in zumindest zwei benachbarten Ableitungen oder ST-Streckensenkungen mit transienten ST-Hebungen [150, 153, 154]. Davon abzugrenzen ist die instabile Angina pectoris, bei welcher laborchemisch kein Troponin-Anstieg zu verzeichnen ist [153, 154].

2.3.2 Ischämischer Schlaganfall

Ein ischämischer Schlaganfall zeichnet sich durch plötzliches Auftreten eines Verlustes von globalen oder fokalen Hirnfunktionen aus [156, 157]. Die häufigsten Ursachen einer zerebralen Ischämie sind die Atherosklerose großer Arterien und kardiale Embolisation [158, 159]. Eine weitere Ursache können zerebrale Blutungen sein [158, 160]. Nach Manifestation der Symptomatik dauert ein ischämischer Schlaganfall länger als 24 Stunden an [157]. Vom Vollbild des ischämischen Schlaganfalls muss die transitorische ischämische Attacke (TIA) abgegrenzt werden. Die TIA bezeichnet ein fokal-neurologisches Defizit mit Symptomen, die weniger als 24 Stunden andauern [156, 157]. Eine TIA ist komplett reversibel und in der Computertomographie

(CT) demarkiert sich der Infarkt nicht [156, 157].

2.3.3 Schwere kardiale Komplikation

Unter dem Begriff der schweren kardialen Komplikation („major adverse cardiac event“, MACE) wird im Kontext dieser Studie das Eintreten eines Myokardinfarktes, eines ischämischen Schlaganfalles oder eines Todesfalls definiert.

2.4 Material

Zur Untersuchung der Blutproben kamen folgende Geräte, Verbrauchsmaterialien und Substanzen zur Anwendung.

2.4.1 Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Vollblutaggregometer und Testzellen „Multiplate Analyser“	Roche Diagnostics GmbH (6343 Rotkreuz, Schweiz)
Eppendorf-Cup Ständer	Firma Eppendorf/Eppendorf AG (22339 Hamburg, Deutschland)
Pipetten	Eppendorf AG (22339 Hamburg, Deutschland)
Durchflusszytometer „FACSCalibur“	Firma BD Biosciences (69126 Heidelberg, Deutschland)
Zentrifuge - Hettich Zentrifugen, Universal 32 R	Hettich Holding Beteiligungs- und Verwaltungs GmbH (78532 Tuttlingen, Deutschland)

Tabelle 2.1: Verwendete Laborgeräte

2.4.2 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
S-Monovette® 2,6 ml, rot, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) S-Monovette® 8,5ml, gelb, Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin (CPDA, 1ml)	Sarstedt AG & Co/ Firma Sarstedt (51582 Nümbrecht, Deutschland)
Pipettenspitzen, 100-1000 µl	Firma Ratiolab (63303 Dreieich-Buchsschlag, Deutschland)
Pipettenspitzen, 20 µl	Sarstedt AG&Co (51582 Nümbrecht, Deutschland)
Pipettenspitzen, 10 µl	Biozym Scientific GmbH (31840 Oldendorf, Deutschland)
FACS-Rundbodenröhrchen, 5ml	Corning B.V. Life Sciences (1060 LJ Amsterdam, Niederlande)

Tabelle 2.2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

2.4.3 Substanzen

Substanz	Hersteller
Paraformaldehyd (PFA) Verdünnung : PFA 0,5%	Firma Merck (64293 Darmstadt, Deutschland)
phosphate buffered saline (PBS) 137 mM Natriumchlorid, 2,7mM Kaliumchlorid, 12mM Gesamtphosphat	Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, USA)
Monoklonaler GPVI-Ak (4C9-FITC) Klon 149 4C9 (6 mg/ml) → Isotyp 7H8 (1,8 mg/ml), in der Verwendung 1:1000 verdünnt mit PBS	Ludwig-Maximilians-Universität München in Kooperation mit dem Institut für Molekulare Immunologie des GSF-Forschungszentrums (80539 München, Deutschland)
Antikörper CD42b-PE Klon HIP 1 in der Verdünnung 1:10	BD Biosciences (69126 Heidelberg, Deutschland)

Tabelle 2.3: Verwendete Substanzen

2.4.4 Monoklonale Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse

Im Rahmen dieser wissenschaftlichen Arbeit wurden bei der durchflusszytometrischen Analyse der Blutproben die beiden folgende Antikörper verwendet: CD42b und 4c9. Diese beiden Antikörper wurden entweder als Konjugat mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC, grün) oder mit Phycoerythrin (PE, rot) verwendet [161].

Der monoklonale Antikörper CD42b diente als Thrombozytenmarker [162], wobei ein Konjugat mit PE verwendet wurde. Er bindet an das Glykoprotein GPIb-V-IX [162], welches auf der Oberfläche von Thrombozyten exprimiert ist [3]. Somit können Thrombozyten von anderen Blutzellen unterschieden werden. In dieser Untersuchung kam der Antikörper CD42b in einer Verdünnung im Verhältnis 1:10 zum Einsatz.

Zur Charakterisierung der Glykoprotein VI-Expression auf den Thrombozyten wurde der 4c9 Antikörper verwendet, welcher direkt gegen das Glykoprotein VI gerichtet ist [163]. Er wurde als Konjugat mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC verwendet. Die Konzentration des Antikörpers in der Ausgangslösung betrug 1,8 mg/ml. Zur Verwendung wurde diese mit „phosphate buffered saline“ (PBS) im Verhältnis 1:1000 verdünnt.

2.5 Methoden

2.5.1 Durchflusszytometrie

Mit dem Verfahren der Durchflusszytometrie können Zellen und kleine Partikel anhand verschiedener Eigenschaften, wie beispielsweise ihrer Größe, Oberflächencharakteristika und intrazellulären Eigenschaften voneinander unterschieden werden [161]. Bestimmte Durchflusszytometermodelle werden auch als FACS-Geräte bezeichnet, wobei die Abkürzung für Fluorescence-Activated Cell Sorting steht [161].

Bevor die Zellen untersucht werden können, müssen diese zunächst mit Antikörpern markiert bzw. angefärbt werden, welche gegen bestimmte zelluläre Eigenschaften gerichtet sind [161]. Die Antikörper wiederum sind entweder direkt an einen Fluoreszenzfarbstoff, das Fluorochrom, gebunden oder können ihrerseits mittels eines fluoreszenzgekoppelten sekundären Antikörpers markiert werden [161]. Ein Laser stellt den zentralen Bestandteil des Durchflusszytometers dar und kann Partikel und Zellen, sowie die daran anhaftenden fluoreszenzgekoppelten Marker detektieren [161].

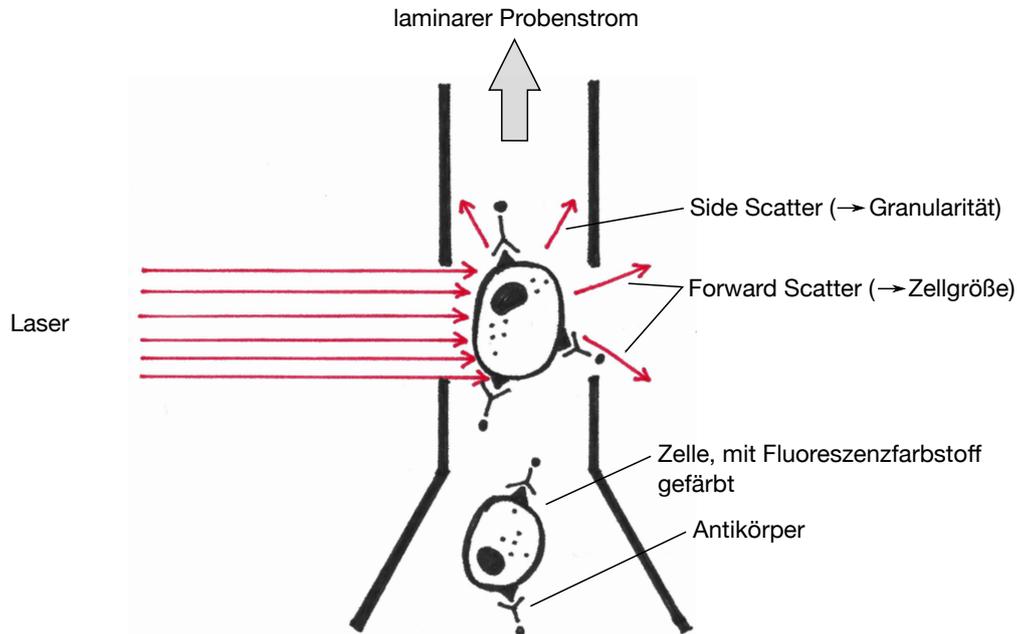


Abbildung 2.1: Mittels Durchflusszytometrie können Zellen und Partikel anhand verschiedener Eigenschaften charakterisiert werden. Das Verfahren wird auch als Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) bezeichnet. Hier kommen mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Antikörper zum Einsatz, die gegen bestimmte zelluläre Eigenschaften gerichtet sind. Die so markierten Zellen werden einzeln in einem laminaren Probenstrom an einem Laserstrahl vorbei geführt und analysiert. Der Laserstrahl des FACS-Gerätes trifft auf die einzeln an ihm vorbei geführten Zellen. Das vom Laser ausgesandte monochromatische Licht wird nach dem Auftreffen auf die Zellen gestreut. Nach vorne abgelenkte Lichtstrahlen werden als Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC) bezeichnet und seitlich abgelenkte Lichtstrahlen als Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC). Sie charakterisieren so die Größe der Probenbestandteile und die Zellgranularität (Die schematische Darstellung ist angelehnt an die Abbildungen 3.1. und 3.3. aus dem Kapitel „Durchflusszytometrie“ aus [161]).

Mithilfe eines Durchflusszytometers ist es möglich, innerhalb kürzester Zeit eine große Anzahl von Zellen zu analysieren [161]. Hierzu werden die angefärbten Zellen in einem laminaren Probenstrom einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeführt [161]. Das vom Laser ausgesandte monochromatische Licht, also Licht einer definierten Wellenlänge, trifft auf die Partikel im Probenstrom, woraufhin es zu einer Streuung des Lichts kommt [161]. Nach vorne abgelenkte Lichtstrahlen werden als Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC) bezeichnet und charakterisieren die relative Größe der Probenbestandteile [161]. Mit dem Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC), welches in einem Winkel von 90° abgelenkt wird, kann die Zellgranularität

gemessen werden [161]. Abbildung 2.1 stellt die Durchflusszytometrie schematisch dar.

Die Fluoreszenzfarbstoffe, welche an die Zellen gekoppelt sind, werden selbst zu einer Lichtemission angeregt, der eine bestimmte Wellenlänge zuzuordnen ist [161]. Dieses Fluoreszenzlicht wird im Durchflusszytometer mittels diversen Spiegeln, Filtern und Detektoren erfasst und kann somit analysiert werden. Durch die verschiedenen Fluorochrome wird so jeweils ein spezifisches Signal erzeugt. Dieses Signal gibt Rückschlüsse auf die mit dem Farbstoff gekoppelten Partikel [161].

Gängige Fluoreszenzfarbstoffe sind zum Beispiel Fluoresceinisothiocyanat (FITC), ein gelbgrüner Farbstoff mit einem Fluoreszenzemissionsmaximum bei etwa 519 nm, sowie das Phycoerythrin (PE), welches ein Emissionsmaximum um 578 nm aufweist [161].

Eine Option für die Illustration von Ergebnissen der durchflusszytometrischen Analyse stellt das zweidimensionale Dot-Plot dar [161]. Es bietet den Vorteil, dass sich einzelne Zellpopulationen gut unterscheiden lassen [161]. Die Beziehung verschiedener untersuchter Eigenschaften können übersichtlich dargestellt werden, wie beispielsweise die Beziehung zweier verschiedener Fluoreszenzen auf einer Zelle zueinander oder die Zellgranularität in Bezug auf ein bestimmtes Fluorochrom [161]. Die Ergebnisdarstellung der FACS-Analysen erfolgte bei dieser Doktorarbeit auf diese Weise. Abbildung 2.2 stellt beispielhaft ein solches Dot-Plot dar.

Zudem können die Ergebnisse auch in tabellarischer Form dargestellt werden, welche beispielsweise folgende Informationen beinhalten kann: Events, die Anzahl an gemessenen Zellen, Mean-Wert, die durchschnittliche Fluoreszenzaktivität und „%Gated“ und die Anzahl an Zellen die beispielsweise mit 4c9-FITC gemessen wurde.

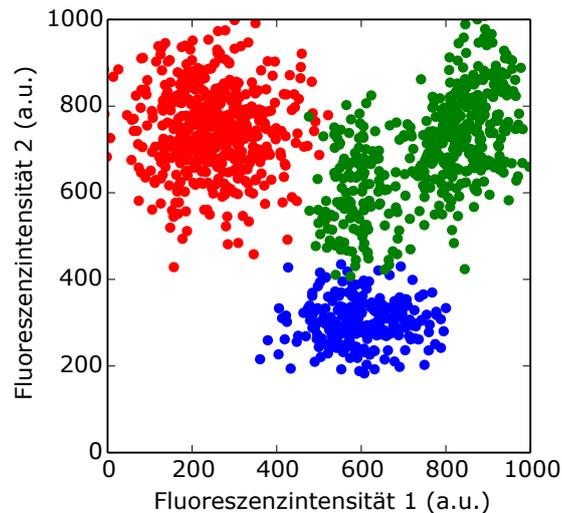


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des Dot-Plots: der zweidimensionale Dot-Plot stellt eine Möglichkeit der Ergebnisdarstellung durchflusszytometrischer Ergebnisse dar. Dieser exemplarische Dot-Plot stellt drei Zellpopulationen mit willkürlichen Einheiten (a.u.) für die Fluoreszenzintensität 1 und 2 dar. Die schematische Abbildung orientiert sich an Abbildung 3.11. aus dem Kapitel „Durchflusszytometrie“ aus [161].

2.5.2 Genanalyse und Polymorphismen im GP6 Gen

Für diese wissenschaftliche Arbeit wurden vier ausgewählte GP6 Einzelnukleotidpolymorphismen untersucht: rs12610286, rs12610286, rs1613662, rs1654419 und rs1671153. Bei einem Einzelnukleotidpolymorphismus handelt es sich um eine Variation eines einzigen Basenpaares innerhalb eines DNA-Stranges und demzufolge um eine genetische Variante.

Zur Darlegung des vorliegenden GP6 Genpolymorphismus wurden bei den Patienten DNA-Sequenzierungen durchgeführt. Hierfür wurde das Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für klinische Pharmakologie in Stuttgart beauftragt. Die Analysen der Einzelnukleotidpolymorphismen wurden dort ausgeführt.

Die genomische DNA wurde aus Ethylendiamintetraazetat (EDTA)-Blutproben mittels des QIAmp DNA Blut Mini Kit Systems der Firma Qiagen, aus Hilden in Deutschland, isoliert. Mithilfe der „Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - time of flight mass spectrometry“ (MALDI-TOF MS) wurde die Genotypisierung durchgeführt, wobei das MassARRAY Compact System des Unternehmens Sequenom, aus Kalifornien in den USA, zur Anwendung kam.

2.5.3 Gewinnung der Blutproben

Zu Beginn der Koronarangiographie im Herzkatheterlabor der Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Tübingen wurde den Patienten arterielles Blut aus der Schleuse in der Femoralarterie bzw. ggf. der Radialisarterie entnommen. Die Herzkatheteruntersuchung und demzufolge die Blutentnahme erfolgte bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom, bei STEMI-Patienten in der Regel notfallmäßig sofort und bei NSTEMI-Patienten innerhalb weniger Stunden nach Ankunft in der Klinik. Bei Patienten mit stabiler Angina pectoris Symptomatik wurde der koronarangiographische Eingriff elektiv durchgeführt.

2.5.4 Vorbereitung der Blutproben

Das frisch entnommene Patientenblut aus dem Herzkatheter wurde in der Regel in weniger als 10 Minuten in die korrekten Blutröhrchen (CPDA Monovette 5 ml und S-Monovette 2,6 ml EDTA) abgefüllt.

Im Anschluss wurden die Proben nach in Kapitel 2.5.5 beschriebenen Protokoll aufbereitet und gefärbt. Schlussendlich wurde die Probe innerhalb von 48 Stunden mittels FACS-Analyse gemessen.

Zur Analyse des Einzelnukleotidpolymorphismus wurde das Patientenblut in kleinen EDTA S-Monovetten an das Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut in Stuttgart versandt.

2.5.5 Antikörperfärbung

Zunächst wurde aus dem CPDA-Blut des Patienten eine 1:50-Blutverdünnung hergestellt. Hierzu wurden 20 µl CPDA-Patientenblut mit 980 µl „phosphate buffered saline“ (PBS) versetzt. Danach wurden 40 µl dieser 1:50 Verdünnung in ein FACS-Röhrchen gegeben. Nach initialem Vortexen des spezifischen Antikörpers gegen das Glykoprotein VI (4c9) wurden hiervon 5 µl dem verdünnten Patientenblut im FACS-Röhrchen hinzugefügt. Im Anschluss wurde dieser Ansatz mit 5 µl des Antikörpers 42b-PE (rot) gegengefärbt, lichtdicht mit Aluminiumfolie abgedeckt und bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Nach Ablauf der 30-minütigen Inkubation wurde die Probe mit 300 µl 0,5%iger Paraformaldehyd-Lösung konserviert. Die so präparierten Proben wurden nun sogleich oder binnen 48 Stunden, mit Zwischenlagerung bei +4 °C und Dunkelheit, mittels FACS-Analyse untersucht.

2.5.6 Analyse der Proben mittels Durchflusszytometrie

Die gemäß der Anleitung in Kapitel 2.5.5 gefärbten Blutproben wurden mittels FACS-Analyse untersucht. Hierfür wurde das FACS-Gerät „FACSCalibur“ der Firma BD Biosciences verwendet.

Es wurden die folgenden Instrumenteneinstellungen¹ festgelegt und verwendet:

- Forward Scatter (FSC, P1): E00 log; Side Scatter (SSC, P2): 261 log;
- PE (P4): 520 log; FITC (P3): 600 log.

Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) diene als Maß für die Rezeptordichte. Die Anzahl der Ereignisse pro Sekunde wurde auf 200 festgelegt und die Anzahl der Ereignisse insgesamt auf 10.000 pro Messung begrenzt.

2.5.7 Statistische Analyse

Mithilfe des Chi-Quadrat-Testes wurden die kategoriellen Variablen hinsichtlich deren Häufigkeitsunterschiede in den untersuchten Haplotypen des GP6 Gens verglichen. Die quantitative Datenanalyse der Glykoprotein VI-Expression erfolgte mittels Varianzanalyse („analysis of variance“, ANOVA). Kontinuierliche Daten wurden als $\text{mean} \pm \text{SD}$ („standard deviation“) angegeben. Kategorielle Variablen werden als Nummer oder Prozentzahl wiedergegeben. Zur Analyse von klinischen Prädiktoren für die Mortalität wurde eine univariate logistische Regressionsanalyse angewendet. Klinische Variablen und homozygote Träger der Einzelnukleotidpolymorphismus-Allele wurden in dieses Modell als unabhängige Variablen miteinbezogen. Die Variablen umfassten Alter, Geschlecht, beeinträchtigte linksventrikuläre Funktion, akutes Koronarsyndrom, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie und den BMI. Faktoren, die über ein Signifikanzlevel von $p < 0,1$ verfügten, wurden im Anschluss in ein multivariates Modell miteinbezogen. Für alle übrigen Analysen wurde ein 2-tailed p-value $< 0,05$ als statistisch signifikant gewertet.

Alle statistischen Analysen wurden mit dem Statistikprogramm SPSS, Version 22, der Softwarefirma IBM durchgeführt.

Ein OEGE Hardy-Weinberg-Equilibrium-Rechner wurde verwendet um Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Equilibrium bei den untersuchten Haplotypen auszuschließen [164, 165].

¹Es soll darauf hingewiesen werden, dass die Einstellungen je nach FACS-Gerät variieren. Die verwendeten Einstellungen werden der Vollständigkeit halber trotzdem angegeben.

3 Ergebnisse

In den folgenden Unterkapiteln werden die Ergebnisse im Einzelnen dargelegt. Die Diskussion der Ergebnisse wird in Kapitel 4 erfolgen.

3.1 Patientencharakteristika

Die Tabellen 3.1, 3.3, 3.4, 3.5 und 3.2 demonstrieren die Patientencharakteristika für die einzelnen untersuchten Einzelnukleotidpolymorphismen. Zur besseren Lesbarkeit im Druck sind die Daten in einzelne Tabellen aufgegliedert, müssen jedoch in der Gesamtschau betrachtet und verstanden werden. Das Patientenkollektiv ist in der folgenden Auflistung beschrieben.

- Das Patientenkollektiv bestand vorwiegend aus männlichen Patienten. Von den 690 Patienten waren 72,6 % männlichen und 27,4 % weiblichen Geschlechtes.
- Im Schnitt waren die Patienten $68,6 \pm 11,37$ Jahre alt.
- Knapp die Hälfte der Patienten (46,4 %) präsentierte sich mit einem akuten Koronarsyndrom (ACS).
- Die Ejektionsfraktion (EF) war bei 50,2 % der Patienten eingeschränkt (EF < 55%).
- Die Patienten wiesen insgesamt betrachtet typische kardiovaskuläre Risikofaktoren auf.
 - Rund ein Drittel der Patienten (33,2 %) litt unter Diabetes mellitus.
 - 28,8 % der Patienten hatte bereits in der Vorgeschichte einen Myokardinfarkt.
 - Der durchschnittliche Body Mass Index (BMI) aller Patienten betrug $27,67 \pm 4,57$.

- Die meisten Patienten (85,3 %) wiesen eine arterielle Hypertonie auf.
- Der Mehrheit der Patienten (60,1 %) konnte eine Hyperlipoproteinämie zugeschrieben werden.

Insgesamt gab es zwischen den verschiedenen Haplotypen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Basischarakteristika der Patienten.

SNP, Patienten n=690	
Overall %	100
Geschlecht m %	72.6
Geschlecht f %	27.4
Alter (Jahre)	68.8 ±11.37
DM %	33.2
Z.n. MI %	28.8
Hypertonie	85.3
BMI	27.67 ±4.57
HLP %	60.1
EF < 55% %	50.2
ACS %	46.4

Tabelle 3.1: Diese Tabelle stellt eine erste Übersicht der Patientencharakteristika dar. Einzelheiten sind den Tabellen 3.2, 3.3, 3.4 und 3.5 zu entnehmen. Zur besseren Lesbarkeit im Druck sind die Daten in einzelne Tabellen aufgliedert, müssen jedoch in der Gesamtschau betrachtet und verstanden werden

3 Ergebnisse

SNP, Patienten n=690					
Genotyp		rs1613662			p
		AA	GA	GG	
Overall %		71.3	25.9	2.8	-
Geschlecht	m %	74.0	69.3	68.4	0.441
	f %	26.0	30.7	31.6	
Alter (Jahre)		68.22±11.27	70.25±11.13	70.21±14.93	0.108
DM %		32.9	34.1	31.6	0.951
Z.n. MI %		30.1	25.7	26.3	0.525
Hypertonie		84.3	88.3	84.2	0.432
BMI		27.76±4.57	27.29±4.66	28.69±3.66	0.376
HLP %		61.5	57.3	52.6	0.495
EF < 55% %		49.3	52.5	52.6	0.742
ACS %		45.5	48.6	47.4	0.776

Tabelle 3.2: Diese Tabelle stellt die Patientencharakteristika für rs1613662 dar. Eine Übersicht der Patientencharakteristika ist in Tabelle 3.1 aufgeführt. Weitere Einzelheiten sind den Tabellen 3.3, 3.4 und 3.5 zu entnehmen. Zur besseren Lesbarkeit im Druck sind die Daten in einzelne Tabellen aufgegliedert, müssen jedoch in der Gesamtschau betrachtet und verstanden werden.

SNP, Patienten n=690					
Genotyp		rs1654419			p
		GG	AG	AA	
Overall %		67.7	28.6	3.6	-
Geschlecht	m %	74.7	69.0	68.0	0.282
	f %	25.3	31.0	32.0	
Alter (Jahre)		68.12±11.24	70.14±11.39	70.44±13.06	0.086
DM %		32.8	34.5	32.0	0.906
Z.n. MI %		29.8	29.6	24.0	0.648
Hypertonie		84.5	89.3	76.0	0.102
BMI		27.72±4.50	27.46±4.87	28.45±3.53	0.598
HLP %		62.6	55.6	52.0	0.175
EF < 55% %		49.8	52.1	44.0	0.710
ACS %		45.5	48.2	52.0	0.695

Tabelle 3.3: Diese Tabelle stellt die Patientencharakteristika für rs1654419 dar.

3 Ergebnisse

SNP, Patienten n=690					
Genotyp		rs1671153			p
		TT	GT	GG	
Overall %		68.9	27.9	3.2	-
Geschlecht	m %	75.1	68.2	63.6	0.120
	f %	24.9	31.8	36.4	
Alter (Jahre)		68.1±11.25	70.3±11.34	70.36±13.39	0.062
DM %		33.3	33.3	31.8	0.989
Z.n. MI %		29.5	27.6	22.7	0.721
Hypertonie		84.7	89.1	72.7	0.078
BMI		27.72±4.50	27.49±4.86	28.37±3.72	0.697
HLP %		62.6	55.0	54.5	0.169
EF < 55% %		49.8	51.9	45.5	0.804
ACS %		46.4	46.4	50.0	0.946

Tabelle 3.4: Diese Tabelle stellt die Patientencharakteristika für rs1671153 dar.

SNP, Patienten n=690					
Genotyp		rs12610286			p
		AA	AG	GG	
Overall %		49.1	41.9	9.0	-
Geschlecht	m %	74.0	70.2	77.4	0.397
	f %	26.0	29.8	22.6	
Alter (Jahre)		68.52±11.28	69.24±11.40	68.13±11.79	0.653
DM %		34.9	32.5	27.4	0.487
Z.n. MI %		29.3	27.0	33.9	0.527
Hypertonie		86.4	85.4	79.0	0.326
BMI		27.74±4.35	27.61±4.87	27.60±4.41	0.945
HLP %		60.3	65.6	59.2	0.648
EF < 55% %		49.4	48.4	51.7	0.804
ACS %		47.3	46.4	41.9	0.735

Tabelle 3.5: Diese Tabelle stellt die Patientencharakteristika für rs12610286 dar.

3.2 Nachverfolgung der Patienten und klinische Ereignisse

Tabelle 3.6 führt die klinischen Ereignisse im Patientenkollektiv auf, welche in der zwölfmonatigen Nachverfolgung aufgetreten sind.

Insbesondere sticht heraus, dass der homozygote Haplotyp AA des Einzelnukleotidpolymorphismus rs1654419 signifikant mit einer höheren Mortalität assoziiert war ($p=0,007$). Ein ähnliches Resultat wurde beim homozygoten Haplotyp GG des Einzelnukleotidpolymorphismus rs1671153 beobachtet ($p=0,003$). Numerisch gesehen wiesen die Patienten mit den eben genannten Haplotypen der Einzelnukleotidpolymorphismen rs1654419 und rs1671153 höhere Raten an Myokardinfarkten und schwere kardiale Komplikationen im Beobachtungsintervall auf, jedoch ohne eine

SNP, Patienten n=690	rs1654419			
Genotyp	GG	AG	AA	p
Tod	5.3	5.5	20.8	0.007
Myokardinfarkt	7.1	4.9	8.3	0.551
Schlaganfall	1.2	1.1	0.0	0.870
MACE	11.5	9.8	20.8	0.278
SNP, Patienten n=690	rs1671153			
Genotyp	TT	GT	GG	p
Tod	5.1	5.4	22.7	0.003
Myokardinfarkt	6.8	5.6	9.1	0.771
Schlaganfall	1.1	1.1	0.0	0.881
MACE	5.1	5.4	22.7	0.003
SNP, Patienten n=690	rs12610286			
Genotyp	AA	AG	GG	p
Tod	5.2	6.9	5.2	0.650
Myokardinfarkt	7.1	5.8	6.9	0.881
Schlaganfall	0.6	1.8	0.0	0.271
MACE	10.6	12.3	10.3	0.809
SNP, Patienten n=690	rs1613662			
Genotyp	AA	GA	GG	p
Tod	5.4	6.0	16.7	0.139
Myokardinfarkt	7.0	4.8	11.1	0.452
Schlaganfall	1.1	1.2	0.0	0.894
MACE	11.3	10.8	16.7	0.826

Tabelle 3.6: Klinische Ereignisse nach 12 Monaten Nachverfolgung - separate Analyse der Einzelnukleotidpolymorphismen (SNP)

statistische Signifikanz zu erreichen.

Bei den Einzelnukleotidpolymorphismen des rs12610286 und des rs1613662 gab es bezüglich der analysierten Endpunkte bzw. der klinischen Ereignisse im Nachverfolgungszeitraum keine signifikanten Unterschiede. Es ist jedoch anzumerken, dass bei den Trägern des GG-Allels des Einzelnukleotidpolymorphismus rs1613662 ein Trend zu einer erhöhten Mortalität und erhöhten Rate an Myokardinfarkten bestand. Eine statistische Signifikanz wurde nicht erreicht.

3.3 Linkage Disequilibrium der analysierten Einzelnukleotidpolymorphismen

Alle Einzelnukleotidpolymorphismen waren im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. In der Analyse sind die Einzelnukleotidpolymorphismen rs1654419, rs1671153 und rs1613662 im Linkage Disequilibrium ($D' > 0.9$), s. Tab. 3.7. In der folgenden uni- und multivariaten Analyse wird dies berücksichtigt. Der Einzelnukleotidpolymorphismus rs12610286 erschien nicht so stark assoziiert ($0.6 < D' < 0.8$).

		rs1671153	rs12610286	rs1613662
rs1654419	D'	0.974	0.770	0.999
	r	0.947	-0.236	0.923
	p-Wert	$< 2 \cdot 10^{-16}$	$< 2 \cdot 10^{-16}$	$< 2 \cdot 10^{-16}$
rs1671153	D'		0.682	0.908
	r		-0.203	0.862
	p-Wert		$5.34 \cdot 10^{-14}$	$< 2 \cdot 10^{-16}$
rs12610286	D'			0.718
	r			-0.203
	p-Wert			$5.16 \cdot 10^{-14}$

Tabelle 3.7: Analyse des Linkage Disequilibriums

3.4 Uni- und multivariate Analyse

Die Tabellen 3.8 und 3.9 zeigen die Ergebnisse der uni- und der multivariaten Analyse hinsichtlich der Mortalität.

In der univariaten Analyse erschienen das Alter ($p < 0,001$), weibliches Geschlecht ($p = 0,09$), eine eingeschränkte linksventrikuläre Pumpfunktion ($p = 0,001$), Hospitalisierung bei akutem Koronarsyndrom ($p = 0,07$), Diabetes mellitus ($p = 0,012$) und homozygoter Genotyp für rs1654419 (AA) ($p = 0,004$), rs1671153 (GG) ($p = 0,002$) und rs1613662 (GG) ($p = 0,064$) als signifikante Prädiktoren für die Mortalität der betroffenen Patienten. Nach Adjustierung für signifikante Faktoren in der multivariaten Analyse blieb der homozygote Genotyp des rs1654419 als signifikanter Prädiktor bestehen ($p = 0,01$). Anzumerken ist, dass der hier besprochene Einzelnukleotidpolymorphismus rs1654419 und die Einzelnukleotidpolymorphismen rs1671153 sowie rs1613662 im Linkage Disequilibrium sind, s. Tab. 3.7. Daher sind diese drei Einzelnukleotidpolymorphismen in der univariaten Analyse alle signifikant. Deshalb ist es ausreichend, die anschließende multivariate Analyse lediglich für den Einzelnukleotidpolymorphismus rs1654419 durchzuführen.

In der multivariaten Analyse waren das Patientenalter ($p \leq 0,001$), die eingeschränkte Pumpfunktion ($p = 0,005$) und das akute Koronarsyndrom ($p = 0,05$) ebenfalls signifikante Prädiktoren für Mortalität.

3 Ergebnisse

Variable	Koeffizient B	Odds ratio (95% CI)	p
Alter	0.116	1.12 (1.08 – 1.17)	<0.001
weibliches Geschlecht	0.589	1.80 (0.92 – 3.54)	0.090
reduzierte EF	1.375	3.96 (1.78 – 8.77)	0.001
ACS	0.626	1.87 (0.96 – 3.66)	0.070
Diabetes mellitus	0.843	2.32 (1.20 – 4.49)	0.012
arterielle Hypertonie	0.072	1.08 (0.41 – 2.83)	0.884
BMI	-0.065	0.94 (0.86 – 1.03)	0.156
rs1654419 ^[A] (Homozygotes Mutationsallel)	1.540	4.67 (1.64 – 13.27)	0.004
rs1671153 ^[A] (Homozygotes Mutationsallel)	1.655	5.23 (1.82 – 15.06)	0.002
rs12610286 (Homozygotes Mutationsallel)	-0.154	0.86 (0.26 – 2.88)	0.803
rs1613662 ^[A] (Homozygotes Mutationsallel)	1.217	3.38 (0.93 – 12.22)	0.064

[A] Die SNPs rs1654419, rs1671153 und rs1613662 sind im Linkage Disequilibrium und daher alle signifikant.

Tabelle 3.8: Ergebnisse der univariaten Analyse

Variable	Koeffizient B	Odds ratio (95% CI)	p
Alter	0.106	1.11 (1.06 – 1.16)	<0.001
weibliches Geschlecht	0.115	1.12 (0.52 – 2.40)	0.770
reduzierte EF	1.201	3.32(1.43 – 7.71)	0.005
ACS	0.734	2.08 (1.02 – 4.26)	0.050
Diabetes mellitus	0.588	1.80 (0.89 – 3.67)	0.110
rs1654419 ^[A] (Homozygotes Mutationsallel)	1.509	4.52 (1.37 – 14.92)	0.01

[A] Da die SNPs rs1654419, rs1671153 und rs1613662 im Linkage Disequilibrium sind, ist die multivariate Analyse stellvertretend für den SNP rs1654419 durchgeführt.

Tabelle 3.9: Ergebnisse der multivariaten Analyse

3.5 Ergebnisse der FACS-Analyse und Glykoprotein VI-Expressionslevel

In diesem Kapitel sind die Ergebnisse der FACS-Analyse und der Glykoprotein VI-Expressionslevel aufgeführt.

Zunächst werden die Auswertungsschritte an einer exemplarischen Probe dargestellt. Dazu zeigt die Abbildung 3.1 die Auswertung der FACS-Analyse einer exemplarischen Probe in Form eines Dot-Plots. In dieser Darstellung kann die zu untersuchende Thrombozytenpopulation bestimmt werden. Diese ist in Abbildung 3.1 rot umrandet. Diese Thrombozytenpopulation bzw. die Fluoreszenzintensität der daran gebundenen Antikörper ist in den Histogrammen in Abbildung 3.2 dargestellt. Die numerischen Ergebnisse der Histogramme dieser exemplarischen Probe sind in Tabelle 3.10 zu finden.

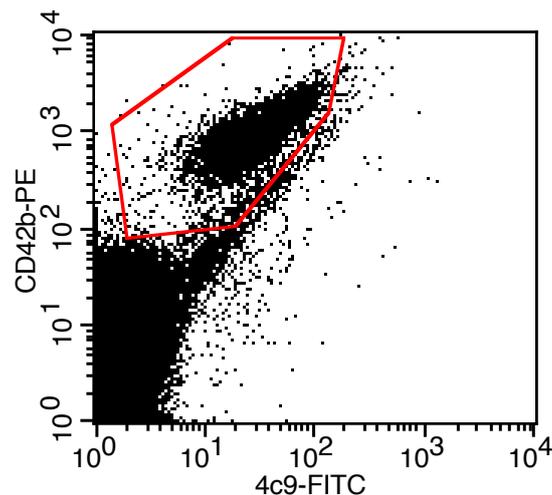


Abbildung 3.1: Graphische Darstellung der FACS-Analyse einer exemplarischen Probe. Nur die Messpunkte im rot umrandeten Bereich sind für die weitere Auswertung relevant, da sie die mit Antikörpern markierte Thrombozytenpopulation darstellen. Auf der X-Achse ist die Fluoreszenzintensität des Antikörpers 4c9-FITC dargestellt. Auf der Y-Achse ist die Fluoreszenzintensität des Antikörpers CD42b-PE dargestellt.

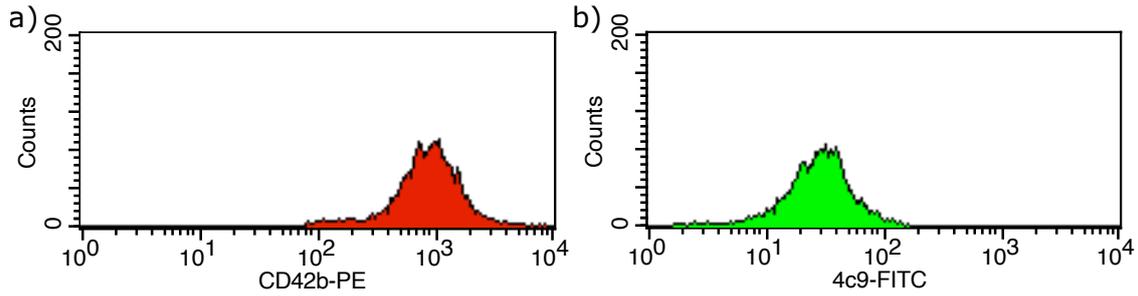


Abbildung 3.2: Die Histogramme zeigen die Verteilung der Fluoreszenzintensität der beiden Antikörper CD42b-PE in a) und 4c9-FITC in b) einer exemplarischen Probe. Die beiden Histogramme werden durch Summation der Datenpunkte im rot umrandeten Bereich in Abbildung 3.1 bezüglich der X- beziehungsweise der Y-Achse berechnet. Aus den Histogrammen lässt sich die durchschnittliche und mediane Fluoreszenzintensität der beiden Antikörper bestimmen.

Antikörper	total events	events	% gated	% total	mean	median
CD42b-PE	221614	9386	100.00	4.24	937.25	842.91
4c9-FITC	221614	9386	100.00	4.24	31.67	28.39

Tabelle 3.10: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der FACS-Analyse einer exemplarischen Probe. Die in dieser Tabelle dargestellten Ergebnisse beziehen sich auf die Histogramme in Abb. 3.2. Mean bezieht sich auf die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI), median auf die mediane Fluoreszenzintensität.

Nachfolgend werden nun die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der Studienpopulation aufgeführt.

Auf den folgenden Seiten demonstrieren die Tabellen 3.11 bis 3.14 die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse hinsichtlich der Glykoprotein VI-Expressionslevel in tabellarischer Form. Die zugehörigen Abbildungen 3.3 bis 3.6 visualisieren die jeweiligen MFI-Werte für die einzelnen Allele der Einzelnukleotidpolymorphismen.

Unter den Allelen des Einzelnukleotidpolymorphismus rs1613662 wies das AA-Allel das höchste Expressionslevel auf (MFI 38.332) und das GG-Allel das niedrigste (MFI 26.082). Das GA-Allel gruppierte sich zwischen den beiden anderen Allelen mit einer mittleren Fluoreszenzintensität von 31.508. Die Unterschiede zwischen den Glykoprotein VI-Expressionslevel der verschiedenen Allele erreichten statistische Signifikanz.

	AA	GA	GG	p
Anteil [%]	71.3	25.9	2.8	
Mittelwert	38.332	31.508	26.082	<0.001
Std. Abweichung	12.234	8.093	6.010	
Std. Fehler	0.706	0.805	2.003	
mittlere untere Grenze	36.942	29.911	21.462	
mittlere obere Grenze	39.722	33.106	30.702	
Minimum	2.540	<0.001	16.520	
Maximum	130.800	51.250	33.900	

Tabelle 3.11: Glykoprotein VI-Expressionslevel rs1613662. Die Tabelle demonstriert die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse hinsichtlich der thrombozytären Glykoprotein VI-Expression für rs1613662.

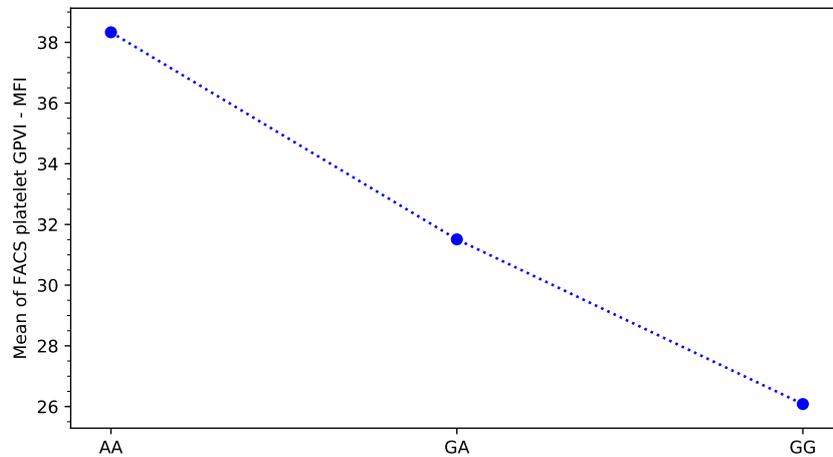


Abbildung 3.3: Graphische Darstellung der Glykoprotein VI-Expressionslevel des rs1613662. Die Abbildung stellt die Mittelwerte der mittels Durchflusszytometrie bestimmten thrombozytären Glykoprotein VI-Expressionslevel des rs1613662 graphisch dar ($p < 0.001$).

Die Verteilung der Expressionslevel zwischen den Allelen des rs1654419 waren ebenfalls signifikant. Hier wies das GG-Allel das größte Expressionslevel auf (MFI 38.491), gefolgt von Allel AG (MFI 28.6) und Allel AA, welches das niedrigste Expressionslevel aufwies (MFI 29.931).

	GG	AG	AA	p
Anteil [%]	67.7	28.6	3.6	
Mittelwert	38.491	31.633	29.931	<0.001
Std. Abweichung	12.499	7.579	9.882	
Std. Fehler	0.742	0.719	2.741	
mittlere untere Grenze	37.032	30.207	23.959	
mittlere obere Grenze	39.951	33.058	35.902	
Minimum	2.540	<0.001	16.520	
Maximum	130.800	48.210	51.250	

Tabelle 3.12: Glykoprotein VI-Expressionslevel rs1654419. Die Tabelle demonstriert die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse hinsichtlich der thrombozytären Glykoprotein VI-Expression für rs1654419.

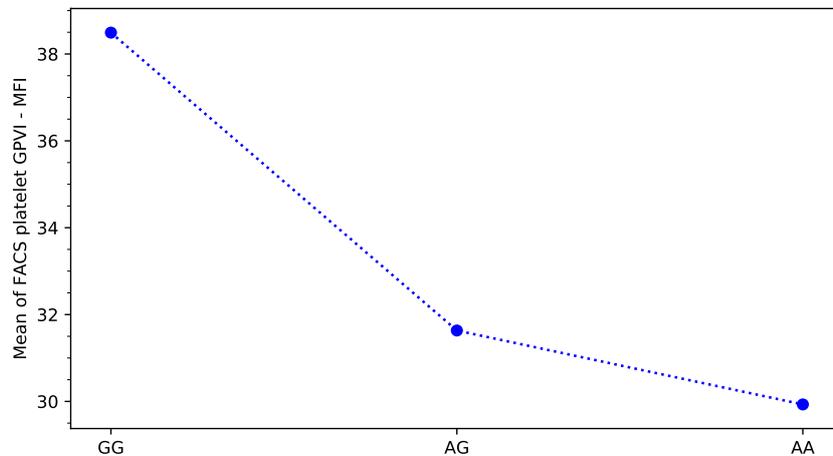


Abbildung 3.4: Graphische Darstellung der Glykoprotein VI-Expressionslevel des rs1654419. Die Abbildung stellt die Mittelwerte der mittels Durchflusszytometrie bestimmten thrombozytären Glykoprotein VI-Expressionslevel des rs1654419 graphisch dar ($p < 0.001$).

Bei den Allelen des Einzelnukleotidpolymorphismus rs1671153 zeigte sich hinsichtlich der Verteilung bei den durchflusszytometrischen Ergebnissen untereinander ein ähnliches Verteilungsmuster, wie bei den bereits erwähnten Einzelnukleotidpolymorphismen, wobei hierbei auch eine statistische Signifikanz vorlag. Hier wies das TT-Allel den höchsten MFI-Wert (MFI 38.144) und das GG-Allel den niedrigsten MFI-Wert (MFI 30.206) auf, wobei sich die Werte des GT-Allels dazwischen einordneten.

	TT	GT	GG	p
Anteil [%]	68.9	27.9	3.2	
Mittelwert	38.144	31.974	30.206	<0.001
Std. Abweichung	12.398	8.043	10.269	
Std. Fehler	0.724	0.793	2.964	
mittlere untere Grenze	36.718	30.402	23.681	
mittlere obere Grenze	39.569	33.546	36.731	
Minimum	2.540	<0.001	16.520	
Maximum	130.800	57.350	51.250	

Tabelle 3.13: Glykoprotein VI-Expressionslevel rs1671153. Die Tabelle demonstriert die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse hinsichtlich der thrombozytären Glykoprotein VI-Expression für rs1671153.

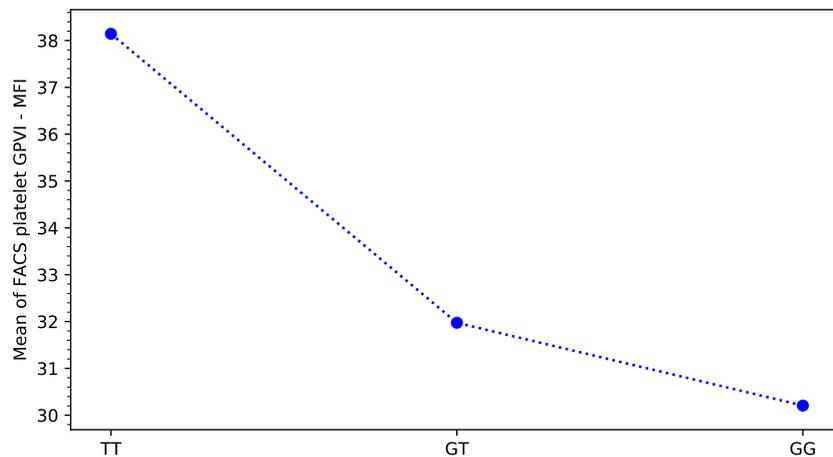


Abbildung 3.5: Graphische Darstellung der Glykoprotein VI-Expressionslevel des rs1671153. Die Abbildung stellt die Mittelwerte der mittels Durchflusszytometrie bestimmten thrombozytären Glykoprotein VI-Expressionslevel des rs1671153 graphisch dar ($p < 0.001$).

Die Allele des rs12610286 unterschieden sich hinsichtlich der durchflusszytometrischen Messergebnisse kaum. Der mittlere MFI-Wert lag beim AA-Allel bei 36.683, beim AG-Allel bei 35.992 und beim GG-Allel bei 36.761.

	AA	AG	GG	p
Anteil [%]	49.1	41.9	9.0	
Mittelwert	36.683	35.992	36.761	0.833
Std. Abweichung	10.157	13.292	11.007	
Std. Fehler	0.739	0.983	1.786	
mittlere untere Grenze	35.226	34.053	33.143	
mittlere obere Grenze	38.140	37.931	40.379	
Minimum	15.190	<0.001	5.850	
Maximum	104.820	130.800	57.350	

Tabelle 3.14: Glykoprotein VI-Expressionslevel rs12610286. Die Tabelle demonstriert die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse hinsichtlich der thrombozytären Glykoprotein VI-Expression für rs12610286.

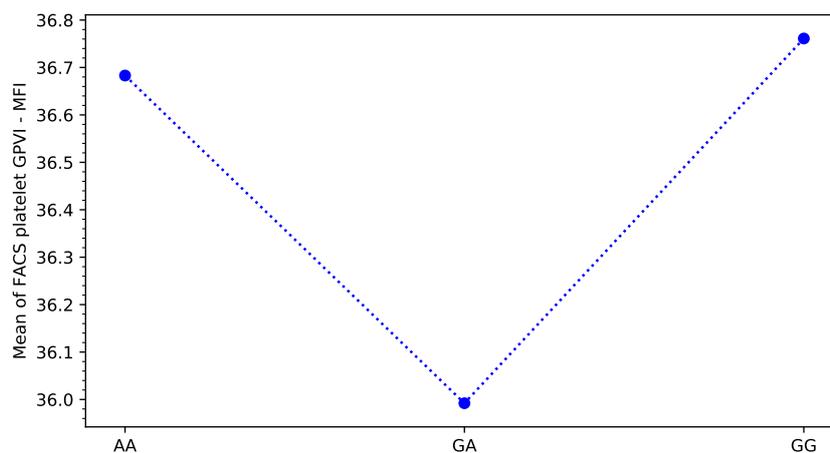


Abbildung 3.6: Graphische Darstellung der Glykoprotein VI-Expressionslevel des rs12610286. Die Abbildung stellt die Mittelwerte der mittels Durchflusszytometrie bestimmten thrombozytären Glykoprotein VI-Expressionslevel des rs12610286 graphisch dar ($p = 0.833$).

4 Diskussion

Glykoprotein VI ist ein Kollagenrezeptor der äußeren Thrombozytenmembran. Es spielt eine wichtige Rolle bei der physiologischen Hämostase. Glykoprotein VI mediert hierbei die Thrombozytenadhäsion an freigelegtes Kollagen der Extrazellulärmatrrix im Bereich verletzter Gefäßwandstellen. Weitaus wichtiger ist seine Schlüsselrolle bei der Initiierung der unmittelbar hierauf folgenden Plättchenaktivierung, Plättchenaggregation und Thrombusbildung. Gefäßwandschäden werden so behoben und etwaige Blutverluste auf ein Minimum begrenzt. Darüber hinaus trägt Glykoprotein VI zur Entstehung pathologischer, thrombembolischer Ereignisse, wie beispielsweise dem akuten Myokardinfarkt oder dem ischämischen Schlaganfall, bei. Durch Ruptur atherosklerotischer Plaques kommt es hierbei zur Thrombozytenaktivierung und Bildung okklusiver Thromben. Da der Myokardinfarkt und der ischämische Schlaganfall zu den häufigsten Todesursachen in der westlichen Welt gehören, ist die medizinische Forschung daran interessiert, die zugrunde liegenden Pathomechanismen auf molekularer bzw. zellulärer Ebene aufzudecken und therapeutische Ansatzpunkte zu entwickeln. Im Laufe der Zeit wurden zudem genetische Aspekte evident, die zur Pathogenese thrombembolischer Ereignisse beitragen können und betroffene Patienten hierfür möglicherweise prädestinieren.

Glykoprotein VI erscheint in diesem Kontext als vielversprechendes Forschungsobjekt, da es eine entscheidende Komponente bei der Entstehung thrombembolischer Ereignisse darstellt und genetische Veränderungen des GP6 Gens mit klinischer Auswirkung bereits beschrieben worden sind.

Im Rahmen dieser wissenschaftlichen Arbeit wurden Einzelnukleotidpolymorphismen des Glykoprotein VI Gens in Hinblick auf ihre Assoziation mit kardiovaskulären Ereignissen und thrombozytärer Glykoprotein VI- Expression untersucht. Es wurden vier vielversprechende Einzelnukleotidpolymorphismen ausgewählt, nämlich rs1613662, rs1654419 und rs1671153 und rs12610286.

4.1 Einzelnukleotidpolymorphismus rs1613662

Der Einzelnukleotidpolymorphismus rs1613662 gehört zu den Genvarianten in der GP6 Genforschung, die am häufigsten untersucht wurden. Er bestimmt bei Kaukasiern die zwei weit verbreiteten Haplotypen des GP6 Gens, die auch als Major-Allel (AA-Allel) und Minor-Allel (GG-Allel) bezeichnet werden [124, 125, 135, 141, 166, 167]. Andere Haplotypen kommen seltener vor [124, 135, 141].

In dieser wissenschaftlichen Arbeit ergaben die Analysen des Einzelnukleotidpolymorphismus rs1613662 hinsichtlich der Fragestellung, ob eine Assoziation mit der Glykoprotein VI-Expression und kardiovaskulären Ereignissen vorliegt, folgende Ergebnisse:

Patienten mit vorliegendem GG-Allel (also dem homozygoten Minor-Allel [124, 135, 168, 169]) des rs1613662 wiesen numerisch gesehen höhere Raten an Myokardinfarkten und Todesfällen auf, jedoch ohne signifikante Zahlen zu erreichen. Unter den Allelen des rs1613662 zeigte das GG-Allel jedoch das niedrigste Glykoprotein VI-Expressionslevel auf der Thrombozytenmembran.

Das rs1613662 AA-Allel (Major-Allel [124, 135, 168, 169]) hingegen war mit einer höheren Glykoprotein VI-Expression assoziiert. Bei den klinischen Endpunkten konnten indessen keine signifikanten Ereignisse verzeichnet werden.

Entgegen der Erwartung, dass eine erhöhte thrombozytäre Glykoprotein VI-Expression mit vermehrtem Auftreten von pathologischen, kardiovaskulären Ereignissen einhergehen müsste [30, 38, 91, 101–104, 106, 107], konnte dieser kausale Zusammenhang in dieser Arbeit nicht hergestellt werden. Im Gegenteil: hier schienen insbesondere Patienten mit geringerem Glykoprotein VI-Expressionslevel der Thrombozyten vermehrt an thrombembolischen Ereignissen, wie hier dem akuten Myokardinfarkt, zu leiden und wiesen eine erhöhte Mortalität auf. Diese Diskrepanz legt nahe, dass dieser Sachverhalt in zukünftigen Studien weitergehend und explizit untersucht werden sollte. Weitere Messverfahren zur Thrombozytenaktivität sollten Berücksichtigung finden.

Das beobachtete Verhalten deckt sich mit der Literatur, denn in der GP6 Genforschung wurden über die Jahre insgesamt ebenfalls widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich der Auswirkung von rs1613662 auf die thrombozytäre Funktion und das Auftreten klinischer Ereignisse beobachtet.

Einige Studien berichten von einer Assoziation des Minor-Allels (GG-Allel) des Einzelnukleotidpolymorphismus rs1613662 mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse, insbesondere für das Auftreten von akuten Myokardinfarkten [124, 137, 139, 143]. Dies deckt sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit, auch wenn gleich eine statistische Signifikanz hinsichtlich des Auftretens von Myokardinfarkten bei der Patientengruppe mit vorliegendem rs1613662 Minor-Allel (GG-Allel) nicht erreicht werden konnte.

So berichteten Croft et al. schon 2001 von einer Assoziation des homozygoten Minor-Allels (GG-Allel) von rs1613662 mit einem erhöhtem Myokardinfarktrisiko, vor allem bei Älteren, Nichtrauchern und Frauen [124]. Das Risiko schien dort bei Patienten, welche zusätzlich Träger einer beta-Fibrinogenvariante waren, noch stärker erhöht zu sein [124].

Darüber hinaus kamen Ollikainen et al. durch Untersuchungen an den männlichen Patienten der Helsinki Sudden Death Study zu ähnlichen Ergebnissen [137]. Das Vorliegen des GG-Allels oder GA-Allels des Einzelnukleotidpolymorphismus rs1613662 war dort verbunden mit koronararteriellen Thrombosen und durchschnittlich größeren Arealen komplizierter Läsionen der Koronararterien („complicated coronary lesions“) [137]. Träger des GG-Allels oder des GA-Allels tendierten dazu, mit akuten Myokardinfarkten verbunden zu sein, jedoch ohne signifikante Zahlen zu erreichen [137].

In den Untersuchungen von Motovska et al. stellten sich das GG-Allel und das GA-Allel als unabhängige Risikofaktoren für das Auftreten von frühzeitigen Myokardinfarkten dar. Hierbei waren junge Frauen einem signifikant höheren Risiko ausgesetzt als Männer [139].

In einer anderen Studie war das Risiko an eine Kombination mit anderen Risikofaktoren geknüpft: Bei postmenopausalen Frauen war das rs1613662 Minor-Allel (GG-Allel) mit erhöhtem Myokardinfarktrisiko assoziiert, sofern die Frauen gleichzeitig unter Hormontherapie standen [143].

Etwaige Einnahme von Hormontherapien fand in dieser wissenschaftlichen Arbeit keine Beachtung, weshalb zu diesem Aspekt keine Aussage getroffen werden kann. Dieser Aspekt sollte jedoch in künftigen Untersuchungen berücksichtigt werden.

Neben den eben genannten Studien der Literatur und den Ergebnissen aus dieser Arbeit gibt es Untersuchungen, die zu gegenteiligen Ergebnissen hinsichtlich der Auswirkung des rs1613662 auf klinische Ereignisse kommen.

Die Untersuchungen im Rahmen des SMILE-Platelets Projekts ergaben beispielsweise, dass das Minor-Allel (GG-Allel) des rs1613662 mit einem verminderten Risiko für rezidivierendes Auftreten von kardiovaskulärer Ereignissen und Mortalität einhergeht [141]. Eine Assoziation mit dem Erstauftreten von Myokardinfarkten lag nicht vor [141].

Eine weitere Studie zeigte außerdem, dass das Minor-Allel (GG-Allel) die Träger sogar vor akuten Myokardinfarkten zu schützen scheint [138].

In anderen Studien war das Minor-Allel (GG-Allel) des rs1613662 mit einer verminderten Thrombozytenfunktion [141, 144] und reduzierten Liganden-mediierten Signaltransduktion verbunden [135, 141, 144, 145, 166, 167]. Dies unterstreicht erneut die Notwendigkeit weiterer Studien, die diese komplexe Thematik aufgreifen.

Hinsichtlich der Auswirkung von rs1613662 auf die thrombozytäre Glykoprotein VI-Expression existieren kontroverse Literaturdaten, besonders hervorzuheben sind hier [144] versus [145].

Die Untersuchungsergebnisse dieser Arbeit unterstützend, kam die Studie von Joutsu-Korhonen et al. zu einem ähnlichen Ergebnis bezüglich der Glykoprotein VI-Expressionslevel [144]. Thrombozyten von Probanden mit dem Minor-Allel (GG-Allel) wiesen bei Joutsu-Korhonen et al. in den durchflusszytometrischen Analysen einen signifikant geringeren Glykoprotein VI-Gehalt auf als die Thrombozyten des Major-Allels (AA-Allel) [144]. Dies entspricht tendenziell den in dieser Arbeit gezeigten Daten, wobei statistisch signifikante Werte hier nicht erreicht werden konnten (s.o.). Die Interpretation der Daten dieser wissenschaftlichen Arbeit lässt die Vermutung zu, dass es eine erhöhte funktionale Thrombozytenantwort bei den Trägern des Minor-Allels (GG-Allel) gibt, da diese zu erhöhten Myokardinfarktzahlen und erhöhter Mortalität tendierten. Die Untersuchungen von Joutsu-Korhonen et al. können diese Hypothese jedoch nicht weiter unterstützen.

Neben den eben genannten Studien zum GP6 Gen, die sich der Assoziation mit arteriellen thrombembolischen Ereignissen widmen, existieren ebenfalls klinische Untersuchungen zum Auftreten venöser Thrombosen in Kombination mit rs1613662, mit teilweise diskrepanten Daten [117, 134, 140, 141, 170]. Das Minor-Allel (GG-Allel) konnte in verschiedenen Studien mit einem verminderten Risiko für venöse Thrombosen assoziiert werden [134, 141, 170]. In einer anderen Studie jedoch wurde bei Patienten mit Sticky-Platelet-Syndrom, einer genetischen Thrombozytenerkran-

kung mit erhöhtem Auftreten arterieller und venöser Thrombosen, eine signifikante Verbindung zwischen dem Vorliegen des Minor-Allels (GG-Allel) des rs1613662 und dem Auftreten venöser Thrombosen beschrieben [140]. Darüber hinaus wurde bei weiblichen Trägerinnen des rs1613662 mit Sticky-Platelet-Syndrom ein erhöhtes Aufkommen von Fetaloden beschrieben [117].

Generell weisen alle oben genannten Studien eine große Heterogenität auf, was die Studienpopulation und die untersuchten Endpunkte betrifft, weshalb ein direkter Vergleich der Literaturdaten untereinander und der Literaturdaten mit dieser Arbeit nicht uneingeschränkt möglich ist [141]. Die Heterogenität der Studienpopulationen und der Endpunkte könnte demnach als eine von vielen potenziellen Ursachen für die kontroverse Studienlage gesehen werden.

Die Resultate dieser wissenschaftlichen Arbeit zeigen deutlich auf, dass die Träger des Minor-Allels (GG-Allel) des rs1613662 hier tendenziell häufiger Myokardinfarkte erlitten und eine höhere Gesamtmortalität aufwiesen, obwohl im Vergleich zu anderen Allelen (AA-Allel und GA-Allel) des rs1613662 ein geringerer thrombozytärer Glykoprotein VI-Gehalt vorlag.

Diese Arbeit legt nahe, dass eine von der Glykoprotein VI-Expression unabhängige, dennoch verstärkte thrombozytäre Funktion und hieraus resultierende Thrombozytenaggregation, als möglicher Pathomechanismus diskutiert werden kann. In dieser Untersuchung lag eine Überexpression des Glykoprotein VI-Rezeptors nicht vor. Daher scheiden herkömmliche Erklärungsmodelle im Sinne von Korrelationen zwischen Rezeptordichte und hierdurch bedingter verstärkter Thrombozytenfunktion und -aggregation aus. Insgesamt betrachtet stehen die hier erhobenen Daten partiell im Kontrast zu den Ergebnissen von publizierten Studien in der Literatur.

Ein neuer, vielversprechender Ansatz für weitere Untersuchungen könnte auf intrazellulärer, molekularer Ebene zu finden sein. Möglicherweise besteht bei den betroffenen Trägern des Minor-Allels (GG-Allel) eine veränderte Rezeptorsignaltransduktion und hieraus resultierende veränderte intrazelluläre Effektormechanismen. Es handelt sich hierbei um Komponenten, die in dieser Arbeit nicht integriert wurden und weshalb an dieser Stelle nur Hypothesen formuliert werden können.

Diese Arbeit zeigt deutlich, dass es in zünftigen Studien wichtig ist, die funktionale Zellantwort und das Aktivitätslevel der Thrombozyten zu inkludieren. Denkbare

Ansätze sind hierbei die Ermittlung von Downstream-Signaling-Ereignissen, wie die Tyrosinphosphorylierung und wie die Expression von P-Selektin als Thrombozytenaktivitätsmarker. Ergänzend könnte eine thrombozytäre Stimulanzmessung mittels Multiplate-Aggregometer durchgeführt werden.

Ein weiterer Erklärungsansatz um bei Patienten dieser Studie mit Minor-Allel (GG-Allel) des rs1613662 die erhöhte Rate an Myokardinfarkten sowie erhöhte Mortalität bei gleichzeitig reduzierter Glykoprotein VI-Expression aufzuzeigen, ist die Messung des Auftretens der löslichen Form des Glykoprotein VI.

Die Abspaltung und Plasmazirkulation des löslichen Glykoprotein VI wird durch verschiedene Faktoren ausgelöst, wie beispielsweise die Bindung an Kollagen oder durch den aktivierenden Faktor X der plasmatischen Blutgerinnung. Da es sich bei diesen auslösenden Faktoren prinzipiell um Aktivitätszeichen der Thrombozyten (Kollagenbindung) bzw. der plasmatischen Blutgerinnung (aktivierender Faktor X) handelt, ist es denkbar, dass zwar die thrombozytäre Glykoprotein VI-Expression zum Zeitpunkt der Expressionsanalyse reduziert sein kann, jedoch als Pendant hierzu bereits eine erhöhte Fraktion des löslichen Glykoproteins VI im Plasma besteht.

Diese Hypothese wird durch die Untersuchungsergebnisse von Trifiro et al. gestützt. Sie postulierten, dass das Major-Allel (AA-Allel) und das Minor-Allel (GG-Allel) des rs1613662 keinen statistisch signifikanten Effekt auf die thrombozytäre Glykoprotein VI-Expressionslevel haben. Jedoch fanden sie, dass die durch Glykoprotein VI vermittelte Signaltransduktion beeinflusst wird [145].

Abschließend lassen sich die Ergebnisse bezogen auf den Einzelnukleotidpolymorphismus rs1613662 wie folgt zusammenfassen: Die Untersuchungen ergaben, dass die Träger des Minor-Allels (GG-Allel) des rs1613662 die Tendenz hatten, häufiger einen Myokardinfarkt zu erleiden und insgesamt zu einer höheren Gesamtmortalität zu neigen. Es ist hierbei aufgefallen, dass diese Patienten eine geringere thrombozytäre Glykoprotein VI-Expression aufwiesen.

Die hier vorliegenden Daten erlauben jedoch keine eindeutige Erklärung für den zugrunde liegenden Pathomechanismus. Es wird deutlich, dass es noch unbekannte Faktoren gibt, die geklärt werden müssen, um einen konsistenten Erklärungsansatz zu bieten.

4.2 Einzelnukleotidpolymorphismus rs1654419

Der Einzelnukleotidpolymorphismus rs1654419 gehört im Vergleich zu dem eben behandelten rs1613662 zu den eher selteneren und weniger erforschten Einzelnukleotidpolymorphismen [124, 135, 141]. Wie der Einzelnukleotidpolymorphismus rs1613662 ist auch rs1654419 bei Patienten mit Sticky-Platelet-Syndrom mit dem Auftreten von venösen Thrombosen und höherem Aufkommen verbunden, insbesondere bei Trägern des AA-Allels und AG-Allels [117, 140].

Die Daten dieser wissenschaftlichen Arbeit ergaben nach bestem Wissen zum ersten Mal eine statistisch signifikante Assoziation des AA-Allels mit einer erhöhten Mortalität. Die Assoziation dieses Einzelnukleotidpolymorphismus mit dem klinischen Outcome erschien auch nach Adaptierung klinischer Risikofaktoren stabil. Numerisch gesehen zeigten die betroffenen Patienten höhere Raten an Myokardinfarkten und „major cardiovascular events“ (MACE), jedoch im Gegensatz zum Tod, ohne eine statistische Signifikanz zu erreichen. Im Vergleich zu den anderen beiden Allel-Varianten AG und GG des rs1654419 zeigte das AA-Allel in der Durchflusszytometrie die niedrigsten Glykoprotein VI-Expressionslevel. Hingegen wiesen die Träger des GG-Allels im Vergleich zu Trägern des AA-Allels etwas höhere Expressionslevel auf, jedoch ohne eine Verbindung zu klinischen Ereignissen.

Erneut verwundert hier die fehlende Übereinstimmung zwischen den unterschiedlichen Glykoprotein VI-Expressionslevel und dem klinischen Outcome. Normalerweise würde man erwarten, dass eine erhöhte Glykoprotein VI-Expression mit einem vermehrten Aufkommen an thrombembolischen Ereignissen verbunden ist, wie dies bereits oben diskutiert wurde. Die Datenlage dieser Arbeit legt jedoch die Vermutung nahe, dass eine Kausalität zwischen erhöhten Glykoprotein VI-Expressionslevel und vermehrtem Aufkommen an pathologischen klinischen Ereignissen nicht zwingend in jedem Fall bestehen muss. Aufgrund der Limitationen der durchgeführten Untersuchungen, wo funktionale Tests im Sinne von Analysen zellulärer Antworten und thrombozytärer Aktivitätsmarker, wie beispielsweise Expression von P-Selektin, nicht inkludiert wurden, sind an dieser Stelle nur die Formulierung von Hypothesen möglich. Wie bereits bei rs1613662 diskutiert wurde, könnte auch bei rs1654419 ein verändertes, durch Glykoprotein VI induziertes intrazelluläres Signaling ein potenzieller Erklärungsansatz für erhöhte Myokardinfarktraten und letztlich erhöhte Mortalität gesehen werden.

4.3 Einzelnukleotidpolymorphismus rs1671153

Der Einzelnukleotidpolymorphismus rs1671153 ist wenig erforscht und in der Literatur bei Patienten mit Sticky-Platelet-Syndrom mit venösen Thrombosen assoziiert [140]. In weiterführenden Studien zum Sticky-Platelet-Syndrom wiesen die Patientinnen mit besonders häufigen Fehlgeburten, zwei oder mehr, signifikant vermehrt den Einzelnukleotidpolymorphismus rs1671153 auf [117].

In den Untersuchungen dieser Arbeit zeigt sich zum besten Wissen erstmals, dass die Träger des GG-Allels des Einzelnukleotidpolymorphismus rs1671153 mit einer erhöhten Mortalität assoziiert sind. Dieses Ergebnis ist auch nach Adaptierung anderer klinischer Risikofaktoren stabil. Insgesamt litten diese Patienten vermehrt an Myokardinfarkten und „major cardiovascular events“, wobei die Zahlen jedoch nicht signifikant waren. Betrachtet man die thrombozytären Glykoprotein VI-Expressionslevel, ergaben sich bei Trägern des GG-Allels im Vergleich zu Trägern des GT-Allels oder des TT-Allels tendenziell etwas niedrigere Level, jedoch ohne statistische Signifikanz zu erreichen. Träger des TT-Allels waren im Gegensatz zu Trägern des GG-Allels mit einer höheren thrombozytären Glykoprotein VI-Expression in der durchflusszytometrischen Analyse assoziiert. Es konnten hierbei jedoch keine klinisch signifikanten Ereignisse zugeordnet werden.

4.4 Einzelnukleotidpolymorphismus rs12610286

Rs12610286 ist einer der Einzelnukleotidpolymorphismen des GP6 Gens, welcher bisher kaum erforscht wurde. Bei Patienten mit Typ 1 des Sticky-Platelet-Syndroms konnte das Vorliegen dieses Einzelnukleotidpolymorphismus jedoch gehäuft nachgewiesen werden [171].

In dieser wissenschaftlichen Arbeit konnten keinerlei signifikante Unterschiede in den klinischen Endpunkten oder der Glykoprotein VI-Expression festgestellt werden. Die drei verschiedenen Allele (AA-Allel, AG-Allel und GG-Allel) des rs12610286 wiesen zudem untereinander verglichen sehr ähnliche Glykoprotein VI-Expressionslevel auf. Aufgrund dieser Ergebnisse ist es fraglich, ob es sinnvoll ist, die begrenzten Forschungsmittel aufzuwenden, um diesen Einzelnukleotidpolymorphismus auf eine Assoziation in Hinblick auf Glykoprotein VI-Expression und kardiovaskuläre Ereignisse weiter zu erforschen.

4.5 Linkage Disequilibrium

Das Linkage Disequilibrium beschreibt eine nicht zufällige Assoziation zweier Allele auf zwei oder mehr Loci [172]. Das bedeutet, das Linkage Disequilibrium beschreibt bei einem Individuum die Korrelation zwischen dem Auftreten eines bestimmten Einzelnukleotidpolymorphismus-Allels an einer Stelle und das Auftreten von anderen spezifischen Allelen an benachbarten Stellen im Genom [173].

Einzelnukleotidpolymorphismen sind mit Diversität innerhalb und zwischen Populationen assoziiert. In der Literatur konnten manche Einzelnukleotidpolymorphismen mit individuellem Therapieansprechen und Anfälligkeit für Krankheiten in Verbindung gebracht werden [174].

Auch beim GP6 Gen stehen bestimmte Einzelnukleotidpolymorphismen im Linkage Disequilibrium [125, 135], beispielsweise rs1671152 und der in dieser Arbeit untersuchte rs1613662.

In der Population, die in dieser Arbeit untersucht wurde, waren die Einzelnukleotidpolymorphismen rs1654419, rs1671153 und rs1613662 im Linkage Disequilibrium. Der Einzelnukleotidpolymorphismus rs12610286 hingegen wies kein Linkage Disequilibrium auf. Nach bestem Wissen ist dies der erste Bericht dieses Zusammenhangs. Dieser Zusammenhang lässt vermuten, dass die Untersuchung eines einzelnen Einzelnukleotidpolymorphismus, wie sie Standard in der Literatur ist, nicht ausreichend ist, um eine Korrelation zwischen einem Einzelnukleotidpolymorphismus und klinischem Outcome herzustellen. In zukünftigen Studien müssen daher viele unterschiedliche Einzelnukleotidpolymorphismen untersucht und deren potenzielle Linkage Disequilibrien betrachtet werden.

Das hier gefundene Linkage Disequilibrium zwischen den Einzelnukleotidpolymorphismen rs1654419, rs1671153 und rs1613662 könnte eine weitere Erklärung dafür bieten, dass es in der Literatur teils widersprüchliche und inkongruente Ergebnisse hinsichtlich der Korrelation zwischen untersuchten Einzelnukleotidpolymorphismen des GP6 Gens und klinischer Auswirkung gibt. In bisherigen Untersuchungen wurde der Umstand, dass Einzelnukleotidpolymorphismen in einem Linkage Disequilibrium stehen könnten, in der Regel nicht selbstverständlich in das Studiendesign einbezogen. Die Untersuchungen dieser Arbeit legen jedoch nahe, dass das Linkage Disequilibrium ein wichtiger Faktor in der Beurteilung von Einzelnukleotidpolymorphismen hinsichtlich ihrer Assoziation mit klinischen Ereignissen darstellen könnte.

4.6 Uni- und multivariate Analyse

In der Auswertung der univariaten Analyse erscheinen das Alter, das weibliche Geschlecht, die eingeschränkte linksventrikuläre Pumpfunktion, die Hospitalisierung bei akutem Koronarsyndrom, der Diabetes mellitus und der homozygote Genotyp für rs1654419 (AA-Allel), rs1671153 (GG-Allel) und rs1613662 (GG-Allel) als signifikante Prädiktoren für die Mortalität unter den Patienten.

In der multivariaten Analyse hingegen bleiben nur die Genotypen von rs1654419 (AA-Allel), bzw. rs1671153 (GG-Allel) und rs1613662 (GG-Allel), sowie das Alter, die eingeschränkte Pumpfunktion und das akute Koronarsyndrom als signifikante Prädiktoren nach der Adjustierung bestehen.

Zu beachten ist das Linkage Disequilibrium der Einzelnukleotidpolymorphismen rs1654419, rs1671153 und rs1613662. Daher sind diese Einzelnukleotidpolymorphismen in der univariaten und auch der multivariaten Analyse als signifikant zu betrachten.

Bislang sind die Ergebnisse dieser Arbeit hinsichtlich der Assoziation der Einzelnukleotidpolymorphismen rs1654419 (AA-Allel) und rs1671153 (GG-Allel) mit einer erhöhten Mortalität einzigartig auf dem Gebiet der GP6 Genforschung. Soweit bekannt, ist dies der erste Bericht eines möglichen prognostischen Einflusses von rs1671153, rs1654419 und rs1613662 auf das klinische Outcome bei Patienten mit kardiovaskulärer Erkrankung.

4.7 Limitationen dieser Studie

Als limitierende Faktoren sind in dieser wissenschaftlichen Arbeit die potenziell zu geringen Fallzahlen und ausgesprochene Heterogenität der Population zu betrachten.

Retrospektiv zeigt sich als weiterer limitierender Faktor, dass die funktionale Zellantwort der Thrombozyten und andere Aktivitätsmarker, wie beispielsweise das lösliche Glykoprotein VI, nicht berücksichtigt wurden. Dadurch wird das Ausmaß der thrombozytären Reaktion möglicherweise unterschätzt. Hier ist jedoch einzuwenden, dass erst diese Arbeit diesen limitierenden Faktor aufzeigt und so deutlich wird, dass dieser Faktor in zukünftigen Studien unbedingt inkludiert werden muss.

Bislang wurde in Untersuchungen in der Literatur das Linkage Disequilibrium

nicht konsequent mit in das Studiendesign einbezogen. Diese Arbeit zeigt die Wichtigkeit dieses Aspektes bei der Beurteilung der Ergebnisse. Forschungsergebnisse, die das Linkage Disequilibrium nicht miteinbeziehen werden durch diesen fehlenden Faktor limitiert.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Glykoprotein VI ist ein thrombozytärer Kollagenrezeptor und wichtiger Bestandteil der primären Hämostase [3]. Er vermittelt die Bindung der Thrombozyten an freigelegtes Kollagen der extrazellulären Matrix. Weitaus entscheidender ist jedoch seine Rolle bei der Thrombozytenaktivierung: ein Vorgang, der durch die von Glykoprotein VI ausgelöste intrazelluläre Signalkaskade mediiert wird und letztlich in die Thrombozytenaggregation und Thrombusbildung mündet. Glykoprotein VI ist neben seiner physiologischen Funktion auch an der Atheroprogression und Pathogenese thrombembolischer Ereignisse beteiligt.

Kardiovaskuläre Erkrankungen, die auf dem Boden der Atherosklerose entstehen, insbesondere der akute Myokardinfarkt und der ischämische zerebrale Schlaganfall, gelten weltweit als führende Ursachen für Mortalität und Morbidität [12, 86, 87, 129, 175]. Sie stellen die heutige Medizin weiterhin vor große Herausforderungen, beispielsweise bei der Verbesserung therapeutischer Möglichkeiten und präventiver Maßnahmen.

In multiplen Studien konnten Alterationen der Glykoprotein VI-Expression und veränderte Signalwirkung mit dem Auftreten solch thrombembolischer Ereignisse in Verbindung gebracht werden [176]. Aus diesem Grund ist der thrombozytäre Kollagenrezeptor Glykoprotein VI weiterhin fester Bestandteil der medizinischen Forschung.

Seit vielen Jahren sind zudem genetische Komponenten bei der koronaren Herzerkrankung und bei arteriellen Thrombosen bekannt [127–131, 177]. Weiterhin ist das Auftreten eines frühen Todes an den Folgen koronarer Herzerkrankung ein starker Prädiktor für das Vorliegen genetischer Veränderungen [139, 177]. Auch beim GP6 Gen, welches dem Kollagenrezeptor Glykoprotein VI auf genetischer Ebene zugrunde liegt, konnten Assoziationen zu thrombembolischen Ereignissen und koronarer Herzerkrankung hergestellt werden [117, 124, 125, 136–140].

Diese wissenschaftliche Arbeit widmet sich der Untersuchung ausgewählter Einzelnukleotidpolymorphismen des GP6 Gens und deren mögliche Auswirkungen auf die thrombozytäre Glykoprotein VI-Expression und das klinische Outcome bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung.

Analysiert wurden die folgenden vier vielversprechend erscheinenden Einzelnukleotidpolymorphismen: rs1613662, rs1671153, rs1654419 und rs12610286. Dabei sind besonders die folgenden Untersuchungsergebnisse hervorzuheben.

Die beiden homozygoten Haplotypen der Einzelnukleotidpolymorphismen rs1671153 (GG-Allel) und rs1654419 (AA-Allel) waren mit einer erhöhten Mortalität der Träger assoziiert. Soweit bekannt, ist dies der erste Bericht eines potenziellen prognostischen Einflusses von rs1671153 und rs1654419 auf das klinische Outcome bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung.

Entgegen der Erwartung des initialen Studiendesigns zeigt der Einzelnukleotidpolymorphismus rs12610286 keinerlei signifikante Unterschiede in den klinischen Endpunkten oder der Glykoprotein VI-Expression. Die Expressionslevel aller Allele dieses Einzelnukleotidpolymorphismus lagen zwischen 35.992 und 36.761 und unterscheiden sich so kaum. Der erreichte p-Wert lag bei 0,833.

Retrospektiv wird deutlich, dass die funktionale Zellantwort der Thrombozyten und andere Aktivitätsmarker in zukünftigen Studien unbedingt inkludiert werden müssen, um klinische Auswirkungen des Glykoprotein VI, des GP6 Gens und der Glykoprotein VI-Expression suffizient beurteilen zu können.

Nach bestem Wissen zeigt diese Arbeit zum ersten Mal ein Linkage Disequilibrium zwischen den Einzelnukleotidpolymorphismen rs1654419, rs1671153 und rs1613662. So zeigt diese Arbeit, dass höchstwahrscheinlich eine Kombination aus genetischen Risikofaktoren zur Prädestinierung und Entstehung thrombembolischer Komplikationen beiträgt, als lediglich der Effekt einzelner Risikogene.

Die folgenden weiteren Ergebnisse dieser Arbeit können mit bisherigen Berichten in der Literatur in Einklang gebracht werden.

Hinsichtlich der Glykoprotein VI-Expression ergaben die durchflusszytometrischen Analysen kontroverse Ergebnisse. Bei den drei Einzelnukleotidpolymorphismen rs1613662, rs1654419 und rs1671153 waren die Unterschiede zwischen den Expressionslevel ihrer verschiedenen Allele statistisch signifikant, beim Einzelnukleotidpolymorphismus rs12610286 hingegen nicht. Dieses Resultat deckt sich mit weiteren Forschungsergebnissen in der Literatur [144, 145, 166].

In der Gesamtschau unterstützen die Ergebnisse dieser Arbeit die Hypothese, dass der Genotyp des Glykoprotein VI weniger Einfluss auf die thrombozytären Glykoprotein VI-Expressionslevel nimmt, als bisher angenommen wurde.

Homozygote Minor-Allel (GG-Allel) Träger des rs1613662, dem in der GP6 Genforschung bisher am meist untersuchten Einzelnukleotidpolymorphismus, wiesen tendenziell höhere Myokardinfarktzahlen und eine erhöhte Mortalität auf, was mit diversen Studien auf diesem Gebiet in Einklang gebracht werden kann [124, 137, 139, 143].

Insgesamt erscheint das Gebiet der Genetik sehr komplex und der konkrete Einfluss einzelner GP6 Einzelnukleotidpolymorphismen auf die thrombozytäre Glykoprotein VI- Expression und die Entstehung thrombembolischer Ereignisse kann nicht auf eine abschließende Formel heruntergebrochen werden. Bis zur kompletten Entschlüsselung der Komplexität der Pathogenese kardiovaskulärer Ereignisse, insbesondere vor dem Hintergrund genetischer Aspekte, ist es wichtig, die Forschung auf diesem Gebiet fortzuführen und weitergreifende Analysen anzustreben. Dies zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit eindrücklich.

Künftige Forschungen sollten neben dem Screening auf genetische Risikogene um folgende Messungen erweitert werden: Messung der Expressionslevel verschiedener thrombozytärer Rezeptoren, Analyse der Signaltransduktion im Rahmen der Thrombozytenaktivierung und Messung weiterer zellulärer Effekte.

Die Ergebnisse aus dieser wissenschaftlichen Arbeit untermauern die Wichtigkeit von Glykoprotein VI als vielversprechendes therapeutisches Target bei kardiovaskulären Erkrankungen, insbesondere bei arteriellen thrombembolischen Ereignissen, wie dem akuten Myokardinfarkt und dem zerebralen ischämischen Schlaganfall.

Es existieren bereits diverse Untersuchungen zur gezielten Inhibierung beziehungsweise Ausschaltung von Glykoprotein VI, beispielsweise mittels kompetitiver Inhibierung oder Immunodepletion [14, 30, 38, 178–194]. Potenzielle therapeutische Einsatzmöglichkeiten und klinische Auswirkungen [180, 182–184, 186–188, 193–196] werden bereits evaluiert.

In den bisherigen Experimenten war die Hemmung von Glykoprotein VI bzw. Aufhebung der Glykoprotein VI Wirkung nicht mit einem wesentlich erhöhten Blutungsrisiko verbunden, was eine sichere Anwendung am Menschen potenziell ermöglicht [30, 182, 188–190]. Diese Beobachtungen werden durch die Erfahrungen mit Patienten, die unter einem genetischen Glykoprotein VI Defekt leiden [30, 147, 148, 178] und vorangegangene Studien [30, 100, 197] weiter unterstützt.

Neben der Möglichkeit Glykoprotein VI als therapeutisches Target anzuwenden, birgt Glykoprotein VI zusätzlich das Potenzial einen Beitrag zur Prävention kardiovaskulärer Komplikationen zu leisten.

Im Bereich der Humanmedizin hat ein Paradigmenwechsel von starren Therapie-regimen hin zur vielfältigen, personalisierten Medizin, welche genetische Aspekte berücksichtigt, in vielen Bereichen bereits begonnen (exemplarisch [198–201]). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass genetische Varianten des Glykoprotein VI einen Einfluss auf das Auftreten thrombembolischer Ereignisse und Outcome bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung haben können.

Zum ersten Mal konnte ein potenzieller prognostischer Einfluss von rs1671153 und rs1654419 auf das klinische Outcome bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung nachgewiesen werden.

Mit diesem Wissen und gestützt auf multiple andere Studien erscheint es logisch, künftig genetische Screeninguntersuchungen in die Therapie und Prävention der koronaren Herzerkrankung zu implementieren. Bis dahin sind weitergehende Forschungen im Bereich des Glykoprotein VI und seiner genetischen Aspekte notwendig, um individualisierte Therapien fest zu etablieren und eine präzise Risikostratifizierung zu entwickeln.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Fleck E, Heinemann M, Meinertz T and Pott A (2019) Deutscher Herzbericht 2019. Deutsche Herzstiftung e.V, Frankfurt am Main
- [2] Junt T, Schulze H, Chen Z, Massberg S, Goerge T, Krueger A, Wagner DD, Graf T, Italiano JE, Shivdasani RA and von Andrian UH (2007) Dynamic Visualization of Thrombopoiesis Within Bone Marrow. *Science* 317(5845):1767–1770
- [3] Gawaz M (1999) Das Blutplättchen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- [4] Jurk K and Kehrel BE (2005) Platelets: Physiology and Biochemistry. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 31(4):381–392
- [5] Stefanini L and Bergmeier W (2018) Negative regulators of platelet activation and adhesion. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 16(2):220–230
- [6] Coughlin SR (1999) How the protease thrombin talks to cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96(20):11023–11027
- [7] Ruggeri ZM (2002) Platelets in atherothrombosis. *Nature Medicine* 8(11):1227–1234
- [8] Gawaz M, Langer H and May AE (2005) Platelets in inflammation and atherogenesis. *The Journal of Clinical Investigation* 115(12):3378–3384
- [9] Kaplan ZS and Jackson SP (2011) The Role of Platelets in Atherothrombosis. *Hematology* 2011(1):51–61
- [10] Schulz C, Penz S, Hoffmann C, Langer H, Gillitzer A, Schneider S, Brandl R, Seidl S, Massberg S, Pichler B, Kremmer E, Stellos K, Schönberger T, Siess W and Gawaz M (2008) Platelet GPVI binds to collagenous structures in the core region of human atheromatous plaque and is critical for atheroprogession in vivo. *Basic Research in Cardiology* 103(4):356–367
- [11] Nieswandt B, Pleines I and Bender M (2011) Platelet adhesion and activation mechanisms in arterial thrombosis and ischaemic stroke. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 9(1 S):92–104
- [12] Jackson SP (2011) Arterial thrombosis—insidious, unpredictable and deadly. *Nature Medicine* 17(11):1423–1436

- [13] Massberg S, Brand K, Grüner S, Page S, Müller E, Müller I, Bergmeier W, Richter T, Lorenz M, Konrad I, Nieswandt B and Gawaz M (2002) A Critical Role of Platelet Adhesion in the Initiation of Atherosclerotic Lesion Formation. *Journal of Experimental Medicine* 196(7):887–896
- [14] Massberg S, Gawaz M, Grüner S, Schulte V, Konrad I, Zohlnhöfer D, Heinzmann U and Nieswandt B (2002) A Crucial Role of Glycoprotein VI for Platelet Recruitment to the Injured Arterial Wall In Vivo. *Journal of Experimental Medicine* 197(1):41–49
- [15] Eble JA (2006) Gerinnungshemmende Wirkung von Schlangengiften: Freie Fahrt für flüssiges Blut. *Chemie in unserer Zeit* 40(5):326–337
- [16] Savage B, Saldívar E and Ruggeri ZM (1996) Initiation of Platelet Adhesion by Arrest onto Fibrinogen or Translocation on von Willebrand Factor. *Cell* 84(2):289–297
- [17] Savage B, Almus-Jacobs F and Ruggeri ZM (1998) Specific Synergy of Multiple Substrate–Receptor Interactions in Platelet Thrombus Formation under Flow. *Cell* 94(5):657–666
- [18] López JA, Andrews RK, Afshar-Kharghan V and Berndt MC (1998) Bernard-Soulier Syndrome. *Blood* 91(12):4397–4418
- [19] Nieswandt B and Watson SP (2003) Platelet-collagen interaction: Is GPVI the central receptor? *Blood* 102(2):449–461
- [20] Kehrel B, Wierwille S, Clemetson KJ, Anders O, Steiner M, Knight CG, Fardale RW, Okuma M and Barnes MJ (1998) Glycoprotein VI Is a Major Collagen Receptor for Platelet Activation: It Recognizes the Platelet-Activating Quaternary Structure of Collagen, Whereas CD36, Glycoprotein IIb/IIIa, and von Willebrand Factor Do Not. *Blood* 91(2):491–499
- [21] Jung SM, Tsuji K and Moroi M (2009) Glycoprotein (GP) VI dimer as a major collagen-binding site of native platelets: direct evidence obtained with dimeric GPVI-specific Fabs. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 7(8):1347–1355
- [22] Nieswandt B, Brakebusch C, Bergmeier W, Schulte V, Bouvard D, Mokhtari-Nejad R, Lindhout T, Heemskerk JWM, Zirngibl H and Fässler R (2001) Glycoprotein VI but not $\alpha 2\beta 1$ integrin is essential for platelet interaction with collagen. *The EMBO Journal* 20(9):2120–2130
- [23] Mazzucato M, Cozzi MR, Pradella P, Ruggeri ZM and De Marco L (2004) Distinct roles of ADP receptors in von Willebrand factor–mediated platelet signaling and activation under high flow. *Blood* 104(10):3221–3227

- [24] Li Z, Delaney MK, O'Brien KA and Du X (2010) Signaling During Platelet Adhesion and Activation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30(12):2341–2349
- [25] Moroi M, Onitsuka I, Imaizumi T and Jung SM (2000) Involvement of Activated Integrin $\alpha_2\beta_1$ in the Firm Adhesion of Platelets onto a Surface of Immobilized Collagen under Flow Conditions. *Thrombosis and Haemostasis* 83(05):769–776
- [26] Watson S, Berlanga O, Best D and Frampton J (2000) Update on collagen receptor interactions in platelets: is the two-state model still valid? *Platelets* 11(5):252–258
- [27] Kuijpers MJE, Schulte V, Bergmeier W, Lindhout T, Brakebusch C, Offermanns S, Fässler R, Heemskerk JWM and Nieswandt B (2003) Complementary roles of platelet glycoprotein VI and integrin $\alpha_2\beta_1$ in collagen-induced thrombus formation in flowing whole blood ex vivo. *The FASEB Journal* 17(6):685–687
- [28] Atkinson BT, Jarvis GE and Watson SP (2003) Activation of GPVI by collagen is regulated by $\alpha_2\beta_1$ and secondary mediators. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 1(6):1278–1287
- [29] Furie B and Furie BC (1992) *Molecular and Cellular Biology of Blood Coagulation*. *New England Journal of Medicine* 326(12):800–806
- [30] Dütting S, Bender M and Nieswandt B (2012) Platelet GPVI: A target for antithrombotic therapy?! *Trends in Pharmacological Sciences* 33(11):583–590
- [31] Gailani D and Renné T (2007) Intrinsic Pathway of Coagulation and Arterial Thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27(12):2507–2513
- [32] Periyah MH, Halim AS and Saad AZM (2017) Mechanism Action of Platelets and Crucial Blood Coagulation Pathways in Hemostasis. *International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research* 11(4):319–327
- [33] Patil S, Newman DK and Newman PJ (2001) Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 serves as an inhibitory receptor that modulates platelet responses to collagen. *Blood* 97(6):1727–1733
- [34] Ware JA and Heistad DD (1993) Platelet-Endothelium Interactions. *The New England Journal of Medicine* 328(9):628–635
- [35] Clemetson KJ and Clemetson JM (2001) Platelet Collagen Receptors. *Thrombosis and Haemostasis* 86(1):189–197

- [36] Totani L and Evangelista V (2010) Platelet–Leukocyte Interactions in Cardiovascular Disease and Beyond. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30(12):2357–2361
- [37] Gawaz M, Neumann FJ and Schömig A (1999) Evaluation of Platelet Membrane Glycoproteins in Coronary Artery Disease: Consequences for Diagnosis and Therapy. *Circulation* 99(1):1–11
- [38] Gawaz M, Vogel S, Pfannenbergl C, Pichler B, Langer H and Bigalke B (2014) Implications of glycoprotein VI for theranostics. *Thrombosis and Haemostasis* 112(1):26–31
- [39] Burkhart JM, Vaudel M, Gambaryan S, Radau S, Walter U, Martens L, Geiger J, Sickmann A and Zahedi RP (2012) The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways. *Blood* 120(15):73–82
- [40] Best D, Senis YA, Jarvis GE, Eagleton HJ, Roberts DJ, Saito T, Jung SM, Moroi M, Harrison P, Green FR and Watson SP (2003) GPVI levels in platelets: relationship to platelet function at high shear. *Blood* 102(8):2811–2818
- [41] Kehrel B (1995) Platelet–Collagen Interactions. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 21(2):123–129
- [42] Jandrot-Perrus M, Busfield S, Lagrue AH, Xiong X, Debili N, Chickering T, Le Couedic JP, Goodearl A, Dussault B, Fraser C, Vainchenker W and Villeval JL (2000) Cloning, characterization, and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the immunoglobulin superfamily. *Blood* 96(5):1798–1807
- [43] Jandrot-Perrus M, Busfield S, Lagrue AH, Xiong X, Debili N, Fraser C, Vainchenker W and Villeval JL (1999) Platelet glycoprotein VI: cloning, structure, and expression of a functional protein. *Blood* 94(10 Suppl 1):371a
- [44] Clemetson JM, Polgar J, Magnenat E, Wells TNC and Clemetson KJ (1999) The Platelet Collagen Receptor Glycoprotein VI Is a Member of the Immunoglobulin Superfamily Closely Related to Fc α R and the Natural Killer Receptors. *Journal of Biological Chemistry* 274(41):29019–29024
- [45] Clemetson KJ, McGregor JL, James E, Dechavanne M and Lüscher EF (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. *Journal of Clinical Investigation* 70(2):304–311

- [46] Sugiyama T, Okuma M, Ushikubi F, Sensaki S, Kanaji K and Uchino H (1987) A Novel Platelet Aggregating Factor Found in a Patient With Defective Collagen-Induced Platelet Aggregation and Autoimmune Thrombocytopenia. *Blood* 69(6):1712–1720
- [47] Moroi M, Jung SM, Okuma M and Shinmyozu K (1989) A Patient with Platelets Deficient in Glycoprotein VI That Lack Both Collagen-induced Aggregation and Adhesion. *Journal of Clinical Investigation* 84(5):1440–1445
- [48] Arai M, Yamamoto N, Moroi M, Akamatsu N, Fukutake K and Tanoue K (1995) Platelets with 10% of the normal amount of glycoprotein VI have an impaired response to collagen that results in a mild bleeding tendency. *British Journal of Haematology* 89(1):124–130
- [49] Takahashi H and Moroi M (2001) Antibody Against Platelet Membrane Glycoprotein VI in a Patient With Systemic Lupus Erythematosus. *American Journal of Hematology* 67(4):262–267
- [50] Furihata K, Clemetson KJ, Deguchi H and Kunicki TJ (2001) Variation in Human Platelet Glycoprotein VI Content Modulates Glycoprotein VI-Specific Prothrombinase Activity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 21(11):1857–1863
- [51] Miura Y, Takahashi T, Jung SM and Moroi M (2002) Analysis of the Interaction of Platelet Collagen Receptor Glycoprotein VI (GPVI) with Collagen: A Dimeric Form of GPVI, But Not the Monomeric Form, Shows Affinity to Fibrous Collagen. *Journal of Biological Chemistry* 277(48):46197–46204
- [52] Poulter NS, Pollitt AY, Owen DM, Gardiner EE, Andrews RK, Shimizu H, Ishikawa D, Bihan D, Farndale RW, Moroi M, Watson SP and Jung SM (2017) Clustering of glycoprotein VI (GPVI) dimers upon adhesion to collagen as a mechanism to regulate GPVI signaling in platelets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 15(3):549–564
- [53] Jung SM, Moroi M, Soejima K, Nakagaki T, Miura Y, Berndt MC, Gardiner EE, Howes JM, Pugh N, Bihan D, Watson SP and Farndale RW (2012) Constitutive Dimerization of Glycoprotein VI (GPVI) in Resting Platelets Is Essential for Binding to Collagen and Activation in Flowing Blood. *Journal of Biological Chemistry* 287(35):30000–30013
- [54] Loyau S, Dumont B, Ollivier V, Boulaftali Y, Feldman L, Ajzenberg N and Jandrot-Perrus M (2012) Platelet Glycoprotein VI Dimerization, an Active Process Inducing Receptor Competence, Is an Indicator of Platelet Reactivity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 32(3):778–785
- [55] Tsuji M, Ezumi Y, Arai M and Takayama H (1997) A Novel Association of Fc Receptor γ -Chain with Glycoprotein VI and Their Co-expression as a Collagen

- Receptor in Human Platelets. *Journal of Biological Chemistry* 272(38):23528–23531
- [56] Gibbins JM, Okuma M, Farndale R, Barnes M and Watson SP (1997) Glycoprotein VI is the collagen receptor in platelets which underlies tyrosine phosphorylation of the Fc receptor γ -chain. *FEBS Letters* 413(2):255–259
- [57] Nieswandt B, Bergmeier W, Schulte V, Rackebrandt K, Gessner JE and Zirngibl H (2000) Expression and Function of the Mouse Collagen Receptor Glycoprotein VI Is Strictly Dependent on Its Association with the FcR γ Chain. *Journal of Biological Chemistry* 275(31):23998–24002
- [58] Locke D, Liu C, Peng X, Chen H and Kahn ML (2003) Fc R γ -independent Signaling by the Platelet Collagen Receptor Glycoprotein VI. *Journal of Biological Chemistry* 278(17):15441–15448
- [59] Poole A, Gibbins JM, Turner M, van Vugt MJ, van de Winkel JGJ, Saito T, Tybulewicz VLJ and Watson SP (1997) The Fc receptor γ -chain and the tyrosine kinase Syk are essential for activation of mouse platelets by collagen. *The EMBO Journal* 16(9):2333–2341
- [60] Suzuki-Inoue K, Tulasne D, Shen Y, Bori-Sanz T, Inoue O, Jung SM, Moroi M, Andrews RK, Berndt MC and Watson SP (2002) Association of Fyn and Lyn with the Proline-rich Domain of Glycoprotein VI Regulates Intracellular Signaling. *Journal of Biological Chemistry* 277(24):21561–21566
- [61] Lagrue-Lak-Hal AH, Debili N, Kingbury G, Lecut C, Le Couedic JP, Villeval JL, Jandrot-Perrus M and Vainchenker W (2001) Expression and Function of the Collagen Receptor GPVI during Megakaryocyte Maturation. *Journal of Biological Chemistry* 276(18):15316–15325
- [62] Zheng YM, Liu C, Chen H, Locke D, Ryan JC and Kahn ML (2001) Expression of the Platelet Receptor GPVI Confers Signaling via the Fc Receptor γ -Chain in Response to the Snake Venom Convulxin but Not to Collagen. *Journal of Biological Chemistry* 276(16):12999–13006
- [63] Berlanga O, Tulasne D, Bori T, Snell DC, Miura Y, Jung S, Moroi M, Framp-ton J and Watson SP (2002) The Fc receptor γ -chain is necessary and sufficient to initiate signalling through glycoprotein VI in transfected cells by the snake C-type lectin, convulxin. *European Journal of Biochemistry* 269(12):2951–2960
- [64] Bori-Sanz T, Inoue KS, Berndt MC, Watson SP and Tulasne D (2003) Delineation of the Region in the Glycoprotein VI Tail Required for Association with the Fc Receptor γ -Chain. *Journal of Biological Chemistry* 278(38):35914–35922

- [65] Ezumi Y, Shindoh K, Tsuji M and Takayama H (1998) Physical and Functional Association of the Src Family Kinases Fyn and Lyn with the Collagen Receptor Glycoprotein VI-Fc Receptor γ Chain Complex on Human Platelets. *Journal of Experimental Medicine* 188(2):267–276
- [66] Quek LS, Pasquet JM, Hers I, Cornall R, Knight G, Barnes M, Hibbs ML, Dunn AR, Lowell CA and Watson SP (2000) Fyn and Lyn phosphorylate the Fc receptor γ chain downstream of glycoprotein VI in murine platelets, and Lyn regulates a novel feedback pathway. *Blood* 96(13):4246–4253
- [67] Briddon SJ and Watson SP (1999) Evidence for the involvement of p59^{fyn} and p53/56^{lyn} in collagen receptor signalling in human platelets. *Biochemical Journal* 338(1):203–209
- [68] Gardiner EE, Arthur JF, Kahn ML, Berndt MC and Andrews RK (2004) Regulation of platelet membrane levels of glycoprotein VI by a platelet-derived metalloproteinase. *Blood* 104(12):3611–3617
- [69] Naitoh K, Hosaka Y, Honda M, Ogawa K, Shirakawa K and Furusako S (2015) Properties of soluble glycoprotein VI, a potential platelet activation biomarker. *Platelets* 26(8):745–750
- [70] Montague SJ, Delierneux C, Lecut C, Layios N, Dinsdale RJ, Lee CSM, Poulter NS, Andrews RK, Hampson P, Wearn CM, Maes N, Bishop J, Bamford A, Gardiner C, Lee WM, Iqbal T, Moiemmen N, Watson SP, Oury C, Harrison P and Gardiner EE (2018) Soluble GPVI is elevated in injured patients: shedding is mediated by fibrin activation of GPVI. *Blood Advances* 2(3):240–251
- [71] Stephens G, Yan Y, Jandrot-Perrus M, Villeval JL, Clemetson KJ and Phillips DR (2005) Platelet activation induces metalloproteinase-dependent GP VI cleavage to down-regulate platelet reactivity to collagen. *Blood* 105(1):186–191
- [72] Al-Tamimi M, Tan CW, Qiao J, Pennings GJ, Javadzadegan A, Yong ASC, Arthur JF, Davis AK, Jing J, Mu FT, Hamilton JR, Jackson SP, Ludwig A, Berndt MC, Ward CM, Kritharides L, Andrews RK and Gardiner EE (2012) Pathologic shear triggers shedding of vascular receptors: A novel mechanism for down-regulation of platelet glycoprotein VI in stenosed coronary vessels. *Blood* 119(18):4311–4320
- [73] Bigalke B, Pötz O, Kremmer E, Geisler T, Seizer P, Puntmann VO, Phinikaridou A, Chiribiri A, Nagel E, Botnar RM, Joos T and Gawaz M (2011) Sandwich Immunoassay for Soluble Glycoprotein VI in Patients with Symptomatic Coronary Artery Disease. *Clinical Chemistry* 57(6):898–904

- [74] Al-Tamimi M, Grigoriadis G, Tran H, Paul E, Servadei P, Berndt MC, Gardiner EE and Andrews RK (2011) Coagulation-induced shedding of platelet glycoprotein VI mediated by factor Xa. *Blood* 117(14):3912–3920
- [75] Moroi M and Jung SM (1998) Integrin-mediated platelet adhesion. *Frontiers in Bioscience* 3(4):719–728
- [76] Nieswandt B, Bergmeier W, Eckly A, Schulte V, Ohlmann P, Cazenave JP, Zirngibl H, Offermanns S and Gachet C (2001) Evidence for cross-talk between glycoprotein VI and Gi-coupled receptors during collagen-induced platelet aggregation. *Blood* 97(12):3829–3835
- [77] Atkinson BT, Stafford MJ, Pears CJ and Watson SP (2001) Signalling events underlying platelet aggregation induced by the glycoprotein VI agonist convulxin. *European Journal of Biochemistry* 268(20):5242–5248
- [78] Tschopp TB and Baumgartner H (1976) Enzymatic Removal of ADP from Plasma: Unaltered Platelet Adhesion but Reduced Aggregation on Subendothelium and Collagen Fibrils. *Thrombosis and Haemostasis* 35(02):334–341
- [79] Goto S, Tamura N, Handa S, Arai M, Kodama K and Takayama H (2002) Involvement of Glycoprotein VI in Platelet Thrombus Formation on Both Collagen and von Willebrand Factor Surfaces Under Flow Conditions. *Circulation* 106(2):266–272
- [80] Mammadova-Bach E, Ollivier V, Loyau S, Schaff M, Dumont B, Favier R, Freyburger G, Latger-Cannard V, Nieswandt B, Gachet C, Mangin PH and Jandrot-Perrus M (2015) Platelet glycoprotein VI binds to polymerized fibrin and promotes thrombin generation. *Blood* 126(5):683–692
- [81] Mori J, Pearce AC, Spalton JC, Grygielska B, Eble JA, Tomlinson MG, Senis YA and Watson SP (2008) G6b-B Inhibits Constitutive and Agonist-induced Signaling by Glycoprotein VI and CLEC-2. *Journal of Biological Chemistry* 283(51):35419–35427
- [82] Watson SP, Herbert JM and Pollitt AY (2010) GPVI and CLEC-2 in hemostasis and vascular integrity. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 8(7):1457–1467
- [83] Gardiner EE, Karunakaran D, Shen Y, Arthur JF, Andrews RK and Berndt MC (2007) Controlled shedding of platelet glycoprotein (GP)VI and GPIb-IX-V by ADAM family metalloproteinases. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 5(7):1530–1537
- [84] Rabie T, Varga-Szabo D, Bender M, Pozgaj R, Lanza F, Saito T, Watson SP and Nieswandt B (2007) Diverging signaling events control the pathway of GPVI down-regulation in vivo. *Blood* 110(2):529–535

- [85] Stoll G, Kleinschnitz C and Nieswandt B (2008) Molecular mechanisms of thrombus formation in ischemic stroke: novel insights and targets for treatment. *Blood* 112(9):3555–3562
- [86] Ross R (1999) *Atherosclerosis — An Inflammatory Disease*. New England Journal of Medicine 340(2):115–126
- [87] Alwan A (2011) *Global status report on noncommunicable diseases 2010*. World Health Organization, Geneva
- [88] Geisler T, Graß D, Bigalke B, Stellos K, Drosch T, Dietz K, Herdeg C and Gawaz M (2008) The Residual Platelet Aggregation after Deployment of Intracoronary Stent (PREDICT) score. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 6(1):54–61
- [89] Fateh-Moghadam S, Htun P, Tomandl B, Sander D, Stellos K, Geisler T, Langer H, Walton K, Handschu R, Garlichs C, Daniel WG and Gawaz M (2007) Hyperresponsiveness of platelets in ischemic stroke. *Thrombosis and Haemostasis* 97(06):974–978
- [90] Stellos K, Bigalke B, Stakos D, Henkelmann N and Gawaz M (2010) Platelet-bound P-selectin expression in patients with coronary artery disease: impact on clinical presentation and myocardial necrosis, and effect of diabetes mellitus and anti-platelet medication. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 8(1):205–207
- [91] Bigalke B, Haap M, Stellos K, Geisler T, Seizer P, Kremmer E, Overkamp D and Gawaz M (2010) Platelet glycoprotein VI (GPVI) for early identification of acute coronary syndrome in patients with chest pain. *Thrombosis Research* 125(5):e184–e189
- [92] Schönberger T, Siegel-Axel D, Bussl R, Richter S, Judenhofer MS, Haubner R, Reischl G, Klingel K, Münch G, Seizer P, Pichler BJ and Gawaz M (2008) The immunoadhesin glycoprotein VI-Fc regulates arterial remodelling after mechanical injury in ApoE^{-/-} mice. *Cardiovascular Research* 80(1):131–137
- [93] Bültmann A, Li Z, Wagner S, Peluso M, Schönberger T, Weis C, Konrad I, Stellos K, Massberg S, Nieswandt B, Gawaz M, Ungerer M and Münch G (2010) Impact of glycoprotein VI and platelet adhesion on atherosclerosis—A possible role of fibronectin. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 49(3):532–542
- [94] Dietel M (2016) *Harrisons Hämatologie und Onkologie*. ABW Wissenschaftsverlagsgesellschaft, 1 edition

- [95] Penz S, Reininger AJ, Brandl R, Goyal P, Rabie T, Bernlochner I, Rother E, Goetz C, Engelmann B, Smethurst PA, Ouwehand WH, Farndale R, Nieswandt B and Siess W (2005) Human atheromatous plaques stimulate thrombus formation by activating platelet glycoprotein VI. *The FASEB Journal* 19(8):898–909
- [96] Cosemans JMEM, Kuijpers MJE, Lecut C, Loubele STBG, Heeneman S, Jandrot-Perrus M and Heemskerk JWM (2005) Contribution of platelet glycoprotein VI to the thrombogenic effect of collagens in fibrous atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 181(1):19–27
- [97] Reininger AJ, Bernlochner I, Penz SM, Ravanat C, Smethurst P, Farndale RW, Gachet C, Brandl R and Siess W (2010) A 2-Step Mechanism of Arterial Thrombus Formation Induced by Human Atherosclerotic Plaques. *Journal of the American College of Cardiology* 55(11):1147–1158
- [98] Bültmann A, Herdeg C, Li Z, Münch G, Baumgartner C, Langer H, Kremmer E, Geisler T, May A, Ungerer M and Gawaz M (2006) Local delivery of soluble platelet collagen receptor glycoprotein VI inhibits thrombus formation in vivo. *Thrombosis and Haemostasis* 95(5):763–766
- [99] Kuijpers MJE, Gilio K, Reitsma S, Nergiz-Unal R, Prinzen L, Heeneman S, Lutgens E, van Zandvoort MAMJ, Nieswandt B, Oude Egbrink MGA and Heemskerk JWM (2009) Complementary roles of platelets and coagulation in thrombus formation on plaques acutely ruptured by targeted ultrasound treatment: a novel intravital model. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 7(1):152–161
- [100] Lockyer S, Okuyama K, Begum S, Le S, Sun B, Watanabe T, Matsumoto Y, Yoshitake M, Kambayashi J and Tandon NN (2006) GPVI-deficient mice lack collagen responses and are protected against experimentally induced pulmonary thromboembolism. *Thrombosis Research* 118(3):371–380
- [101] Bigalke B, Lindemann S, Ehlers R, Seizer P, Daub K, Langer H, Schonberger T, Kremmer E, Siegel-Axel D, May AE and Gawaz M (2006) Expression of platelet collagen receptor glycoprotein VI is associated with acute coronary syndrome. *European Heart Journal* 27(18):2165–2169
- [102] Bigalke B, Stellos K, Weig HJ, Geisler T, Seizer P, Kremmer E, Pötz O, Joos T, May AE, Lindemann S and Gawaz M (2009) Regulation of platelet glycoprotein VI (GPVI) surface expression and of soluble GPVI in patients with atrial fibrillation (AF) and acute coronary syndrome (ACS). *Basic Research in Cardiology* 104(3):352–357
- [103] Bigalke B, Stellos K, Geisler T, Lindemann S, May AE and Gawaz M (2010) Glycoprotein VI as a prognostic biomarker for cardiovascular death in patients

- with symptomatic coronary artery disease. *Clinical Research in Cardiology* 99(4):227–233
- [104] Bigalke B, Geisler T, Stellos K, Langer H, Daub K, Kremmer E, Seizer P, May AE, Lindemann S and Gawaz M (2008) Platelet collagen receptor glycoprotein VI as a possible novel indicator for the acute coronary syndrome. *American Heart Journal* 156(1):193–200
- [105] Bigalke B, Stellos K, Geisler T, Kremmer E, Seizer P, May AE, Lindemann S and Gawaz M (2011) Glycoprotein VI for diagnosis of acute coronary syndrome when ECG is ambiguous. *International Journal of Cardiology* 149(2):164–168
- [106] Bigalke B, Stellos K, Geisler T, Kremmer E, Seizer P, May AE, Lindemann S, Melms A, Luft A and Gawaz M (2010) Expression of platelet glycoprotein VI is associated with transient ischemic attack and stroke. *European Journal of Neurology* 17(1):111–117
- [107] Al-Tamimi M, Gardiner EE, Thom JY, Shen Y, Cooper MN, Hankey GJ, Berndt MC, Baker RI and Andrews RK (2011) Soluble Glycoprotein VI Is Raised in the Plasma of Patients With Acute Ischemic Stroke. *Stroke* 42(2):498–500
- [108] Kleinschnitz C, Pozgajova M, Pham M, Bendszus M, Nieswandt B and Stoll G (2007) Targeting Platelets in Acute Experimental Stroke - Impact of Glycoprotein Ib, VI, and IIb/IIIa Blockade on Infarct Size, Functional Outcome, and Intracranial Bleeding. *Circulation* 115(17):2323–2330
- [109] Stoll G, Kleinschnitz C and Nieswandt B (2010) Combating innate inflammation: a new paradigm for acute treatment of stroke? *Annals of the New York Academy of Sciences* 1207(1):149–154
- [110] Thornton P, McColl BW, Greenhalgh A, Denes A, Allan SM and Rothwell NJ (2010) Platelet interleukin-1 α drives cerebrovascular inflammation. *Blood* 115(17):3632–3640
- [111] Schulz C, Leuschen NV, Fröhlich T, Lorenz M, Pfeiler S, Gleissner CA, Kremmer E, Kessler M, Khandoga AG, Engelmann B, Ley K, Massberg S and Arnold GJ (2010) Identification of novel downstream targets of platelet glycoprotein VI activation by differential proteome analysis: implications for thrombus formation. *Blood* 115(20):4102–4110
- [112] Müller F, Mutch NJ, Schenk WA, Smith SA, Esterl L, Spronk HM, Schmidbauer S, Gahl WA, Morrissey JH and Renné T (2009) Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo. *Cell* 139(6):1143–1156

- [113] Schaaf CP and Zschocke J (2013) Basiswissen Humangenetik. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg
- [114] Hellenbroich Y and Klein C (2011) Grundlagen der Humangenetik: Vom Stammbaum zur Genanalyse. Sprache · Stimme · Gehör 35(02):72–77
- [115] Buselmaier W (2009) Biologie für Mediziner. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 11 edition
- [116] Skille H, Paulsen B, Hveem K, Gabrielsen ME, Brumpton B, Hindberg K, Gran OV, Rosendaal FR, Brækkan SK and Hansen JB (2020) Genetic variation of platelet glycoprotein VI and the risk of venous thromboembolism. *Haematologica* 105(7):e358–e360
- [117] Sokol J, Biringer K, Skerenova M, Hasko M, Bartosova L, Stasko J, Danko J and Kubisz P (2012) Platelet aggregation abnormalities in patients with fetal losses: The GP6 gene polymorphism. *Fertility and Sterility* 98(5):1170–1174
- [118] Ezumi Y, Uchiyama T and Takayama H (2000) Molecular Cloning, Genomic Structure, Chromosomal Localization, and Alternative Splice Forms of the Platelet Collagen Receptor Glycoprotein VI. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 277(1):27–36
- [119] Single Nucleotide Polymorphism Data Base - Entry for rs1613662 - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1613662> (Date Accessed: 02.06.2021)
- [120] Single Nucleotide Polymorphism Data Base - Entry for rs1654419 - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1654419> (Date Accessed: 02.06.2021)
- [121] Single Nucleotide Polymorphism Data Base - Entry for rs1671153 - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1671153> (Date Accessed: 02.06.2021)
- [122] Single Nucleotide Polymorphism Data Base - Entry for rs12610286 - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs12610286> (Date Accessed: 02.06.2021)
- [123] HUGO Gene Nomenclature Committee https://www.genenames.org/data/gene-symbol-report/#!/hgnc_id/HGNC:14388 (Date Accessed: 10.03.2019)
- [124] Croft SA, Samani NJ, Teare MD, Hampton KK, Steeds RP, Channer KS and Daly ME (2001) Novel Platelet Membrane Glycoprotein VI Dimorphism Is a Risk Factor for Myocardial Infarction. *Circulation* 104(13):1459–1463
- [125] Watkins NA, O'Connor MN, Rankin A, Jennings N, Wilson E, Harmer IJ, Davies L, Smethurst PA, Dudbridge F, Farndale RW and Ouwehand WH (2006) Definition of novel GP6 polymorphisms and major difference in haplotype frequencies between populations by a combination of in-depth exon resequencing and genotyping with tag single nucleotide polymorphisms. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 4(6):1197–1205

- [126] Schaaf C and Zschocke J (2018) *Basiswissen Humangenetik*. Springer-Verlag
- [127] Williams MS and Bray PF (2001) Genetics of Arterial Prothrombotic Risk States. *Experimental Biology and Medicine* 226(5):409–419
- [128] Samani NJ, Erdmann J, Hall AS, Hengstenberg C, Mangino M, Mayer B, Dixon RJ, Meitinger T, Braund P, Wichmann HE, Barrett JH, König IR, Stevens SE, Szymczak S, Tregouet DA, Iles MM, Pahlke F, Pollard H, Lieb W, Cambien F, Fischer M, Ouwehand W, Blankenberg S, Balmforth AJ, Baessler A, Ball SG, Strom TM, Brænne I, Gieger C, Deloukas P, Tobin MD, Ziegler A, Thompson JR and Schunkert H (2007) Genomewide Association Analysis of Coronary Artery Disease. *The New England Journal of Medicine* 357(5):443–453
- [129] Montagnana M, Danese E and Lippi G (2014) Genetic risk factors of atherothrombosis. *Polish Archives of Internal Medicine* 124(9):474–482
- [130] Ardissino D, Mannucci PM, Merlini PA, Duca F, Fève R, Tagliabue L, Tubaro M, Galvani M, Ottani F, Ferrario M, Corral J and Margaglione M (1999) Prothrombotic Genetic Risk Factors in Young Survivors of Myocardial Infarction. *Blood* 94(1):46–51
- [131] Incalcaterra E, Hoffmann E, Aversa M and Caimi G (2004) Genetic risk factors in myocardial infarction at young age. *Minerva Cardioangiologica* 52(4):287–312
- [132] Yee DL and Bray PF (2004) Clinical and Functional Consequences of Platelet Membrane Glycoprotein Polymorphisms. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 30(5):591–600
- [133] Ye Z, Liu EHC, Higgins JPT, Keavney BD, Lowe GDO, Collins R and Danesh J (2006) Seven haemostatic gene polymorphisms in coronary disease: meta-analysis of 66 155 cases and 91 307 controls. *The Lancet* 367(9511):651–658
- [134] Trégouët DA, Heath S, Saut N, Biron-Andreani C, Schved JF, Pernod G, Galan P, Drouet L, Zelenika D, Juhan-Vague I, Alessi MC, Tiret L, Lathrop M, Emmerich J and Morange PE (2009) Common susceptibility alleles are unlikely to contribute as strongly as the FV and ABO loci to VTE risk : results from a GWAS approach. *Blood* 113(21):5298–5304
- [135] Johnson AD, Yanek LR, Chen MH, Faraday N, Larson MG, Tofler G, Lin SJ, Kraja AT, Province MA, Yang Q, Becker DM, O'Donnell CJ and Becker LC (2010) Genome-wide meta-analyses identifies 7 loci associated with platelet aggregation in response to agonists. *Nature Genetics* 42(7):608–613
- [136] Tagaki S, Iwai N, Baba S, Mannami T, Ono K, Tanaka C, Miyata T, Miyazaki S, Nonogi H and Goto Y (2002) A GPVI polymorphism is a risk factor for myocardial infarction in Japanese. *Atherosclerosis* 165(2):397–398

- [137] Ollikainen E, Mikkelsen J, Perola M, Penttilä A and Karhunen PJ (2004) Platelet membrane collagen receptor glycoprotein VI polymorphism is associated with coronary thrombosis and fatal myocardial infarction in middle-aged men. *Atherosclerosis* 176(1):95–99
- [138] Shaffer JR, Kammerer CM, Dorn J, Ferrell RE, Iacoviello L, Trevisan M and Donahue RP (2011) Polymorphisms in the platelet-specific collagen receptor GP6 are associated with risk of nonfatal myocardial infarction in Caucasians. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 21(8):546–552
- [139] Motovska Z, Kvasnicka J, Widimsky P, Petr R, Hajkova J, Bobcikova P, Os-mancik P, Odvodyova D and Katina S (2010) Platelet glycoprotein GP VI 13254C allele is an independent risk factor of premature myocardial infarction. *Thrombosis Research* 125(2):e61–e64
- [140] Kotuličová D, Chudý P, Škereňová M, Ivanková J, Dobrotová M and Kubisz P (2012) Variability of GP6 gene in patients with sticky platelet syndrome and deep venous thrombosis and/or pulmonary embolism. *Blood Coagulation & Fibrinolysis* 23(6):543–547
- [141] Snoep JD, Gaussem P, Eikenboom JCJ, Emmerich J, Zwaginga JJ, Holmes CE, Vos HL, De Groot PG, Herrington DM, Bray PF, Rosendaal FR and van der Bom JG (2010) The minor allele of GP6 T13254C is associated with decreased platelet activation and a reduced risk of recurrent cardiovascular events and mortality: results from the SMILE-Platelets project. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 8(11):2377–2384
- [142] Cole VJ, Staton JM, Eikelboom JW, Hankey GJ, Yi Q, Shen Y, Berndt MC and Baker RI (2003) Collagen platelet receptor polymorphisms integrin $\alpha 2\beta 1$ C807T and GPVI Q317L and risk of ischemic stroke. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 1(5):963–970
- [143] Bray PF, Howard TD, Vittinghoff E, Sane DC and Herrington DM (2007) Effect of genetic variations in platelet glycoproteins Iba and VI on the risk for coronary heart disease events in postmenopausal women taking hormone therapy. *Blood* 109(5):1862–1869
- [144] Joutsu-Korhonen L, Smethurst PA, Rankin A, Gray E, IJsseldijk M, Onley CM, Watkins NA, Williamson LM, Goodall AH, De Groot PG, Farndale RW and Ouwehand WH (2003) The low-frequency allele of the platelet collagen signaling receptor glycoprotein VI is associated with reduced functional response and expression. *Blood* 101(11):4372–4379
- [145] Trifiro E, Williams SA, Cheli Y, Furihata K, Pulcinelli FM, Nugent DJ and Kunicki TJ (2009) The low-frequency isoform of platelet glycoprotein VIb attenuates ligand-mediated signal transduction but not receptor expression or ligand binding. *Blood* 114(9):1893–1899

- [146] Freson K, Hermans C, Thys C and Van Geet C (2007) GPVI Mutation and Absent Platelet Collagen Activation in a Patient with a Bleeding Disorder. *Blood* 110(11):2106
- [147] Hermans C, Wittevrongel C, Thys C, Smethurst PA, Van Geet C and Freson K (2009) A compound heterozygous mutation in glycoprotein VI in a patient with a bleeding disorder. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 7(8):1356–1363
- [148] Dumont B, Lasne D, Rothschild C, Bouabdelli M, Ollivier V, Oudin C, Ajzenberg N, Grandchamp B and Jandrot-Perrus M (2009) Absence of collagen-induced platelet activation caused by compound heterozygous GPVI mutations. *Blood* 114(9):1900–1903
- [149] Hamm C, Arntz H, Bode C, Giannitsis E, Katus H, Levenson B, Nordt T, Neumann F, Tebbe U and Zahn R (2004) Pocket-Leitlinie: Akutes Koronarsyndrom (ACS). Deutsche Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung e.V.
- [150] Hamm CW (2004) Leitlinien: Akutes Koronarsyndrom (ACS) - Teil 1: ACS ohne persistierende ST-Hebung. *Zeitschrift für Kardiologie* 93(1):72–90
- [151] Hamm CW (2004) Leitlinien: Akutes Koronarsyndrom (ACS) - Teil 2: Akutes Koronarsyndrom mit ST-Hebung. *Zeitschrift für Kardiologie* 93(4):324–341
- [152] Achenbach S, Szardien S, Zeymer U, Gielen S and Hamm C (2012) Kommentar zu den Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) zur Diagnostik und Therapie des akuten Koronarsyndroms ohne persistierende ST-Streckenhebung. *Kardiologie* 6(4):283–301
- [153] Achenbach S and Hamm C (2012) Pocket-Leitlinie: Akutes Koronarsyndrom ohne ST-Hebung (NSTEMI-ACS). Deutsche Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung e.V
- [154] Hamm CW, Bassand J, Agewall S, Bax J, Boersma E, Bueno H, Caso P, Dudek D, Gielen S, Huber K, Ohman M, Petrie MC, Sonntag F, Uva MS, Storey RF, Wijns W, Zahger D, Bax JJ, Auricchio A, Baumgartner H, Ceconi C, Dean V, Deaton C, Fagard R, Funck-Brentano C, Hasdai D, Hoes A, Knuuti J, Kolh P, McDonagh T, Moulin C, Poldermans D, Popescu BA, Reiner Z, Sechtem U, Sirnes PA, Torbicki A, Vahanian A, Windecker S, Achenbach S, Badimon L, Bertrand M, Botker HE, Collet JP, Crea F, Danchin N, Falk E, Goudevenos J, Gulba D, Hambrecht R, Herrmann J, Kastrati A, Kjeldsen K, Kristensen SD, Lancellotti P, Mehilli J, Merkely B, Montalescot G, Neumann FJ, Neyses L, Perk J, Roffi M, Romeo F, Ruda M, Swahn E, Valgimigli M, Vrints CJ and Widimsky P (2011) ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation:

- The Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal* 32(23):2999–3054
- [155] Hamm CW, Albrecht A, Bonzel T, Kelm M, Lange H, Schächinger V, Terres W and Voelker W (2008) Diagnostische Herzkatheteruntersuchung. *Clinical Research in Cardiology* 97(8):475–512
- [156] Kernan WN, Ovbiagele B, Black HR, Bravata DM, Chimowitz MI, Ezekowitz MD, Fang MC, Fisher M, Furie KL, Heck DV, Johnston SCC, Kasner SE, Kittner SJ, Mitchell PH, Rich MW, Richardson D, Schwamm LH and Wilson JA (2014) Guidelines for the Prevention of Stroke in Patients With Stroke and Transient Ischemic Attack. *Stroke* 45(7):2160–2236
- [157] Hankey GJ (2017) Stroke. *The Lancet* 389(10069):641–654
- [158] van der Worp HB and van Gijn J (2007) Acute Ischemic Stroke. *The New England Journal of Medicine* 357(6):572–579
- [159] Adams HP, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL and Marsh EE (1993) Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke* 24(1):35–41
- [160] Nieswandt B, Kleinschnitz C and Stoll G (2011) Ischaemic stroke: a thrombo-inflammatory disease? *The Journal of Physiology* 589(17):4115–4123
- [161] Luttmann W, Bratke K, Küpper M and Myrtek D (2009) *Der Experimentator: Immunologie*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 4 edition
- [162] Kamat V, Muthard RW, Li R and Diamond SL (2015) Microfluidic assessment of functional culture-derived platelets in human thrombi under flow. *Experimental Hematology* 43(10):891–900.e4
- [163] Cabeza N, Li Z, Schulz C, Kremmer E, Massberg S, Bültmann A and Gawaz M (2004) Surface Expression of Collagen Receptor Fc Receptor- γ /Glycoprotein VI Is Enhanced on Platelets in Type 2 Diabetes and Mediates Release of CD40 Ligand and Activation of Endothelial Cells. *Diabetes* 53(8):2117–2121
- [164] Rodriguez S, Gaunt TR and Day INM (2009) Hardy-Weinberg Equilibrium Testing of Biological Ascertainment for Mendelian Randomization Studies. *American Journal of Epidemiology* 169(4):505–514
- [165] Rodriguez S, Gaunt T and Day I Hardy-Weinberg equilibrium calculator including analysis for ascertainment bias, <http://www.oege.org/software/hardy-weinberg.html> (Date Accssed: 25.10.2017)

- [166] Jones CI, Garner SF, Angenent W, Bernard A, Berzuini C, Burns P, Farndale RW, Hogwood J, Rankin A, Stephens JC, Tom BD, Walton J, Dudbridge F, Ouwehand WH and Goodall AH (2007) Mapping the platelet profile for functional genomic studies and demonstration of the effect size of the GP6 locus. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 5(8):1756–1765
- [167] Jones CI, Bray S, Garner SF, Stephens J, de Bono B, Angenent WGJ, Bentley D, Burns P, Coffey A, Deloukas P, Earthrowl M, Farndale RW, Hoylaerts MF, Koch K, Rankin A, Rice CM, Rogers J, Samani NJ, Steward M, Walker A, Watkins NA, Akkerman JW, Dudbridge F and Goodall AH (2009) A functional genomics approach reveals novel quantitative trait loci associated with platelet signaling pathways. *Blood* 114(7):1405–1416
- [168] SelfDecode <https://www.selfdecode.com/snp/rs1613662/> (Date Accessed: 31.03.2019)
- [169] GeneSavvy <https://www.genesavvy.com/snp/rs1613662/> (Date Accessed: 31.03.2019)
- [170] Bezemer ID, Bare LA, Doggen CJM, Arellano AR, Tong C, Rowland CM, Catanese J, Young BA, Reitsma PH, Devlin JJ and Rosendaal FR (2008) Gene Variants Associated With Deep Vein Thrombosis. *The Journal of the American Medical Association* 299(11):1306–1314
- [171] Kubisz P, Ivanková J, Škerenová M, Staško J and Hollý P (2012) The prevalence of the platelet glycoprotein VI polymorphisms in patients with sticky platelet syndrome and ischemic stroke. *Hematology* 17(6):355–362
- [172] Slatkin M (2008) Linkage disequilibrium — understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nature Reviews Genetics* 9(6):477–485
- [173] The International HapMap Consortium (2005) A haplotype map of the human genome. *Nature* 437(7063):1299–1320
- [174] Takeuchi F, Yanai K, Morii T, Ishinaga Y, Taniguchi-Yanai K, Nagano S and Kato N (2005) Linkage Disequilibrium Grouping of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) Reflecting Haplotype Phylogeny for Efficient Selection of Tag SNPs. *Genetics* 170(1):291–304
- [175] Fuster V and Kelly B (2010) Promoting Cardiovascular Health in the Developing World: A Critical Challenge to Achieve Global Health. National Academy of Sciences, Washington, D.C.
- [176] Vélez P, Ocaranza-Sánchez R, López-Otero D, Grigorian-Shamagian L, Rosa I, Guitián E, García-Acuña JM, González-Juanatey JR and García Á (2016) Alteration of platelet GPVI signaling in ST-elevation myocardial infarction patients demonstrated by a combination of proteomic, biochemical, and functional approaches. *Scientific Reports* 6(39603):1–12

- [177] Marenberg ME, Risch N, Berkman LF, Floderus B and de Faire U (1994) Genetic Susceptibility to Death from Coronary Heart Disease in a Study of Twins. *New England Journal of Medicine* 330(15):1041–1046
- [178] Arthur JF, Dunkley S and Andrews RK (2007) Platelet glycoprotein VI-related clinical defects. *British Journal of Haematology* 139(3):363–372
- [179] Massberg S, Konrad I, Bültmann A, Schulz C, Münch G, Peluso M, Lorenz M, Schneider S, Besta F, Müller I, Hu B, Langer H, Kremmer E, Rudelius M, Heinzmann U, Ungerer M and Gawaz M (2004) Soluble glycoprotein VI dimer inhibits platelet adhesion and aggregation to the injured vessel wall in vivo. *The FASEB Journal* 18(2):1–18
- [180] Ungerer M, Rosport K, Bültmann A, Piechatzek R, Uhland K, Schlieper P, Gawaz M and Münch G (2011) Novel Antiplatelet Drug Revacept (Dimeric Glycoprotein VI-Fc) Specifically and Efficiently Inhibited Collagen-Induced Platelet Aggregation Without Affecting General Hemostasis in Humans. *Circulation* 123(17):1891–1899
- [181] Degen H, Borst O, Ziegler M, Mojica Munoz AK, Jamasbi J, Walker B, Göbel S, Fassbender J, Adler K, Brandl R, Münch G, Lorenz R, Siess W, Gawaz M and Ungerer M (2017) ADPase CD39 Fused to Glycoprotein VI-Fc Boosts Local Antithrombotic Effects at Vascular Lesions. *Journal of the American Heart Association* 6(8):e005991
- [182] Ungerer M, Li Z, Baumgartner C, Goebel S, Vogelmann J, Holthoff HP, Gawaz M and Münch G (2013) The GPVI – Fc Fusion Protein Revacept Reduces Thrombus Formation and Improves Vascular Dysfunction in Atherosclerosis without Any Impact on Bleeding Times. *PLOS ONE* 8(8):e71193
- [183] Goebel S, Li Z, Vogelmann J, Holthoff HP, Degen H, Hermann DM, Gawaz M, Ungerer M and Münch G (2013) The GPVI-Fc Fusion Protein Revacept Improves Cerebral Infarct Volume and Functional Outcome in Stroke. *PLOS ONE* 8(7):e66960
- [184] Mojica Muñoz AK, Jamasbi J, Uhland K, Degen H, Münch G, Ungerer M, Brandl R, Megens R, Weber C, Lorenz R and Siess W (2017) Recombinant GPVI-Fc added to single or dual antiplatelet therapy in vitro prevents plaque-induced platelet thrombus formation. *Thrombosis and Haemostasis* 117(8):1651–1659
- [185] Matsumoto Y, Takizawa H, Gong X, Le S, Lockyer S, Okuyama K, Tanaka M, Yoshitake M, Tandon NN and Kambayashi J (2007) Highly potent anti-human GPVI monoclonal antibodies derived from GPVI knockout mouse immunization. *Thrombosis Research* 119(3):319–329

- [186] Wufuer Y, Shan X, Sailike M, Adilaimu K, Ma S and Wang H (2017) GPVI-Fc-PEG improves cerebral infarct volume and cerebral thrombosis in mouse model with cerebral thrombosis. *Molecular Medicine Reports* 16(5):7561–7568
- [187] Reimann A, Li Z, Goebel S, Fassbender J, Holthoff HP, Gawaz M, Münch G and Ungerer M (2016) Combined administration of the GPVI-Fc fusion protein Revacept with low-dose thrombolysis in the treatment of stroke. *Heart International* 11(1):e10–e16
- [188] Li H, Lockyer S, Concepcion A, Gong X, Takizawa H, Guertin M, Matsumoto Y, Kambayashi J, Tandon NN and Liu Y (2007) The Fab Fragment of a Novel Anti-GPVI Monoclonal Antibody, OM4, Reduces In Vivo Thrombosis Without Bleeding Risk in Rats. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27(5):1199–1205
- [189] Matsumoto Y, Takizawa H, Nakama K, Gong X, Yamada Y, Tandon NN and Kambayashi J (2006) Ex vivo evaluation of anti-GPVI antibody in Cynomolgus monkeys: Dissociation between anti-platelet aggregatory effect and bleeding time. *Thrombosis and Haemostasis* 96(8):167–175
- [190] Ohlmann P, Hechler B, Ravant C, Loyau S, Herrenschmidt N, Wanert F, Jandrot-Perrus M and Gachet C (2008) Ex vivo inhibition of thrombus formation by an anti-glycoprotein VI Fab fragment in non-human primates without modification of glycoprotein VI expression. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 6(6):1003–1011
- [191] Andrews RK, Arthur JF and Gardiner EE (2014) Targeting GPVI as a novel antithrombotic strategy. *Journal of Blood Medicine* 5:59–68
- [192] Grüner S, Prostedna M, Koch M, Miura Y, Schulte V, Jung SM, Moroi M and Nieswandt B (2005) Relative antithrombotic effect of soluble GPVI dimer compared with anti-GPVI antibodies in mice. *Blood* 105(4):1492–1499
- [193] Nieswandt B, Schulte V, Bergmeier W, Mokhtari-Nejad R, Rackebrandt K, Cazenave JP, Ohlmann P, Gachet C and Zirngibl H (2001) Long-Term Antithrombotic Protection by in Vivo Depletion of Platelet Glycoprotein VI in Mice. *Journal of Experimental Medicine* 193(4):459–470
- [194] Boylan B, Berndt MC, Kahn ML and Newman PJ (2006) Activation-independent, antibody-mediated removal of GPVI from circulating human platelets: development of a novel NOD / SCID mouse model to evaluate the in vivo effectiveness of anti – human platelet agents. *Blood* 108(3):908–914
- [195] Intracoronary Stenting and Antithrombotic Regimen: Lesion Platelet Adhesion as Selective Target of Endovenous Revacept (ISAR-PLASTER), NCT03312855 Studie, (2018)

- [196] Revacept in Symptomatic Carotid Stenosis (Revacept/CS/02), NCT01645306 Studie, (2018)
- [197] Kato K, Kanaji T, Russell S, Kunicki TJ, Furihata K, Kanaji S, Marchese P, Reininger A, Ruggeri ZM and Ware J (2003) The contribution of glycoprotein VI to stable platelet adhesion and thrombus formation illustrated by targeted gene deletion. *Blood* 102(5):1701–1707
- [198] Aziz M, Madan R and Bansal A (2018) Hereditary Diffuse Gastric Cancer: More than What Meets the Endoscopic Eye. *Kansas Journal of Medicine* 11(4):120–121
- [199] Seevaratnam R, Coburn N, Cardoso R, Dixon M, Bocicariu A and Helyer L (2012) A systematic review of the indications for genetic testing and prophylactic gastrectomy among patients with hereditary diffuse gastric cancer. *Gastric Cancer* 15(S1):153–163
- [200] De Stefano V, Rossi E, Paciaroni K and Leone G (2002) Screening for inherited thrombophilia: indications and therapeutic implications. *Haematologica* 87(10):1095–1108
- [201] Linton M, Garber JE and Tung N (2017) Managing hereditary breast cancer risk in women with and without ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* 146(1):205–214

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde an der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen, Abteilung Innere Medizin III mit Schwerpunkt „Kardiologie und Kreislauferkrankungen“, bei Herrn Professor Dr. Tobias Geisler angefertigt. Betreut wurde diese Arbeit von Herr Dr. Michal Droppa.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Herrn Professor Dr. Tobias Geisler.

Im Folgenden liste ich die Schritte zur Anfertigung dieser Arbeit und die an diesen Schritten Mitwirkenden auf:

- Die Blutproben wurden durch die Mitarbeiter des Herz-Katheter-Labors während der Koronarangiographie entnommen.
- Die Aufbereitung der Blutproben, sowie die durchflusszytometrische Analyse (FACS) und die Dokumentation der Daten wurden im Forschungslabor der Inneren Medizin III durchgeführt. Die Durchführung erfolgte fortlaufend im Schichtbetrieb von mir oder wenn zeitlich nicht anders möglich dem Forschungslaborteam. Die Einarbeitung erfolgte durch Frau Lydia Laptev, der wissenschaftlichen Labormitarbeiterin.
- Die genetische Analyse der Blutproben erfolgte extern im Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für klinische Pharmakologie in Stuttgart.
- Die Nachverfolgung der Patienten zur Langzeitdatenerhebung und die damit verbundene Datenpflege erfolgte weitestgehend durch mich. Bei den übrigen Patienten erhielt ich Unterstützung von den Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Tobias Geisler.
- Ich fertigte nach Anleitung durch und in Rücksprache mit Herrn Dr. Michal Droppa, meinem direkten Betreuer und Ansprechpartner, die statistische Auswertung an.
- Die ausgewerteten Daten wurden ausschließlich durch mich analysiert, interpretiert und bewertet.

- Die Einordnung der interpretierten Ergebnisse in den derzeitigen wissenschaftlichen Forschungsstand erfolgte ausschließlich durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 10. Dezember 2020

Katharina Schäfer

Danksagung

Am Ende dieser Arbeit möchte ich mich bei den Menschen bedanken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Herr Professor Dr. med. Tobias Geisler, vielen Dank für die gute Zeit in Ihrer Gruppe. Insbesondere möchte ich mich bei Ihnen für Ihr Vertrauen bedanken, dass ich diese Forschung mit so vielen Freiheiten und Selbstbestimmtheit angehen konnte. Sie inspirierten und begeisterten mich für die Wissenschaft. Dieses geweckte Interesse an der Forschung empfinde ich als wertvolle Bereicherung und freue mich, es auch in Zukunft weiter zu leben.

Frau Professor Dr. med. Karin Klingel, vielen Dank, dass Sie so kurzfristig und interessiert die Aufgaben der zweiten Berichterstatterin übernommen haben. Vielen Dank für Ihr Engagement und Ihre wertvollen Anmerkungen.

Liebe Patientinnen und Patienten, Ihnen gilt mein ganz besonderer Dank. Ohne Sie wäre diese Arbeit unmöglich gewesen. Vielen Dank für Ihre Bereitschaft, trotz des Ihnen widerfahrenen Leids, einen Beitrag zur Forschung zu leisten, auf dass dieses Leid in Zukunft besser gelindert oder ganz vermieden werden kann. Dafür zolle ich Ihnen großen Respekt und empfinde ich tiefe Dankbarkeit.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Lieber Herr Dr. med. Michal Droppa, herzlichen Dank, dass Du mein Betreuer warst und mich all die Jahre bei diesem Unterfangen begleitet und unterstützt hast. Ich empfand die Diskussionen mit Dir als sehr hilfreich und wertvoll. Zudem möchte ich mich bei Dir für Deinen Beistand bei der Ausarbeitung dieser Arbeit und Deine herzliche Art bedanken. Es hat mir großen Spaß gemacht mit Dir zu arbeiten.

Liebe Lydia Laptev, vielen Dank, dass Du mich so sehr im Labor unterstützt hast und immer für meine Fragen ansprechbar warst. Ich habe viel von Dir gelernt. Unsere gemeinsame Zeit im Labor und auch darüber hinaus habe ich sehr genossen und es war richtig schön mit Dir. Ich werde Dich in meinem Herzen behalten. Wortspiel beabsichtigt :-)

Liebe Sabrina Voesch, ich freue mich sehr, dass wir uns im Labor kennen gelernt haben, vor vielen Jahren beste Freundinnen geworden und es bis heute geblieben sind. Vielen Dank, dass Du mich immer unterstützt hast und immer an mich glaubst. Im Rahmen dieser Arbeit möchte ich mich herzlich bei Dir für unsere vielen Diskussionen und unseren regen Gedankenaustausch bedanken. Es bedeutet mir viel.

Liebes Team der AG-Geisler, an alle früheren und aktuellen Kolleginnen und Kollegen, vielen Dank für Eure Zusammenarbeit und Euer Engagement. Es war mir eine Freude mit Euch zusammenzuarbeiten und Teil Eures Teams gewesen zu sein.

Liebe Eltern und lieber Daniel, vielen Dank, dass Ihr mich auf meinem bisherigen Weg immer begleitet und unterstützt habt. Ich konnte mich immer auf Euch verlassen.

Lieber Wolfgang, Dir gilt mein ganz besonderer Dank, da Du mich liebevoll in meiner bisherigen medizinischen Laufbahn und der wissenschaftlichen Arbeit unterstützt und begleitet hast. Du warst und bist immer für mich da, warst geduldiger Zuhörer, interessierter Fragesteller und hast immer an mich geglaubt. Herzlichen Dank für alles.

