

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

**Glykoprotein VI als neuer prädiktiver Biomarker
für das akute Koronarsyndrom**

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

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

**vorgelegt von
Moritz Alexius Geiger**

**aus
Karlsruhe**

2009

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. A. May

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Aebert

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	- 1 -
1.1	Thrombozyten	- 1 -
1.1.1	Thrombozyten und Hämostase	- 1 -
1.1.2	Glykoproteine der Thrombozytenmembran.....	- 3 -
1.1.3	Thrombozytäre Kollagenrezeptoren	- 4 -
1.1.4	Das Glykoprotein VI (GPVI).....	- 5 -
1.2	Thrombozyten und koronare Herzerkrankung	- 6 -
1.2.1	Atherosklerose.....	- 6 -
1.2.2	Die koronare Herzerkrankung	- 7 -
1.2.3	Koronare Herzerkrankung und Biomarker.....	- 8 -
1.2.4	Interventionelle Therapie	- 10 -
2	Fragestellung und Zielsetzung	- 12 -
3	Material und Methoden	- 13 -
3.1	Material	- 13 -
3.1.1	Chemikalien und Geräte	- 13 -
3.1.2	Patienten.....	- 14 -
3.1.3	Definitionen.....	- 14 -
3.1.4	Kontrollgruppe	- 15 -
3.2	Methoden	- 15 -
3.2.1	Durchflusszytometrie	- 15 -
3.2.2	Färbung für die Durchflusszytometrie.....	- 17 -
3.2.3	Messung mittels Durchflusszytometrie	- 18 -
3.2.4	Statistische Auswertung	- 19 -
4	Ergebnisse	- 20 -
4.1	Patientendaten	- 20 -
4.2	Durchflusszytometrische Messungen	- 20 -
4.2.1	GPVI-Expression der Patienten mit koronarer Herzerkrankung	- 20 -
4.2.2	CD62P-Expression der Patienten mit koronarer Herzerkrankung	- 25 -
4.2.3	GPVI-Expression der herzgesunden Kontrollgruppe	- 25 -
4.3	Ergebnisse statistischer Auswertungen	- 26 -

4.3.1	Korrelation von GPVI mit Troponin I und Kreatinkinase (CK)	- 26 -
4.3.2	Multifaktorielle Kovarianzanalyse	- 27 -
4.3.3	Berechnung einer ROC-Kurve.....	- 27 -
4.3.4	Logistische Regressionsanalyse	- 29 -
5	Diskussion	- 31 -
5.1	Bedeutung von GPVI-Expression und GPVI-Morphologie	- 31 -
5.2	Die Rolle des GPVI bei der Thrombusbildung.....	- 32 -
5.3	Diskussion der Methoden.....	- 33 -
5.4	Diskussion der Ergebnisse	- 34 -
6	Zusammenfassung.....	- 36 -
7	Literaturverzeichnis	- 37 -
8	Danksagung.....	- 42 -
9	Lebenslauf	- 43 -

1 Einleitung

1.1 Thrombozyten

Thrombozyten werden im Knochenmark aus Megakaryozyten gebildet. Sie sind die kleinsten korpuskulären Bestandteile des zirkulierenden Blutes. Blutplättchen besitzen keinen Zellkern und sind nur in geringem Maße zur Neusynthese von Proteinen fähig. Sie sind deshalb keine Zellen im eigentlichen Sinne und werden auch als „anukleäre Zellen“ bezeichnet.

Thrombozyten spielen eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der koronaren Herzkrankung (KHK). Aktivierte Blutplättchen beeinflussen die chemotaktischen und adhäsiven Eigenschaften von Endothelzellen, was zu Monozyteneinwanderung, Schaumzellbildung und Intimaproliferation führt. So tragen sie entscheidend zu atherosklerotischen Veränderungen der Gefäßwände bei (1).

1.1.1 Thrombozyten und Hämostase

Eine Gefäßwandläsion ist der Auslöser der Hämostase. Man unterscheidet zwischen primärer und sekundärer Hämostase. Zunächst wird bei der primären Hämostase ein blutplättchenreicher Thrombus gebildet. Dieser wird in der sekundären Hämostase durch Fibrin stabilisiert (2).

Die primäre Hämostase kann in drei Abschnitte unterteilt werden: Die Adhäsion, die Aktivierung und die Aggregation.

Der erste Schritt ist die Adhäsion ruhender Thrombozyten an Strukturen im Bereich der Gefäßwandverletzung. Der Adhäsionsvorgang wird durch

Glykoproteine der Thrombozytenmembran gesteuert. Das Glykoprotein Ib-V-IX vermittelt durch Interaktion mit kollagenimmobilisiertem von-Willebrand-Faktor den ersten Kontakt mit der Zellwandläsion (Kontaktphase) (3). Die Stabilisierung der Thrombozytenadhäsion erfolgt durch weitere membranständige Adhäsionsrezeptoren (Phase der Stabilisierung).

Die Interaktion der thrombozytären Kollagenrezeptoren mit Kollagen führt zur Aktivierung und Formveränderung („shape change“) der adhärenen Thrombozyten (Abb.1); dabei kommt es zur Bildung von Pseudopodien, die zur Abdichtung des verletzten Gefäßes beitragen (4, 5).

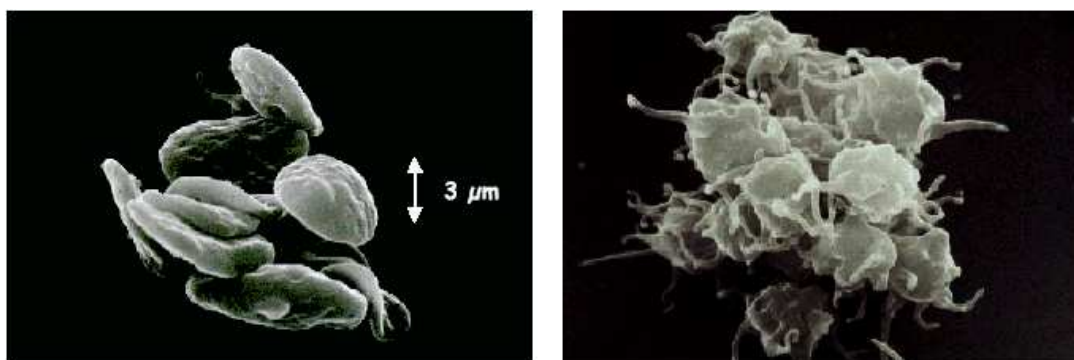


Abb.1 Ruhende (links) und aktivierte Thrombozyten (aus 6)

Die aktivierten Thrombozyten setzen Granulainhaltsstoffe frei, die weitere Thrombozyten zur Aggregation anregen. In der ersten Phase der Aggregation werden die Thrombozyten reversibel über Fibrinogenbrücken miteinander verbunden (primäre Aggregation). Die sekundäre Aggregation führt zur Degranulation der Thrombozyten und zur Verfestigung der Fibrinogenbindung. Diese Phase ist irreversibel. Eine entscheidende Rolle spielt das thrombozytäre Glykoprotein IIb-IIIa, das erst nach Aktivierung der Thrombozyten an Fibrinogen binden kann und so die Aggregation ermöglicht. Die Bindung von Fibrinogen an GPIIb-IIIa kann nur in Anwesenheit von Ca^{2+} erfolgen (6).

1.1.2 Glykoproteine der Thrombozytenmembran

Thrombozyten verfügen über membranständige Glykoproteine. Diese vermitteln die Interaktion der Blutplättchen untereinander (z. B. GPIIb-IIIa), mit der subendothelialen Matrix (z. B. von-Willebrand-Faktor-Rezeptor, Kollagenrezeptor), plasmatischen Gerinnungsfaktoren (z. B. von-Willebrand-Faktor-Rezeptor), Endothelzellen (z. B. GPIIb-IIIa) und Leukozyten (z. B. P-Selektin).

Die thrombozytären Membranglykoproteine werden gemäß ihrer charakteristischen Molekülstruktur in verschiedene Gruppen unterteilt: Integrine, leuzinreiche Glykoproteine, Selektine, immunglobulinähnliche Rezeptoren und lysosomale integrale Membranproteine (8).

Integrine sind Adhäsionsrezeptoren, die mit zahlreichen Glykoproteinen der extrazellulären Matrix (z. B. Kollagen, Fibronectin, Fibrinogen, Laminin, Thrombospondin, Vitronectin, von-Willebrand-Faktor) interagieren (9).

Auf der Thrombozytenoberfläche finden sich zwei durch ihren Leuzinreichtum charakterisierte Rezeptoren, das GPIb-V-IX und das GPIV. Der GPIb-V-IX-Komplex spielt als Rezeptor für von-Willebrand-Faktor eine wichtige Rolle in der Kontaktphase der Adhäsion (10).

Selektine sind vaskuläre Adhäsionsrezeptoren, welche die heterotypischen Interaktionen von Zellen vermitteln. P-Selektin findet sich in den α -Granula ruhender Thrombozyten. Aktivierung führt zur Freisetzung und Oberflächenexpression. Deshalb kann P-Selektin als Marker für die Thrombozytenaktivierung verwendet werden (11).

Zu den immunglobulinähnlichen Rezeptoren zählen ICAM-2, PCAM-1 und das Glykoprotein VI (siehe 1.1.4).

Tabelle 1-1 zeigt eine Übersicht über die Glykoproteine der Thrombozytenoberfläche.

Tabelle 1-1 Thrombozytäre Membranglykoproteine		
<i>(modifiziert nach 6)</i>		
Klassifizierung	Elektrophoretische Klassifizierung	CD-Nomenklatur
Integrine		
$\alpha_2\beta_1$	GPIa-IIa	CD49b
$\alpha_5\beta_1$	GPIc-IIa	CD49c
$\alpha_6\beta_1$	GPIc'-IIa	CD49f
$\alpha_{IIb}\beta_3$	GPIIb-IIIa	CD41-CD61
$\alpha_v\beta_3$	GPav-IIIa	CD51-CD61
Leuzinreiche Glykoproteine		
–	GPIb-V-IX	CD42a-b-c
–	GPIV (GPIIIb)	CD36
Selektine		
–	P-Selektin	CD62P
Immunglobulinähnliche Rezeptoren		
–	ICAM-2	CD102
–	PCAM-1	CD31
–	GPVI	
Lysosomale integrale Membranproteine		
–	GP53	CD63

1.1.3 Thrombozytäre Kollagenrezeptoren

Der erste Schritt der Hämostase ist die Interaktion der Thrombozyten mit extrazellulärer Matrix (ECM) im Bereich der Gefäßverletzung. Dabei spielt unter den makromolekularen Bestandteilen der ECM das Kollagen eine besonders wichtige Rolle.

Die zwei bedeutsamsten thrombozytären Rezeptoren für Kollagen sind das Integrin $\alpha_2\beta_1$ (GPIa-IIa) und das GPVI (12, 13). Weder GPIa-IIa noch GPVI binden unter den hohen Scherkräften, die bei schnellen Strömungsbedingungen herrschen. Voraussetzung für deren Aktivierung ist die Bindung des GPIIb-V-IX an kollagenimmobilisierten von-Willebrand-Faktor, die sehr instabil ist und so das Rollen der Thrombozyten über das Endothel bewirkt. Dadurch wird das GPIa-IIa aktiviert, das die Bindung an Kollagen festigt (14). Das GPVI spielt eine bedeutende Rolle für Aktivierung, Formveränderung, Aggregation und Sekretion der Thrombozyten (13).

1.1.4 Das Glykoprotein VI (GPVI)

GPVI ist ein thrombozytärer Oberflächenrezeptor für Kollagen. Es wurde 1982 durch 2-D-Gel-Elektrophorese erstmals identifiziert (15). GPVI ist ein Glykoprotein aus 339 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 60-65 kDa. Eine signifikante Menge an für GPVI kodierender RNA findet sich nur in Megakaryozyten und Thrombozyten. GPVI zählt zur Familie der immunoglobulinähnlichen Rezeptoren und bildet in der Thrombozytenmembran einen Komplex mit einer FcR γ -Untereinheit (16) (Abb.2).

Es wurde gezeigt, dass bei GPVI-negativen Thrombozyten keine kollageninduzierte Plättchenaktivierung durch physiologische Kollagenkonzentrationen ausgelöst werden kann (17, 18). Außerdem wurde bei Patienten mit GPVI-Mangel festgestellt, dass sie eine geringgradig verzögerte Blutungszeit aufweisen (19, 20). Diese Erkenntnisse sprechen dafür, dass GPVI ein für die Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten notwendiger Kollagenrezeptor ist. Die direkte GPVI-Kollagen-Interaktion ist entscheidend für die erste Plättchenbindung (platelet tethering) und ermöglicht die Adhäsion und Aggregation am geschädigten Endothel (21).

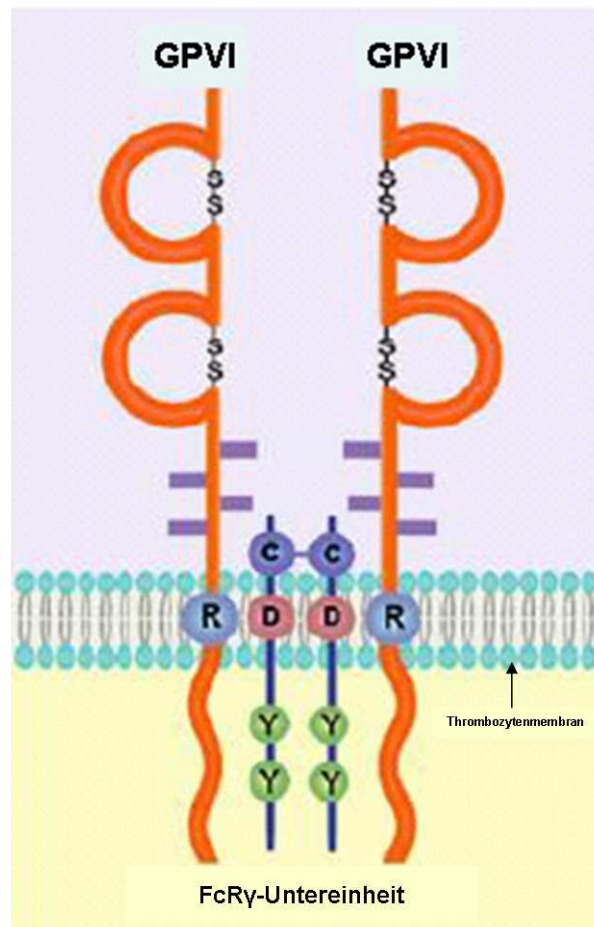


Abb.2 Aufbau des Komplexes aus Glykoprotein VI und FcRγ-Untereinheit (modifiziert nach 22)

1.2 Thrombozyten und koronare Herzerkrankung

1.2.1 Atherosklerose

Aktivierte Thrombozyten setzen Zytokine und Wachstumsfaktoren frei. Diese induzieren im Endothel die Sekretion chemotaktischer Substanzen wie MCP-1 und die Oberflächenexpression von ICAM-1, einem Rezeptor für die Monozytenadhäsion. Die am Endothel adhätierenden Monozyten wandern in

das Gewebe ein (Transmigration) und differenzieren zu Makrophagen. Die Makrophagen phagozytieren lipidreiches Material und werden so zu Schaumzellen. Schließlich kommt es zur Intimaproliferation (Verdickung der Intima durch erhöhte Dichte an glatten Muskelzellen und extrazellulären Fibrillen) und zur Bildung des Atheroms (7).

Thrombozyten spielen insofern eine Rolle bei der Entstehung von Atherosklerose, als sie in Gefäßwandzellen inflammatorische Veränderungen hervorrufen können, die zu Monozyteneinwanderung, Schaumzellbildung und Intimaproliferation führen.

1.2.2 Die koronare Herzerkrankung

Die koronare Herzerkrankung (KHK) ist die häufigste Todesursache in der westlichen Welt. Die Hälfte der Todesfälle durch koronare Herzerkrankungen kommt plötzlich und unerwartet. Die Inzidenz der plötzlichen Herztode steigt mit dem Lebensalter. Jüngere Menschen sind jedoch proportional häufiger vom plötzlichen Herztod betroffen.

Der KHK liegen atherosklerotische Veränderungen der Herzkranzgefäße zugrunde. Es wird unterschieden zwischen stabiler Angina pectoris (SAP) und akutem Koronarsyndrom (ACS).

Bei der stabilen Angina pectoris handelt es sich um eine verringerte Sauerstoffversorgung des myokardialen Gewebes unter Belastung, hervorgerufen durch erhöhten Sauerstoffbedarf des Herzmuskels bei stabiler atherosklerotischer Einengung eines oder mehrerer Herzkranzgefäße (23). Klinisch zeigt sich bei der stabilen Angina pectoris ein ausstrahlender Thoraxschmerz, der reproduzierbar auslösbar ab einem bestimmten Grad der Belastung auftritt und über Monate konstant bleibt.

Dem akuten Koronarsyndrom liegt pathophysiologisch in der Regel eine akute Plaqueruptur mit nachfolgender Thrombozytenaggregation und

Thrombusbildung zugrunde. Abhängig von Schweregrad und Dauer der durch Plaqueruptur und Thrombusbildung entstandenen Gefäßverengung wird unterschieden zwischen instabiler Angina pectoris und akutem Myokardinfarkt. Die Thrombozyten sind neben der Bildung des thrombotischen Gefäßverschlusses an weiteren Mechanismen beteiligt, die zur Ausbildung eines akuten Koronarsyndroms führen. Zu diesen zählen Mikroembolisation, Vasokonstriktion, Plaqueprogression und systemische Entzündungsreaktionen (23). Das akute Koronarsyndrom manifestiert sich klinisch üblicherweise als in Ruhe oder bei leichter körperlicher Belastung auftretender, zunehmender thorakaler Schmerz.

1.2.3 Koronare Herzerkrankung und Biomarker

Neben den klinischen Symptomen dienen laborchemische Marker zur Sicherung der Diagnose. Einer koronaren Herzerkrankung liegen verschiedene pathophysiologische Vorgänge zugrunde. Zu diesen zählen Gefäßverletzung, Thrombusbildung, Aktivierung inflammatorischer Zellen und myokardiale Ischämie. Zur Erkennung koronarer Herzerkrankungen können demzufolge Marker für Gefäßverletzungen, Thrombusbildung, Inflammation und Ischämie dienlich sein. Derzeit spielen unter diesen die Myokardnekrosemarker die wichtigste Rolle.

Troponin ist ein hochspezifischer Indikator myokardialer Ischämie, da es sich nur in Myozyten findet und bei ischämischen Verhältnissen in die Blutbahn freigesetzt wird. Etwa zwei Stunden nach Beginn der Ischämie ist Troponin im Blut nachweisbar. Ein weiterer Marker, der etwa vier Stunden nach Ischämiebeginn nachweisbar ist, ist die Kreatinkinase (CK), die jedoch weniger spezifisch auf myokardiale Ischämien hindeutet, da sich die CK auch in der Skelettmuskulatur findet. Deshalb wird das Isoenzym Kreatinkinase-MB (CKMB) bestimmt, das ausschließlich im Herzmuskel zu finden ist. Beträgt dessen Anteil an der CK-Gesamtkonzentration mehr als sechs Prozent, kann

von einer Schädigung des Herzmuskels ausgegangen werden. Da diese Marker schon einen abgelaufenen Schaden anzeigen, ist die Suche nach frühen Biomarkern dringend nötig.

Erhöhte Werte bei Biomarkern wie CRP (C-reaktives Protein), Myeloperoxidase, MMP-9 (Matrix Metalloproteinase-9), PAPP-A (Pregnancy Associated Plasma Protein A) und PIGF (Placenta Growth Factor), die auf Entzündungsreaktionen hindeuten, beeinflussen die klinische Entscheidungsfindung derzeit kaum, sind aber Anzeichen für schlechtere klinische Verläufe und deshalb für eine langfristige Behandlungsplanung von Bedeutung (24). Gleiches gilt für eine verminderte Kreatinin-Clearance, die auf eine Gefäßläsion schließen lässt (24). Das Hormon BNP (brain natriuretic peptide) wird von den Herzkammern freigesetzt, wenn am Herzen eine Druck- oder Volumenbelastung auftritt. BNP ist folglich ein Indikator für eine dekompensierte Herzinsuffizienz, ist aber auch bei koronaren Herzerkrankungen von Bedeutung. Bei der KHK sind erhöhte BNP-Werte assoziiert mit einem mittelfristig schlechteren klinischen Verlauf, höherer Sterblichkeitsrate und rezidivierender koronarer Instabilität (24).

CD40 Ligand (CD40L) wird von aktivierten Thrombozyten und Endothelzellen freigesetzt. Es ist pro-inflammatorisch für Endothelzellen und stimuliert die plasmatische Gerinnung. CD40 Ligand enthält eine Bindungsstelle für das Integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$ und scheint für die Stabilität arterieller Thromben notwendig zu sein. Erhöhte Werte für CD40 Ligand deuten auf koronare Geschehnisse hin und können zu einer Verbesserung der Diagnose beitragen (Abb.3) (25).

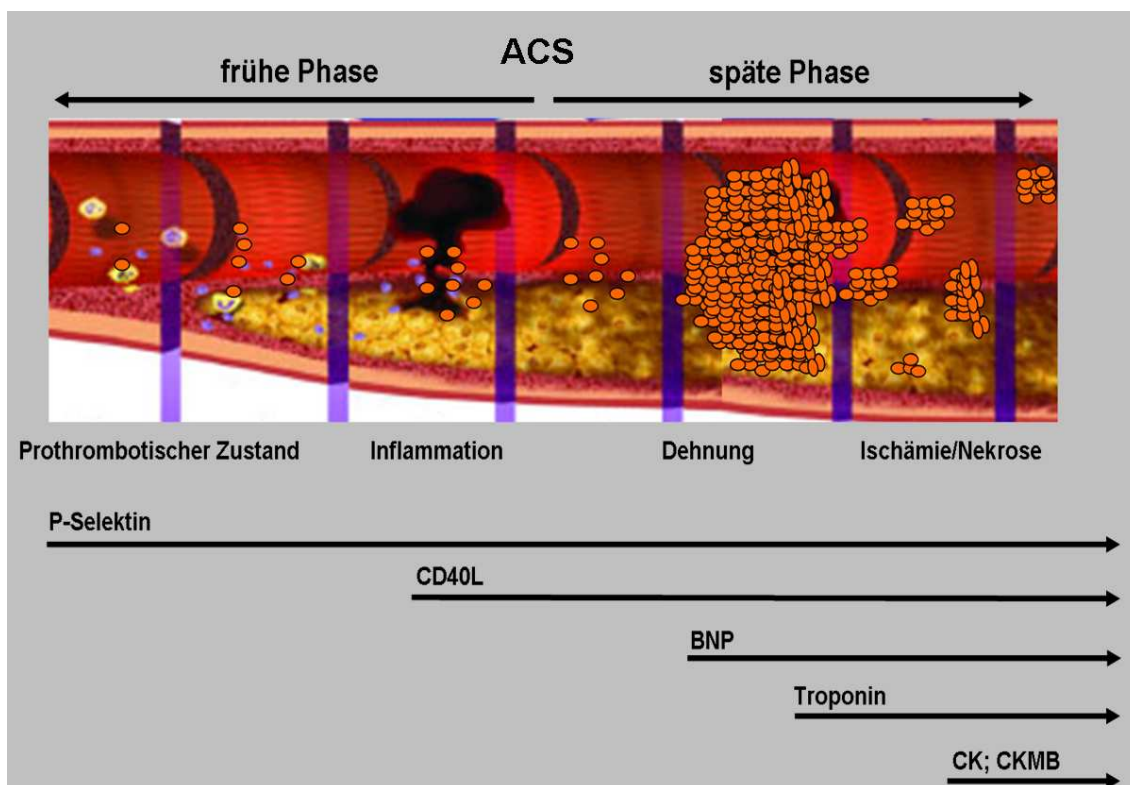


Abb.3 Zeitliches Auftreten verschiedener Biomarker bei einem akuten Koronarsyndrom (ACS)

Biomarker myokardialer Schädigung (Troponin, CK, CKMB) treten relativ spät im Verlauf eines ACS auf. Andere Biomarker wie z. B. BNP, CD40L und P-Selektin können eine frühere Phase der Erkrankung anzeigen.

1.2.4 Interventionelle Therapie

Zur Diagnostik und Therapie der stabilen Angina pectoris und des akuten Koronarsyndroms dient heute vielfach eine Herzkatheteruntersuchung.

Die Koronarangiographie ermöglicht die röntgenologische Darstellung der Herzkranzgefäße mittels Kontrastmittel und erlaubt so eine genaue Beurteilung der morphologischen Verhältnisse der Koronararterien sowie die Lokalisierung von Stenosen und deren Ausmaß.

Verengte Herzkranzgefäße werden bei der PTCA (perkutane transluminale coronare Angioplastie) mittels eines Ballonkatheters aufgedehnt. Um eine erneute Verengung des dilatierten Gefäßes zu verhindern, wird häufig ein Stent implantiert. Diese können unbeschichtet („bare metal“-Stent) oder zur

Verringerung des Restenoserisikos mit Medikamenten beschichtet („drug eluting“-Stent) sein. Um einen thrombotischen Verschluss im Stentbereich zu verhindern, wird meist zusätzlich mit den Thrombozytenaggregationshemmern Clopidogrel und Acetylsalicylsäure (ASS) behandelt.

2 Fragestellung und Zielsetzung

Heute werden zur labortechnischen Diagnostik koronarer Herzerkrankungen die Parameter Troponin, Kreatinkinase (CK) und Kreatinkinase-MB (CKMB) bestimmt. Erhöhte Werte für diese Marker sind jedoch frühestens zwei Stunden nach Eintritt einer myokardialen Ischämie nachweisbar und sind Beleg dafür, dass es bereits zu Nekrosen im Myokardgewebe gekommen ist. Deshalb wäre es wünschenswert, einen Marker zu finden, der nicht erst dann nachweisbar wird, wenn es schon zum Gewebsuntergang gekommen ist, sondern im günstigsten Falle bereits vor dem Auftreten der myokardialen Ischämie. Das Glykoprotein VI könnte große Bedeutung haben im Bezug auf eine möglichst frühzeitige Diagnostik, die eine rasche Therapie ermöglichen und so die Entstehung von Myokardnekrosen verhindern könnte (Abb.3).

In einer Pilotstudie wurde der Zusammenhang zwischen thrombozytärer GPVI-Expression und der Entwicklung akuter koronarer Ereignisse untersucht (26). Basierend auf dieser Studie wurde in der vorliegenden prospektiven Studie die GPVI-Expression einer großen Patientenpopulation ermittelt. Die Patienten präsentierten sich mit typischen Symptomen koronarer Herzerkrankungen und wurden koronarangiographiert.

Die Untersuchungen sollten Aufschluss darüber geben, ob die Höhe der thrombozytären GPVI-Expression prädiktiv für die Entwicklung akuter koronarer Ereignisse ist und wie das GPVI im Vergleich zu etablierten Markern myokardialer Ischämie zu bewerten ist.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Geräte

Folgende monoklonalen Antikörper, die zur Analyse im Durchflusszytometer mit den fluoreszierenden Substanzen Fluoreszeinisothiocyanat (FITC, grün) oder Phycoerythrin (PE, rot) markiert waren, kamen zum Einsatz:

Der phycoerythrin-konjugierte monoklonale Antikörper anti-CD42b (Klon SZ2, Firma Immunotech, Marseille, Frankreich) reagiert mit dem Glykoprotein Ib-V-IX der Thrombozytenoberfläche und dient der Markierung der Thrombozyten in der Vollblutprobe.

Der fluoreszeinisothiocyanat-konjugierte monoklonale Antikörper anti-CD62P (Klon CLB-Thromb/6, Firma Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland) bindet an das Membranglykoprotein P-Selektin, das nur auf aktivierten Thrombozyten exprimiert wird. Anti-CD62P wird deshalb als Marker für den Aktivierungsgrad der Thrombozyten verwendet.

Der monoklonale Antikörper anti-GPVI (Klon 4c9), der an das Glykoprotein VI der Thrombozytenmembran bindet, war nach etablierten Methoden hergestellt (27, 28) und gemäß Standardprotokoll mit FITC (Firma Sigma, Deisenhofen, Deutschland) markiert.

Außerdem wurde Paraformaldehyd (PFA, Firma Merck, Hohenbrunn, Deutschland) sowie phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS, Firma Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) verwendet.

Die Analysen wurden an einem FACS-Calibur (Firma Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt.

3.1.2 Patienten

1003 Patienten mit symptomatischer koronarer Herzerkrankung wurden konsekutiv in die vorliegende Studie aufgenommen. Alle Patienten wurden einer Koronarangiographie unterzogen. Die Studie wurde mit Zustimmung der Ethik-Kommission durchgeführt.

Nicht in die Studie aufgenommen wurden Patienten unter 18 Jahren und Patienten, die eine Teilnahme ablehnten.

3.1.3 Definitionen

Die **stabile Angina pectoris (SAP)** ist gekennzeichnet durch einen ausstrahlenden Thoraxschmerz, der reproduzierbar auslösbar ab einem bestimmten Grad der Belastung auftritt und über Monate konstant bleibt.

Das **akute Koronarsyndrom (ACS)** manifestiert sich klinisch als in Ruhe oder bei leichter körperlicher Belastung auftretender, zunehmender thorakaler Schmerz. Im EKG zeigt sich mindestens eines der folgenden Phänomene: Eine neu auftretende ST-Streckensenkung von mindestens 0,1 mV oder ein negatives T von mindestens 0,3 mV in zwei oder mehr Ableitungen. Die Troponin- und CK-Werte sind normal oder erhöht.

Der **ST-Strecken-Hebungsinfarkt (STEMI)** offenbart sich als thorakaler Schmerz, der länger als 20 Minuten andauert. Dabei sind folgende EKG- und Laborcharakteristika typisch: ST-Streckenhebung von mindestens 0,1 mV in zwei oder mehr Ableitungen. Im Vergleich zu normalen Werten verdoppelte CK-Werte in Verbindung mit erhöhtem Troponin oder erhöhter CKMB.

Der **Nicht-ST-Strecken-Hebungsinfarkt (NSTEMI)** zeigt sich ebenfalls durch länger als 20 Minuten andauernde thorakale Schmerzen und weist folgende EKG- und Laborcharakteristika auf: Keine signifikante ST-Streckenhebung im EKG. Im Vergleich zu normalen Werten verdoppelte CK-Werte in Verbindung mit erhöhtem Troponin oder erhöhter CKMB.

3.1.4 Kontrollgruppe

Als Kontrollgruppe dienten 40 gesunde Probanden. Diese Personen wurden nicht koronarangiographiert.

Eine weitere Kontrollgruppe bildeten 20 Patienten, die wegen thorakaler Beschwerden eine Herzkatheteruntersuchung erhielten. Bei dieser Untersuchung wurde eine KHK jedoch ausgeschlossen.

3.2 Methoden

3.2.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Differenzierung verschiedener mikroskopisch kleiner Partikel anhand ihrer Größe, ihrer Struktur, ihrer Oberflächeneigenschaften oder ihrer intrazellulären Zusammensetzung (29).

Zu analysierende Zellen werden in einem laminaren Probenstrom einzeln an einem Laser vorbeigeleitet. Der auf die Zellen treffende Lichtstrahl wird gestreut; nach vorne abgelenkte Strahlen sind ein Maß für die Größe der Zellen (Vorwärtsstreulicht oder Forwardscatter, FSC), das in einem 90°-Winkel abgestrahlte Seitwärtsstreulicht (Sidescatter, SSC) dient als Maß für die Zellgranularität. Durch Markierung der Zellen mit fluoreszenzgekoppelten

Antikörpern können neben Größe und Granularität weitere charakteristische Eigenschaften der Zellen bestimmt werden (29).

Um spektrale Überlappungen zwischen verschiedenen Fluorochromen zu vermeiden, muss vor der Messung eine sogenannte Kompensation durchgeführt werden. So wird vermieden, dass das Durchflusszytometer falsch positive Signale registriert (29).

Die eigentliche Messung läuft nach Einstellung der Durchflussrate (abhängig von der Konzentration der Probe) und der Anzahl der zu zählenden Zellen (bzw. Ereignisse) automatisch ab.

Die Messdaten können in eindimensionalen Histogrammen, zwei- oder mehrdimensionalen „Dotplots“ dargestellt werden (Abb.4). Das Histogramm zeigt eine einfache Häufigkeitsverteilung, bei der die Stärke eines Fluoreszenzsignals gegen die Anzahl der Ereignisse aufgetragen wird. Zellpopulationen, die sich in einem Histogramm überlappend darstellen, können oft mit einem zweidimensionalen „Dotplot“ besser dargestellt und unterschieden werden. Mit Hilfe eines „Dotplots“, der die Signale des Fluoreszenzkanals 1 (FL1) den Signalen des Fluoreszenzkanals 2 (FL2) gegenüberstellt, können einfach positiv markierte Zellen (FL1-positiv oder FL2-positiv) von doppelt positiv markierten Zellen (FL1- und FL2-positiv) unterschieden werden (29).

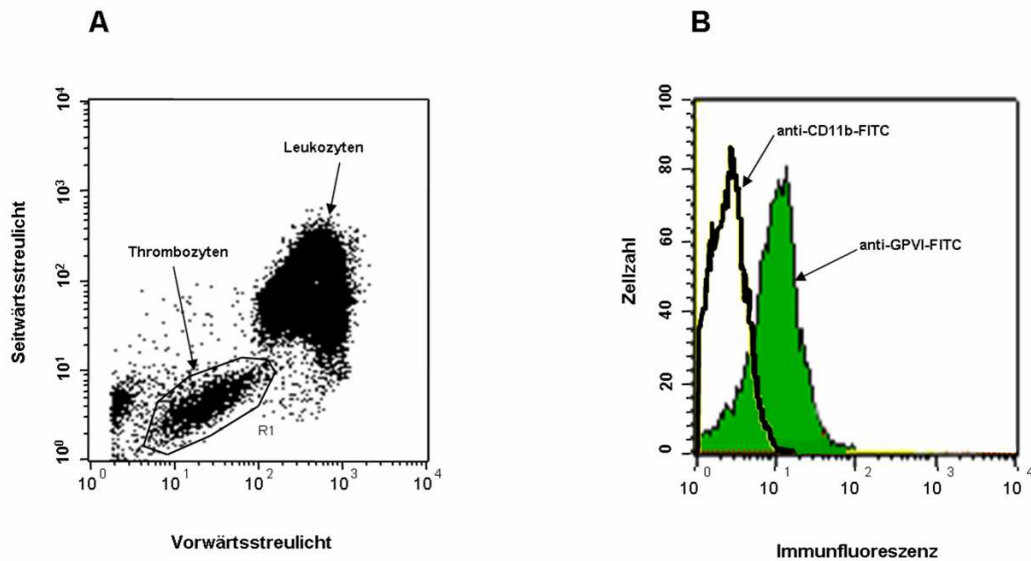


Abb.4 Typisches Beispiel einer Thrombozytenmessung mittels Durchflusszytometrie

A) Beispiel eines „Dotplots“ mit Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht. B) Beispiel eines Histogramms. Die Zellen sind mit dem FITC-konjugierten monoklonalen Antikörper gegen GPVI (thrombozytenspezifisch) und als Kontrolle mit dem FITC-konjugierten monoklonalen Antikörper gegen CD11b (makrophagenspezifisch) gefärbt.

3.2.2 Färbung für die Durchflusszytometrie

Den Patienten wurden unmittelbar vor der Herzkatheteruntersuchung 8,5 ml arteriellen Blutes aus der Arteria femoralis entnommen. Das Blut wurde in einer Monovette mit CPDA (citrate phosphate dextrose adenine) gesammelt.

Sofort nach der Entnahme wurde das Blut mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) verdünnt (im Verhältnis 1:50), um die Aggregation zu minimieren. Anschließend wurden die Thrombozyten mit dem phycoerythrin(PE)-konjugierten, thrombozytenspezifischen monoklonalen Antikörper anti-CD42b markiert. Die Blutproben wurden außerdem mit einem aktivierungsspezifischen Antikörper versetzt. Dazu wurde der fluoreszeinisothiocyanat(FITC)-konjugierte, monoklonale Antikörper anti-GPVI

verwendet. Nach 25-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und Dunkelheit wurde die Reaktion mit Paraformaldehyd (0,5%) abgestoppt.

Der Ansatz wurde zur Kontrolle des Aktivierungsgrades zusätzlich mit anti-CD62P-FITC durchgeführt (Tabelle 3-1).

Tabelle 3-1 Versuchprotokoll
35µl Citratblut (zuvor 1:50 mit PBS verdünnt)
+5µl anti-CD42b-PE
+5µl anti-GPVI-FITC (oder 5µl anti-CD62P-FITC)
+5µl PBS
Inkubation für 25 Minuten (bei Raumtemperatur und Dunkelheit)
Abstoppen mit 300µl Paraformaldehyd (0,5%)

3.2.3 Messung mittels Durchflusszytometrie

Vor der Messung im Durchflusszytometer wurden die Blutproben für höchstens drei Tage bei 4°C aufbewahrt. Die Proben wurden mit Hilfe der „Zweifarb“-Vollblutmethode analysiert (30, 31, 32).

10000 Ereignisse wurden gezählt, Streulicht und Fluoreszenz wurden logarithmiert dargestellt. Die Datenerfassung erfolgte mit Hilfe der Analysesoftware CELLQuest pro (Firma Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland). Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) spiegelte die spezifische Antikörperbindung wider und diente als Gradmesser für die Expression der Rezeptoren.

3.2.4 Statistische Auswertung

Die für statistisch signifikante Aussagen notwendige Probenanzahl wurde nach etablierten Methoden ermittelt (33).

Die bei ACS- und SAP-Patienten gemessenen GPVI-Werte wurden mit einem Kruskal-Wallis-Test verglichen. Korrekturen erfolgten mit einer Bonferroni-Holm-Korrektur. Ein P-Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

Ob Korrelationen zwischen GPVI-Expression und klinischen Parametern wie Kreatinkinase (CK) und Troponin bestehen, wurde mit Hilfe einer Spearman-Korrelation untersucht.

Welche Parameter möglicherweise mit erhöhten GPVI-Werten assoziiert sind, sollte eine multifaktorielle Kovarianzanalyse klären. Dazu wurden die Parameter Prämedikation, kardiovaskuläre Risikofaktoren sowie Laborwerte untersucht.

Um das individuelle ACS-Risiko mit Hilfe des GPVI-Wertes vorherzusagen, wurde mittels einer ROC (receiver operating characteristic)-Kurve ein „Cutoff“-Wert bestimmt. Mit einer logistischen Regressionsanalyse wurde die Vorhersagewahrscheinlichkeit für ACS durch GPVI mit der Vorhersagewahrscheinlichkeit durch etablierte Laborparameter (Kreatinkinase, Kreatinkinase-MB, C-reaktives Protein, Troponin) verglichen.

Die Durchführung der Berechnungen erfolgte mit den Computerprogrammen *Microsoft Excel 2003* (Microsoft, USA) und *SPSS for Windows Version 13.0* (SPSS, USA).

4 Ergebnisse

4.1 Patientendaten

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde konsekutiv die Expression von GPVI bei insgesamt 1003 Patienten untersucht. Alle Patienten zeigten typische Symptome einer koronaren Herzerkrankung. Die Diagnose wurde in allen Fällen durch eine Herzkatheteruntersuchung bestätigt. Dabei zeigte sich bei 518 Patienten eine stabile Angina pectoris, 485 Patienten litten unter akutem Koronarsyndrom. Für jeden Patienten wurde das Geschlecht, das Alter, die kardiovaskulären Risikofaktoren (arterielle Hypertonie, Hyperlipoproteinämie, Diabetes mellitus, positive Familienanamnese und Nikotinabusus), die Schwere der KHK (ein, zwei oder drei betroffene Gefäße), die linksventrikuläre Funktion und die Medikation erfasst (Abb.5).

4.2 Durchflusszytometrische Messungen

4.2.1 GPVI-Expression der Patienten mit koronarer Herzerkrankung

Mittels Durchflusszytometrie wurde die Expression von GPVI auf der Thrombozytenoberfläche gemessen. Dabei zeigte sich bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom (ACS) im Vergleich zu Patienten mit stabiler Angina pectoris (SAP) ein signifikant erhöhter GPVI-Wert.

Patienten mit ACS wiesen eine mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von 19,8 auf, die Standardabweichung (SD) betrug $\pm 5,9$. Patienten mit SAP zeigten eine MFI von 18,7 bei einer SD von $\pm 8,5$. Die Berechnung der Irrtumswahrscheinlichkeit ergab einen P-Wert von 0,01 (Abb.6).

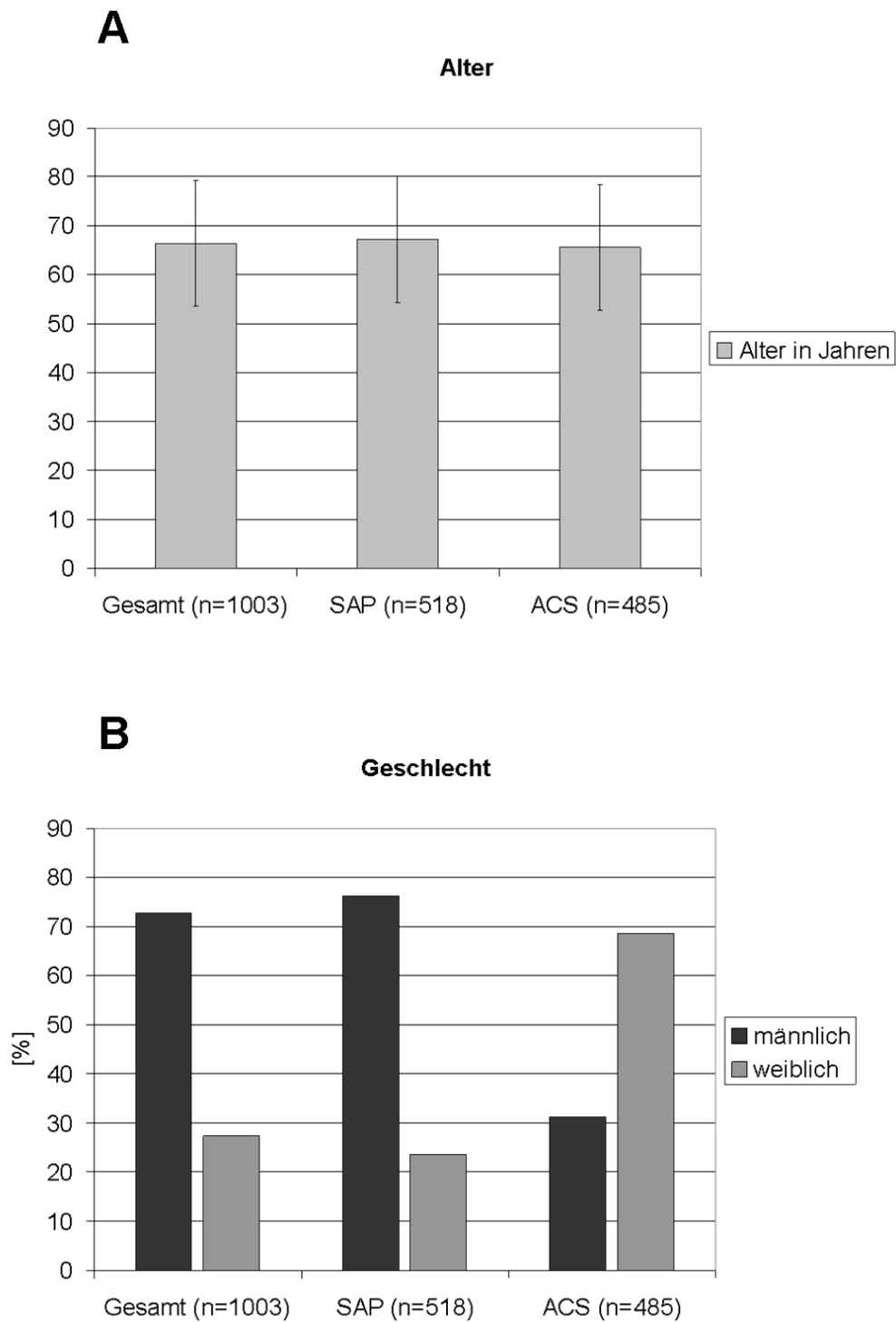


Abb.5 Patientendaten

A) Alter der Patienten. B) Geschlecht der Patienten.

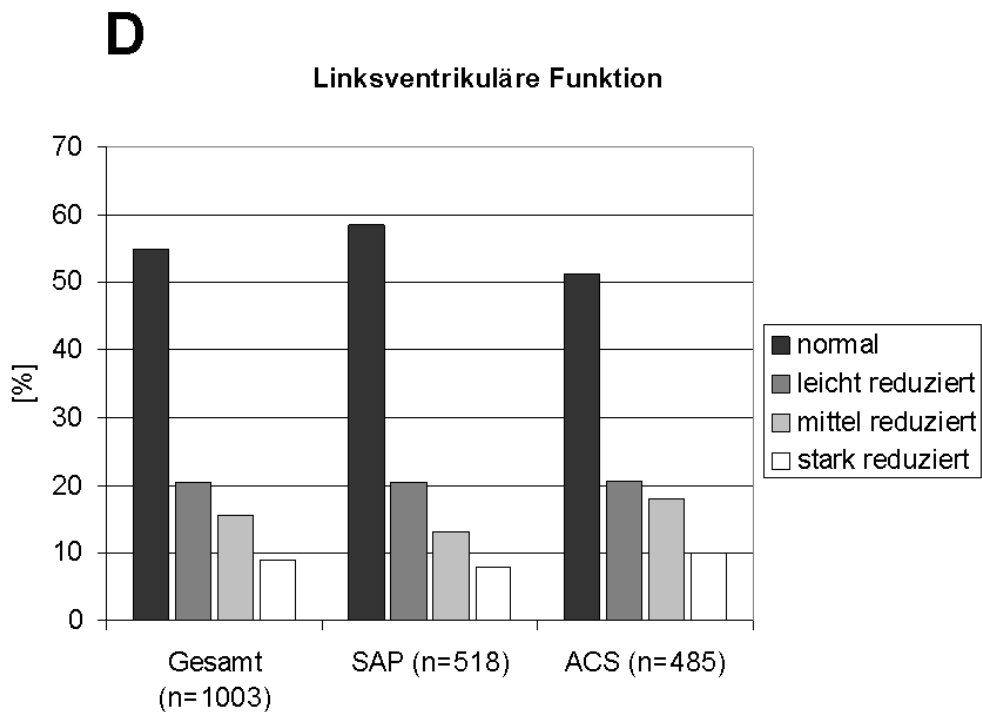
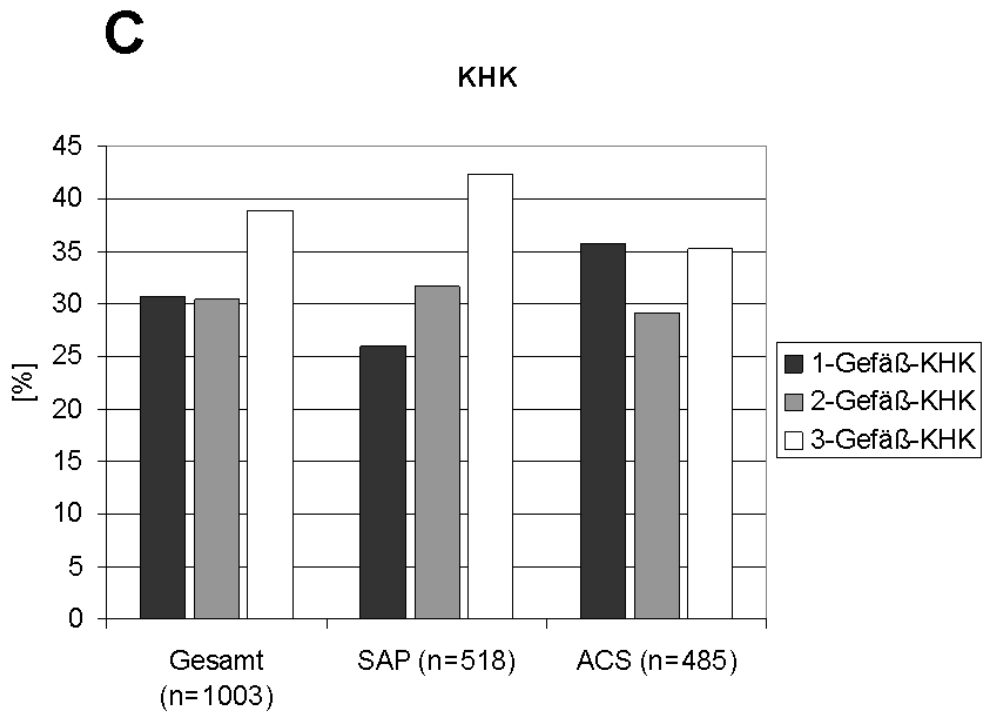
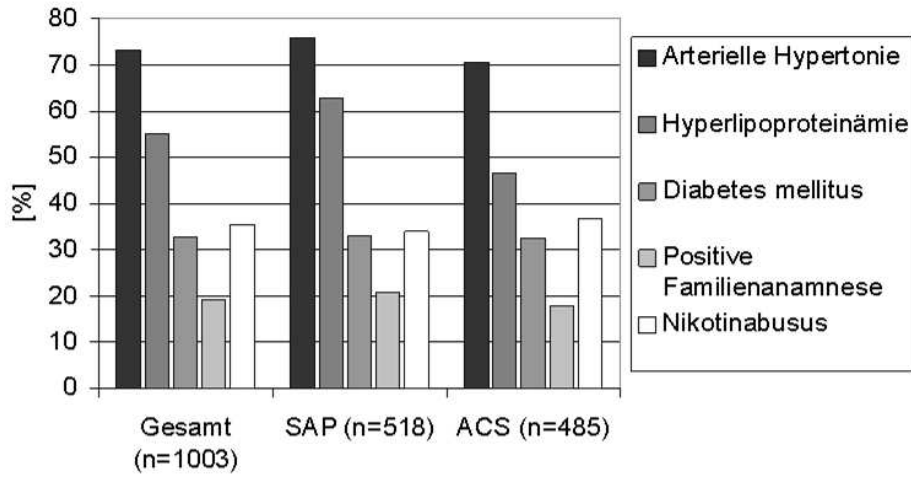


Abb.5 Patientendaten

C) Schwere der KHK. D) Linksventrikuläre Funktion.

E

Kardiovaskuläre Risikofaktoren



F

Medikation

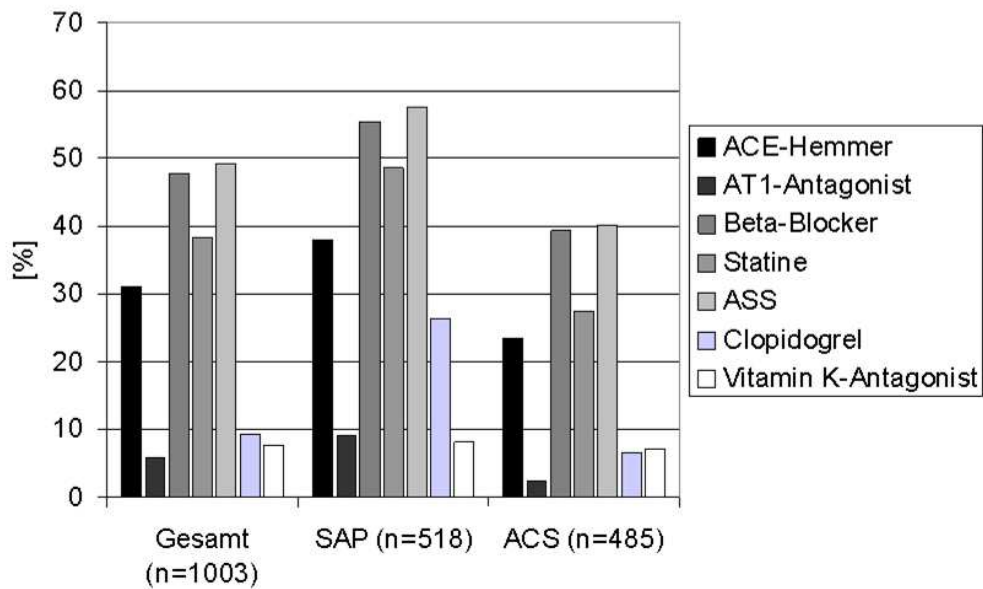


Abb.5 Patientendaten

E) Kardiovaskuläre Risikofaktoren. F) Medikation.

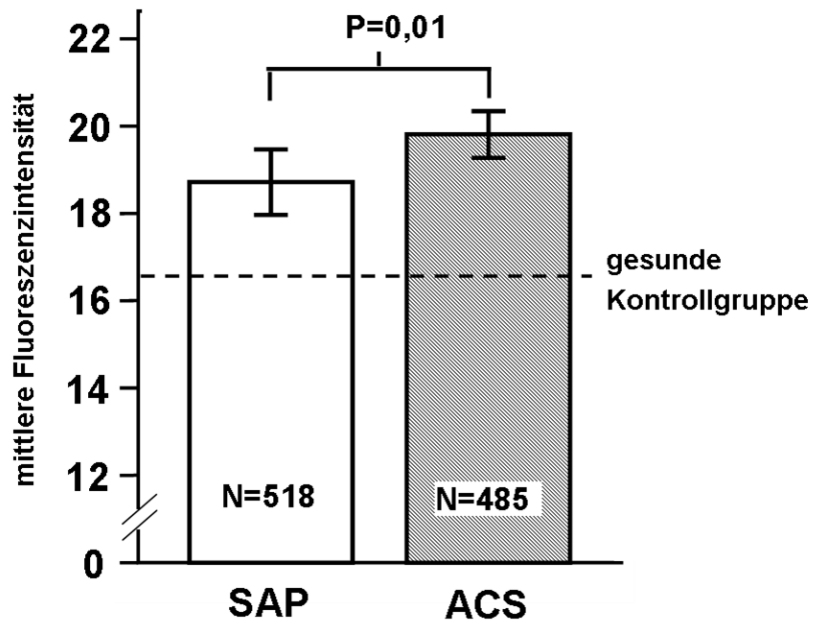


Abb.6 Thrombozytäre GPVI-Expression der Patienten mit koronarer Herzerkrankung
 GPVI-Expression der Patienten mit stabiler Angina pectoris (SAP) und GPVI-Expression der Patienten mit akutem Koronarsyndrom (ACS), sowie die GPVI-Expression der gesunden Kontrollgruppe.

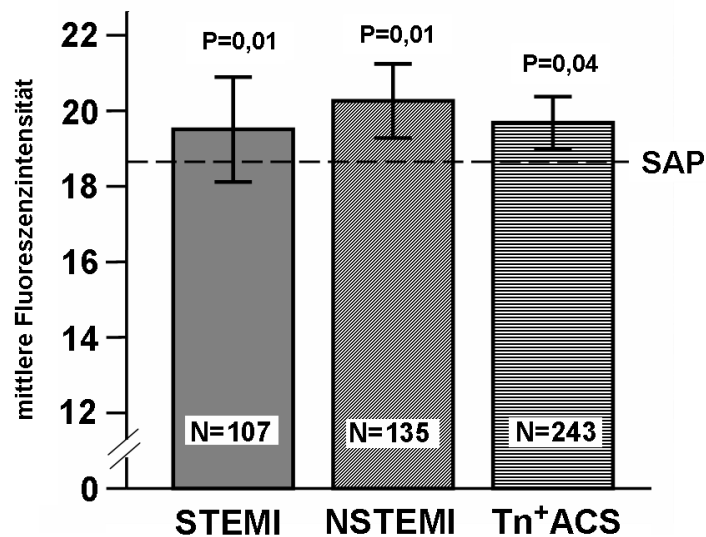


Abb.7 Differenzierung der akuten Koronarsyndrome
 GPVI-Expression der Patienten mit ST-Strecken-Hebungsinfarkten (STEMI), mit Nicht-ST-Strecken-Hebungsinfarkten (NSTEMI) und mit Troponin-positiven akuten Koronarsyndromen (Tn+ACS) im Vergleich zu der GPVI-Expression der Patienten mit stabiler Angina pectoris (SAP).

Bei Patienten mit ST-Strecken-Hebungsinfarkten (STEMI), Patienten mit Nicht-ST-Strecken-Hebungsinfarkten (NSTEMI) und Patienten mit Troponin-positiven akuten Koronarsyndromen (Tn⁺ACS) wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede in der GPVI-Expression gefunden. Allerdings zeigte jede dieser Untergruppen im Vergleich zu Patienten mit stabiler Angina pectoris (SAP) statistisch signifikant erhöhte GPVI-Werte [STEMI (n = 107): 19,5 ± 7,1, P = 0,01; NSTEMI (n = 135): 20,3 ± 5,7, P = 0,01; Tn⁺ACS (n = 243): 19,7 ± 5,3, P = 0,04] (Abb.7).

4.2.2 CD62P-Expression der Patienten mit koronarer Herzerkrankung

Zur Bestimmung des Aktivierungsgrades der Thrombozyten anhand ihrer Degranulation wurden die Blutproben parallel mit anti-CD62P versetzt und ebenfalls im Durchflusszytometer analysiert.

Die Oberflächenexpression von CD62P war bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom (ACS) verglichen mit der Expression bei Patienten mit stabiler Angina pectoris (SAP) signifikant erhöht [SAP (MFI ± SD): 13,5 ± 8,3; ACS: 15,4 ± 11,4; P = 0,036].

Bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung korrelierte die Höhe der GPVI-Expression mit der Höhe der CD62P-Expression (r = 0,702; P = 0,001).

4.2.3 GPVI-Expression der herzgesunden Kontrollgruppe

Um Kenntnis über normale GPVI-Expressionen zu gewinnen, wurden GPVI-Werte gesunder Personen bestimmt.

Ein Teil der Kontrollgruppe wurde nicht koronarangiographiert. Es handelte sich um 24 Männer und 16 Frauen im Alter von 31,1 ± 10,2 Jahren.

Die Probanden nahmen keine Medikamente ein und wiesen, abgesehen von fünf Rauchern, keine kardiovaskulären Risikofaktoren auf.

Der andere Teil der Kontrollgruppe setzte sich aus Patienten zusammen, die wegen thorakaler Schmerzen einer Herzkatheteruntersuchung unterzogen wurden. Bei der Untersuchung wurde eine KHK ausgeschlossen. Es handelte sich um zwölf Männer und acht Frauen im Alter von $61,9 \pm 12,3$ Jahren. Die Patienten wiesen folgende kardiovaskulären Risikofaktoren auf: arterielle Hypertonie (9), Diabetes mellitus (3), positive Familienanamnese (2), Hyperlipoproteinämie (2) und Nikotinabusus (3). Die Medikation bestand aus β -Blockern (5), ASS (3), Statinen (2) und ACE-Hemmern (2).

Für beide Kontrollgruppen zusammen ergab sich eine mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für GPVI von $16,26 \pm 3,4$ ($n = 60$). Die Werte beider Untergruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

4.3 Ergebnisse statistischer Auswertungen

4.3.1 Korrelation von GPVI mit Troponin I und Kreatinkinase (CK)

Die ermittelten GPVI-Werte wurden den Markern myokardialer Ischämie gegenübergestellt.

Um herauszufinden, ob Wechselbeziehungen zwischen GPVI-Expression und den Troponin I- bzw. CK-Werten bestehen, wurde eine Spearman-Korrelation durchgeführt.

Es zeigte sich, dass die GPVI-Werte nicht mit den initial bei Aufnahme ins Krankenhaus festgestellten Troponin I- und CK-Werten korrelierten (initiales Troponin I: $r = 0,056$, $P = 0,149$; initiale CK: $r = 0,026$, $P = 0,481$). Dagegen korrelierte der GPVI-Wert mit den im Laufe des Krankenhausaufenthaltes

ermittelten Maximalwerten für Troponin I und CK (maximales Troponin I: $r = 0,107$, $P = 0,002$; maximale CK: $r = 0,089$, $P = 0,009$).

Keine Korrelation konnte zwischen der Expression von GPVI und dem Wert für das C-reaktive Protein festgestellt werden.

4.3.2 Multifaktorielle Kovarianzanalyse

Eine multifaktorielle Kovarianzanalyse sollte Aufschluss darüber geben, ob die Höhe der GPVI-Expression von bestimmten Parametern wie Medikation und kardiovaskulären Risikofaktoren beeinflusst wird. Dazu wurde der dekadische Logarithmus der GPVI-Werte zwischen ACS und SAP mit der Medikation, den kardiovaskulären Risikofaktoren und den etablierten Laborparametern verglichen.

Hierbei zeigte sich, dass die thrombozytäre Oberflächenexpression von GPVI unabhängig von Medikation, kardiovaskulären Risikofaktoren und Laborwerten ist. Ein signifikanter Unterschied in der Expression von GPVI konnte beim Vergleich der Gruppen ACS und SAP festgestellt werden (Tabelle 4-1).

4.3.3 Berechnung einer ROC-Kurve

Eine ROC (receiver operating characteristic)-Kurve wurde berechnet um herauszufinden, mit welcher Wahrscheinlichkeit der GPVI-Wert als Indikator für ein akutes Koronarsyndrom dienen kann.

Die Fläche unter der ROC-Kurve nahm einen Wert von 0,612 an (bei einem 95%igen Konfidenzintervall zwischen 0,577 und 0,646). Der optimale „Cutoff“-Wert für ACS lag bei 18,6 (Abb.8).

Tabelle 4-1 Multifaktorielle Kovarianzanalyse		
Kategorie	Faktor	P-Wert
Medikation	ACE-Hemmer	0,735
	AT1-Antagonist	0,808
	Beta-Blocker	0,285
	Statine	0,693
	ASS	0,657
	Clopidogrel	0,125
	Vitamin K-Antagonist	0,526
Risikofaktoren	Arterielle Hypertonie	0,854
	Hyperlipoproteinämie	0,773
	Diabetes mellitus	0,784
	Positive Familienanamnese	0,807
	Nikotinabusus	0,522
Etablierte Laborparameter	Initiales Troponin I (ng/ml)	0,227
	Initiale CK (U/l)	0,347
	Initiale CKMB (U/l)	0,884
	Initiales CRP (mg/dl)	0,538
Gruppen	ACS vs. SAP	0,039

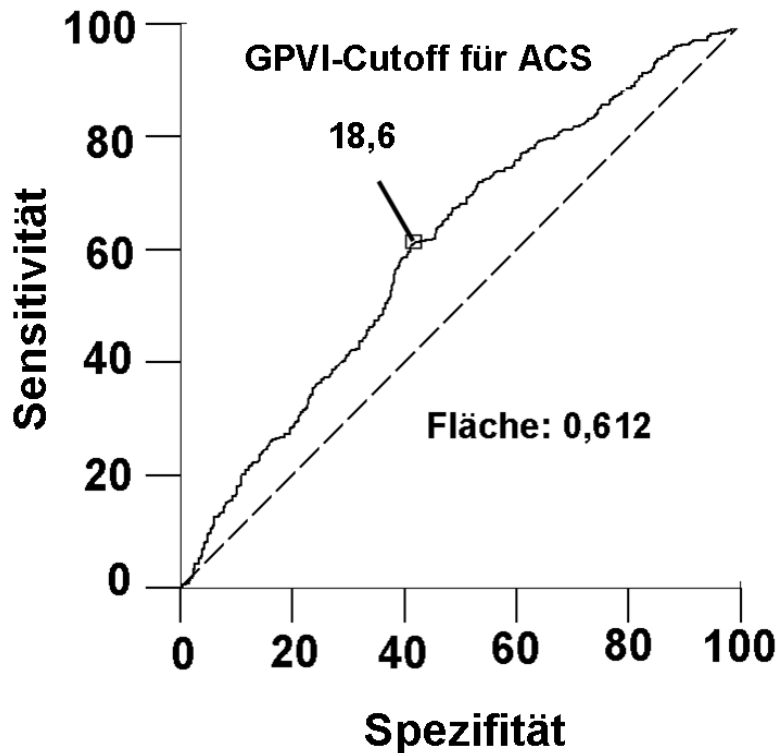


Abb.8 ROC-Kurve der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der thrombozytären GPVI-Expression
Der optimale „Cutoff“-Wert für GPVI zur Vorhersage eines akuten Koronarsyndroms (ACS) lag bei 18,6 MFI. Die Fläche unter der ROC-Kurve nahm einen Wert von 0,612 an [Konfidenzintervall (95%) zwischen 0,577 und 0,646].

4.3.4 Logistische Regressionsanalyse

Die logistische Regressionsanalyse sollte die Vorhersagewahrscheinlichkeit für ACS durch GPVI im Vergleich zur Vorhersagewahrscheinlichkeit durch etablierte Laborwerte untersuchen. Als Laborparameter wurden die bei Aufnahme ins Krankenhaus gemessenen Werte für Troponin I, CK, CKMB und CRP herangezogen.

Dabei zeigte sich, dass der GPVI-Wert im Gegensatz zu den etablierten Nekroseparametern signifikant mit ACS assoziiert war (Tabelle 4-2).

Tabelle 4-2 Logistische Regressionsanalyse der gewonnenen Laborwerte				
Parameter	P-Wert	Odds Ratio	95% CI für OR	
			Untere Grenze	Obere Grenze
GPVI (MFI)	0,041	1,100	1,004	1,206
Initiales Troponin I (ng/ml)	0,100	1,055	0,990	1,124
Initiale CK (U/l)	0,194	0,999	0,998	1,000
Initiale CKMB (U/l)	0,166	1,009	0,996	1,022
Initiales CRP (mg/dl)	0,927	0,996	0,906	1,094

5 Diskussion

5.1 Bedeutung von GPVI-Expression und GPVI-Morphologie

Eine koronare Herzerkrankung entsteht durch die Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten im Bereich einer Plaqueruptur (34). Dies führt zu Thrombusbildung und Atherosklerose.

Durch die Plaqueruptur werden subendothelial gelegene Proteine der extrazellulären Matrix (ECM) freigelegt. Dadurch sind diese dem Blutstrom ausgesetzt, was zur raschen Benetzung mit aktivierten Thrombozyten führt (3). Unter den Proteinen der ECM spielt das Kollagen eine wichtige Rolle. Das thrombozytäre GPVI vermittelt als wichtigster Kollagenrezeptor die Interaktion zwischen Thrombozyten und Kollagen und sorgt durch Aktivierung von β_1 - und β_3 -Integrinen für Adhäsion, Thrombusbildung und Thrombuswachstum (35, 28, 21). Die GPVI-Expression ist begrenzt auf das Megakaryozytensystem und ist deshalb thrombozytenspezifisch (35). GPVI ist also anders als Troponin und CK kein Myokardnekrose-Marker, sondern ein Thrombose-Marker.

Erhöhte GPVI-Expressionen zirkulierender Thrombozyten wurden bereits bei Patienten mit Typ-2-Diabetes nachgewiesen (27). Darüber hinaus scheinen genetische Faktoren bei der Entstehung von Koronarthrombose und Myokardinfarkt eine wichtige Rolle zu spielen (36).

Unterschiede in der GPVI-Morphologie und -Expression können sowohl zu erhöhter als auch zu verminderter Thromboseneigung führen. Das Vorliegen von GPVI-Polymorphismen erhöht das Myokardinfarkt-Risiko, speziell bei älteren Patienten mit einer Mutation des β -Fibrinogen-Gens, um das zehnfache (37). Polymorphismen des $\alpha_2\beta_1$ -Rezeptors sind assoziiert mit einer höheren Kollagenrezeptordichte und einem erhöhten Risiko für Myokardinfarkte und Schlaganfälle (38, 39).

In der vorliegenden Studie wurden die Patienten nicht auf GPVI-Polymorphismen untersucht. Es kann jedoch angenommen werden, dass unabhängig von der GPVI-Expression genetische Faktoren entscheidend zum Risiko beitragen, eine koronare Herzerkrankung zu erleiden.

5.2 Die Rolle des GPVI bei der Thrombusbildung

GPVI als wichtigster Kollagenrezeptor spielt eine entscheidende Rolle bei der kollageninduzierten Thrombusbildung. Verschiedene Mechanismen, die zur Reduzierung der Thrombusbildung führen können, wurden bereits untersucht. GPVI-Mangel führt zu geringgradig verlängerten Blutungszeiten (19, 20) und zu verminderter kollageninduzierter Thrombozytenaktivierung und Thrombusbildung (17, 18).

In vitro kann mit Antikörpern gegen GPVI die Thrombozytenaktivierung je nach Bindungsmechanismus gefördert oder gehemmt werden. Die F_{ab}-Fragmente eines Antikörpers können durch Blockieren des GPVI die Thrombozytenaktivierung und Thrombusbildung verhindern (40). Eine deutlich reduzierte primäre Hämostase mit gesteigertem Blutungsrisiko konnte bei Mäusen festgestellt werden, die mit einem Antikörper gegen GPVI behandelt wurden und gleichzeitig reduzierte $\alpha_2\beta_1$ -Werte aufwiesen oder eine ASS-Therapie erhielten (41).

Lösliche GPVI-Dimere, die die Kollagenbindungsstellen für GPVI blockieren, können die GPVI-Funktion verringern und so die kollageninduzierte Thrombusbildung reduzieren (28). In einem in-vivo-Modell wurden Carotiden von Ratten, die eine Verletzung des Endothels hatten, mit einem löslichen GPVI-Dimer behandelt. Dabei zeigte sich, dass das lösliche GPVI das durch die Endothelverletzung dem Blutstrom ausgesetzte Kollagen blockierte und so die Thrombusbildung an der Stelle der Verletzung reduzierte, ohne die Hämostase systemisch zu beeinträchtigen (42).

Die Möglichkeit der lokalen Behandlung von Plaquerupturen, die ein hohes lokales Thromboserisiko mit sich bringen, könnte eine systemische Therapie, die die Hämostase beeinträchtigt und das Blutungsrisiko erhöht, überflüssig machen. Dies könnte auch für Patienten, bei denen eine Therapie mit Clopidogrel oder Vitamin K-Antagonisten kontraindiziert ist, von Bedeutung sein. Durch Bestimmung der thrombozytären GPVI-Expression könnten diese Patienten identifiziert werden. Die Entwicklung pharmakologischer Substanzen zur Hemmung der Interaktion von GPVI und Kollagen könnte eine lokale Behandlung in einer Phase der Erkrankung möglich machen, in der es noch nicht zu Schädigungen des Myokards gekommen ist.

5.3 Diskussion der Methoden

Die Bestimmung der GPVI-Werte wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie vorgenommen. Der dazu notwendige monoklonale Antikörper war ein spezifischer anti-GPVI-Antikörper, der speziell für die Anwendung im Durchflusszytometer entwickelt wurde (27).

Da die Blutproben vor der Vermessung im Durchflusszytometer zunächst mit Antikörpern versetzt und anschließend inkubiert werden müssen, ist diese Methode für den routinemäßigen Einsatz nicht geeignet. Hier könnte das lösliche GPVI Abhilfe schaffen, da es sich mit Hilfe eines ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) in der täglichen klinischen Routine bestimmen ließe. Das lösliche GPVI entsteht durch Abspaltung von Thrombozyten (43). Es zirkuliert im Plasma und ist nicht membrangebunden (44). Durch Zentrifugieren von Blutproben und Durchführung eines ELISA mit dem gewonnenen Blutplasma könnte das lösliche GPVI gemessen werden.

5.4 Diskussion der Ergebnisse

Die vorliegende prospektive Studie hatte zum Ziel, die thrombozytäre GPVI-Expression von Patienten mit koronarer Herzerkrankung zu bestimmen. Es zeigte sich, dass die GPVI-Werte bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom signifikant höher lagen als die GPVI-Werte der Patienten, bei denen eine stabile Angina pectoris festgestellt wurde. Der durch Blutentnahme vor der Herzkatheteruntersuchung und anschließende FACS-Analyse gemessene GPVI-Wert war unabhängig von Markern myokardialer Ischämie (Troponin und CK) mit akuten Koronarsyndromen assoziiert. Erhöhte GPVI-Werte besitzen einen Vorhersagewert im Bezug auf die Entwicklung akuter Koronarsyndrome bzw. Myokardinfarkte.

Die Ergebnisse der Studie sprechen dafür, dass GPVI ein Marker sein könnte, der eine frühzeitige Identifizierung von Patienten mit akutem Koronarsyndrom erleichtert.

Die GPVI-Werte zeigten sich bei ACS-Patienten bereits bei Aufnahme ins Krankenhaus erhöht, während die Marker myokardialer Nekrose noch im Normbereich waren. Dies lässt den Schluss zu, dass ein thrombozytenspezifischer Marker wie das GPVI den Myokardnekrosemarkern (Troponin, CK und CKMB) überlegen sein könnte, wenn es darum geht, Patienten mit hohem Risiko möglichst frühzeitig vor einem akuten Ereignis zu identifizieren.

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass neben dem GPVI weitere Biomarker existieren, die in einem sehr frühen Stadium der KHK auf drohende myokardiale Ischämien hindeuten. Hierbei handelt es sich um Marker der Inflammation (CRP, Myeloperoxidase, MMP-9, PAPP-A und PIGF), der myokardialen Dehnung (BNP) und der Thrombusbildung (CD40L) (24). Da die Werte dieser Marker bei einem akuten Ereignis bereits früher ansteigen als die Werte der Myokardnekrose (Troponin, CK, CKMB), könnten sie zu einer

beschleunigten Diagnosestellung beitragen. Das GPVI stellt nun allerdings einen ersten thrombozytenspezifischen Biomarker dar.

Aus den Ergebnissen der Studie wird deutlich, dass bei einem akuten Koronarsyndrom Thrombozytenaktivierung stattfindet und diese entscheidend für das Fortschreiten der Erkrankung ist. Folglich könnte ein Parameter wie das GPVI, der Auskunft über den Aktivierungsgrad von Thrombozyten gibt, als Biomarker für die Risikoeinschätzung bei ACS-Patienten dienen. Die Feststellung eines erhöhten GPVI-Wertes könnte einen prothrombotischen Status des ACS anzeigen und so für die Einleitung einer adäquaten Therapie sorgen, bevor es zu einer manifesten myokardialen Ischämie und Schädigung kommt.

6 Zusammenfassung

Das Glykoprotein VI der Thrombozytenoberfläche trägt entscheidend zu thrombotisch-ischämischen Prozessen, wie sie akuten Koronarsyndromen zugrunde liegen, bei.

Basierend auf den Ergebnissen einer Pilotstudie wurde in der vorliegenden prospektiven Studie die GPVI-Expression von Patienten mit symptomatischer koronarer Herzerkrankung untersucht. Die Patienten wurden koronarangiographiert. Die Messung der GPVI-Expression erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie.

Patienten, bei denen ein akutes Koronarsyndrom (ACS) diagnostiziert wurde, zeigten signifikant höhere GPVI-Werte als Patienten mit stabiler Angina pectoris (SAP). Patienten mit erhöhter GPVI-Expression hatten ein gesteigertes Risiko für ACS. Erhöhte GPVI-Werte waren unabhängig von den Myokardnekrosemarkern (Troponin, Kreatinkinase, Kreatinkinase-MB) prädiktiv für ein ACS.

Die Ergebnisse dieser Studie deuten darauf hin, dass das thrombozytäre GPVI als Biomarker fungieren und Patienten mit ACS früh identifizieren könnte. Bereits erhöhte GPVI-Werte bei noch im Normbereich liegenden Myokardnekrosemarkern sprechen dafür, dass durch die Bestimmung der GPVI-Expression eine Diagnose bereits vor Eintreten einer schweren myokardialen Ischämie ermöglicht werden könnte.

In weiteren Studien sollte geklärt werden, ob Patienten mit erhöhten GPVI-Werten eine schlechtere Prognose mit im Verlauf vermehrt auftretenden kardiovaskulären Ereignissen haben.

7 Literaturverzeichnis

1. Teplitz L, Siwik DA.
Cellular signals in atherosclerosis.
J Cardiovasc Nurs. 1994; 8(3):28-52
2. Jurk K, Kehrel BE.
Platelets: physiology and biochemistry.
Semin Thromb Hemost 2005; 31(4):381-392
3. Ruggeri ZM.
Platelets in atherothrombosis.
Nat Med 2002; 8:1227-1234
4. Rosenfeld SJ, Gralnick HR.
Adhesive interactions in hemostasis.
Acta Haematol 1997; 97(1-2):118-125
5. Ofosu FA, Nyarko KA.
Human platelet thrombin receptors. Roles in platelet activation.
Hematol Oncol Clin North Am 2000; 14(5):1185-1198
6. Gawaz M.
Thrombozyten und primäre Hämostase.
In: "Das Blutplättchen", Thieme-Verlag Stuttgart 1999; 4-41
7. Gawaz M.
Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium.
Cardiovasc Res 2004; 61(3):498-511
8. Nurden A.
Human platelet glycoproteins.
In: Haemostasis and Thrombosis. Ed. Bloom A, Forbes CD. Churchill Livingstone 1994; 3rd edition, 259-285
9. Hynes RO.
Integrins: versability, modulation, and signalling in cell adhesion.
Cell 1992; 69:11-25
10. Ruggeri ZM.
Mechanisms initiating platelet thrombus formation.
Thromb Haemost 1997; 78(1):611-616
11. Merten M, Thiagarajan P.
P-selectin in arterial thrombosis.
Z Kardiol 2004; 93(11):855-863
12. Moroi M, Jung SM.
Integrin-mediated platelet adhesion.
Front Biosci 1998; 3:d719-728

13. Kehrel B, Wierwille S, Clemetson KJ, Anders O, Steiner M, Knight CG, Farndale RW, Okuma M, Barnes MJ.
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 1998; 91(2):491-499
14. Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM.
Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow.
Cell 1998; 94:657-666
15. Clemetson KJ, McGregor JL, James E, Dechavanne M, Luscher EF.
Characterization of the platelet membrane glycoprotein abnormalities in Bernard-Soulier syndrome and comparison with normal by surface-labeling techniques and high-resolution two-dimensional gel electrophoresis.
J Clin Invest 1982; 70:304-311
16. Jandrot-Perrus M, Busfield S, Lagrue AH, Xiong X, Debili , Chickering T, Le Couedic JP, Goodearl A, Dussault B, Fraser C, Vainchenker W, Villeval JL.
Cloning, characterization, and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the immunoglobulin superfamily.
Blood 2000; 96(5):1798-1807
17. Nieswandt B, Schulte V, Bergmeier W, Mokthari-Nejad R, Rackebrandt K, Cazenave JP, Ohlmann P, Gachet C, Zimigibel H.
Long-term antithrombotic protection by in vivo depletion of platelet glycoprotein VI in mice.
J Exp Med 2001; 193:459-469
18. Goto S, Tamura N, Handa S, Arai M, Kodama K, Takayama H.
Involvement of glycoprotein VI on both collagen and von Willebrand factor surfaces under flow conditions.
Circulation 2002; 106:266-272
19. Moroi M, Jung SM, Okuma M, Shinmyozu K.
A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen induced aggregation adhesion.
J Clin Invest 1989; 84:1440-1445
20. Sugiyama T, Okuma M, Ushikubi F, Sensaki S, Kanaji K, Uchino H.
A novel platelet aggregating factor in a patient with defective collagen-induced platelet aggregation and autoimmune thrombocytopenia.
Blood 1987; 69:1712-1720
21. Massberg S, Gawaz M, Grüner S, Schulte V, Konrad I, Zohlnhofer D, Heinzmann U, Nieswandt B.
A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo.

- J Exp Med 2003; 197:41-49
22. Moroi M, Jung SM.
Platelet glycoprotein VI: its structure and function.
Thromb Res 2004; 114:221-233
23. Gawaz M.
Thrombozyten und Pathophysiologie der koronaren Herzerkrankung.
In: „Das Blutplättchen“, Thieme-Verlag Stuttgart 1999; 89-108
24. Apple FS, Pearce LA, Chung A, Ler R, Murakami MM.
Multiple biomarker use for detection of adverse events in patients
presenting with symptoms suggestive of acute coronary syndrome.
Clin Chem 2007; 53(5):874-881
25. Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, van den Brand MJ, Boersma E,
Zeiger AM, Simoons ML: CAPTURE Study Investigators.
Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes.
N Engl J Med 2003; 348(12):1104-1111
26. Bigalke B, Lindemann S, Ehlers R, Seizer P, Daub K, Langer H,
Schönberger T, Kremmer E, Siegel-Axel D, May AE, Gawaz M.
Expression of platelet collagen receptor glycoprotein VI is associated
with acute coronary syndrome.
Eur Heart J 2006; 27(18):2165-2169
27. Cabeza N, Li Z, Schulz C, Kremmer E, Massberg S, Bultmann A, Gawaz
M.
Surface expression of collagen receptor Fc receptor-gamma/glycoprotein
VI is enhanced on platelets in type 2 diabetes and mediates release of
CD40 ligand and activation of endothelial cells.
Diabetes 2004; 53:2117-2121
28. Massberg S, Konrad I, Bultmann A, Schulz C, Munch G, Peluso M,
Lorenz M, Schneider S, Bosta F, Muller I, Hu B, Langer H, Kremmer E,
Rudelius M, Heinzmann U, Ungerer M, Gawaz M.
Soluble glycoprotein VI dimer inhibits platelet adhesion and aggregation
to the injured vessel wall in vivo.
FASEB J 2004; 18(2):397-399
29. Luttmann W.
Durchflusszytometrie.
In: „Der Experimentator Immunologie“, Spektrum Akademischer Verlag
2006; 75-101
30. Shattil SJ, Cunningham M, Hoxie JA.
Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent
monoclonal antibodies and flow cytometry.
Blood 1987; 70:307-315
31. Gawaz M, Neumann FJ, Schomig A.
Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery
disease: consequences for diagnosis and therapy.

- Circulation 1999; 99:E1-E11
32. Fateh-Moghadam S, Bocksch W, Ruf A, Dickfeld T, Scharfl M, Pogatsa-Murray G, Hetzer R, Pleck E, Gawaz M.
Changes in surface expression of platelet membrane glycoproteins and progression of heart transplant vasculopathy.
Circulation 2000; 102:890-897
33. Dupont WD, Plummer WD Jr.
Power and Sample Size Calculations: A Review and Computer Program.
Controlled Clinical Trials 1990; 11:116-128
34. Gawaz M, Langer H, May AE.
Platelets in inflammation and atherogenesis.
J Clin Invest 2005; 115:3378-3384
35. Nieswandt B, Watson SP.
Platelet-collagen interaction; is GPVI the central receptor?
Blood 2003; 102:449-461
36. Ollikainen E, Mikkelsson J, Perola M, Penttila A, Karhunen PJ.
Platelet membrane collagen receptor glycoprotein VI polymorphism is associated with coronary thrombosis and fatal myocardial infarction in middle-age men.
Atherosclerosis 2004; 176:95-99
37. Croft SA, Samani NJ, Teare MD, Hampton KK, Steeds RP, Channer KS, Daly ME.
Novel platelet membrane glycoprotein VI dimorphism is a risk factor for myocardial infarction.
Circulation 2001; 104(13):1459-1463
38. Moshfegh K, Wuillemin WA, Redondo M, Lammle B, Beer JH, Liechti-Gallati S, Meyer BJ.
Association of two silent polymorphisms of platelet glycoprotein Ia/IIa receptor with risk of myocardial infarction: a case-control study.
Lancet 1999; 353(9150):351-354
39. Carlsson LE, Santoso S, Spitzer C, Kessler C, Greinacher A.
The alpha2 gene coding sequence T807/A873 of the platelet collagen receptor integrin alpha2beta1 might be a genetic risk factor for the development of stroke in younger patients.
Blood 1999; 93(11):3583-3586
40. Lecut C, Feeney LA, Kingsbury G, Hopkins J, Lanza F, Gachet C, Villeval JL, Jandrot-Perrus M.
Human platelet glycoprotein VI function is antagonized by monoclonal antibody-derived Fab fragments.
J Thrombosis Haemost 2003; 1(12):2653-2662
41. Grüner S, Prostedna M, Aktas B, Moers A, Schulte V, Krieg T, Offermanns S, Eckes B, Nieswandt B.

- Anti-Glycoprotein VI treatment severely compromises hemostasis in mice with reduced alpha2beta1 levels or concomitant aspirin therapy.
Circulation 2004; 110(18):2946-2951
42. Bültmann A, Herdeg C, Li Z, Munch G, Baumgartner C, Langer H, Kremmer E, Geisler T, May A, Ungerer M, Gawaz M.
Local delivery of soluble platelet collagen receptor glycoprotein VI inhibits thrombus formation in vivo.
Thromb Haemost 2006; 95(5):763-766
43. Gardiner EE, Arthur JF, Kahn ML, Berndt MC, Andrews RK.
Regulation of platelet membrane levels of glycoprotein VI by a platelet-derived metalloproteinase.
Blood 2004; 104(12):3611-3617
44. Boylan B, Chen H, Rathore V, Paddock C, Salacz M, Friedman KD, Curtis BR, Stapleton M, Newman DK, Kahn ML, Newman PJ.
Anti-GPVI-associated ITP: an acquired platelet disorder caused by autoantibody-mediated clearance of the GPVI/FcRgamma-chain complex from the human platelet surface.
Blood 2004; 104(5):1350-1355

8 Danksagung

Herrn Professor Dr. med. M. Gawaz und Herrn PD Dr. med. A. May danke ich für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung.

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. med. Boris Bigalke, der mir jederzeit hilfreich zur Seite stand. Ebenso danke ich den Laborassistentinnen Heike Runge und Iris Schäfer für ihre Unterstützung bei der Arbeit im Labor.

Meinen Eltern Dr. Wolfgang Geiger und Dr. Monika Geiger danke ich dafür, dass sie mir eine sorgenfreie Studienzeit ermöglicht und mich stets unterstützt haben.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Moritz Geiger
Geburtstag	5. Dezember 1980
Geburtsort	Karlsruhe

Ausbildungsweg

1987-1991	Grundschule Wolfartsweier, Karlsruhe
1991-2000	Bismarck-Gymnasium, Karlsruhe
2000	Allgemeine Hochschulreife
2000-2001	Zivildienst im Kreiskrankenhaus Calw
2001-2002	Musikstudium an der Musikhochschule Karlsruhe
2002-2003	Praktikum beim SWR-Sinfonieorchester Baden-Baden und Freiburg
Seit 2003	Studium der Zahnheilkunde an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
2005	Physikum
15.06.2009	Zahnärztliche Prüfung