



Fakultät für Medizin der Technischen Universität München
Klinik für Herz- und Kreislauferkrankungen des Deutschen Herzzentrums an der
Technischen Universität München
(Direktor: Prof. Dr. Heribert Schunkert)

Der Einfluss häufiger genetischer Varianten im KHK- Risikogen *GUCY1A3* auf die Thrombozytenfunktion

Bernhard Niklas Wolf

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Heribert Schunkert
2. Prof. Dr. Karl-Ludwig Laugwitz

Die Dissertation wurde am 06.12.2018 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 12.06.2019 angenommen.

Für meine Eltern

Zusammenfassung

In genomweiten Assoziationsstudien konnte ein Locus auf Chromosom 4q32.1 genomweit signifikant mit der koronaren Herzerkrankung (KHK) assoziiert werden. Der Locus enthält das *GUCY1A3*-Gen, welches für die α_1 -Untereinheit der löslichen Guanylatzyklase (sGC) kodiert. Die sGC führt Stickstoffmonoxid- (NO-) abhängig durch die Bildung des intrazellulären Botenstoffes zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) u.a. zu Vasodilatation und Hemmung der Thrombozytenaggregation. Die zellulären Mechanismen, die zur Assoziation von häufigen Varianten an diesem Locus mit der KHK führen, waren bislang nicht bekannt und sind Bestandteil dieser Arbeit.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst Patienten des Deutschen Herzzentrums München für *GUCY1A3* genotypisiert und hinsichtlich der Expression von *GUCY1A3* in zellulären Bestandteilen des Blutes untersucht. Zudem wurde eine Assoziation zwischen *GUCY1A3*-Genotyp und thrombozytären Phänotypen mittels Thrombozytenaggregometrie und Quantifizierung der cGMP abhängigen Phosphorylierung des Zielproteins VASP nachgewiesen. Homozygote Träger der Risikovariante des *lead Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) rs7692387 wiesen im Vollblut signifikant niedrigere *GUCY1A3*-mRNA-Spiegel auf als Nicht-Risikoallel-Träger. Zudem zeigten homozygote Nicht-Risikoallel-Träger im Vergleich zu homozygoten Risikoallel-Trägern eine signifikant stärkere Hemmung der Thrombozytenaggregation durch den NO-Donor Nitroprussid-Natrium, was nach Zugabe des Phosphodiesterase-5-Hemmers Sildenafil noch weiter verstärkt werden konnte. Außerdem wurde bei homozygoten Nicht-Risikoallel-Trägern im Vergleich zu homozygoten Risikoallel-Trägern eine signifikant stärkere Phosphorylierung von VASP, einem Effektor-Protein des NO/cGMP-Signalweges, das cGMP abhängig phosphoryliert wird, nachgewiesen. Die Ergebnisse zeigen Hinweise auf die funktionellen Mechanismen, welche für die Assoziation des *GUCY1A3* Lead-SNPs und der KHK verantwortlich sein könnten. Die signifikant verminderte Hemmung der Thrombozytenaggregation durch Stickstoffmonoxid und Sildenafil ist durch die signifikant verminderte Expression von *GUCY1A3* erklärbar und ist, wie andere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe gezeigt haben, auf die Beeinflussung einer Enhancer-Region im *GUCY1A3*-Gen zurückzuführen.

Die Regulation der Thrombozytenaggregation spielt auch im Rahmen von Folgeerkrankungen der koronaren Herzerkrankung eine entscheidende Rolle. Daher wurde im zweiten Teil dieser Arbeit im ISAR-ASPI-Register die Thrombozytenreaktivität unter Aspirintherapie nach Koronarintervention in Abhängigkeit

vom *GUCY1A3*-Genotyp untersucht. Hierbei ist es erstmals gelungen, eine Assoziation zwischen einem KHK-Risikogen und der Thrombozytenreaktivität unter Aspirintherapie aufzuzeigen. Bei homozygoten Risikoallel-Trägern zeigte sich im Vergleich zu Nicht-Risikoallel-Trägern eine signifikant höhere Thrombozytenreaktivität, die wiederum mit einem erhöhten Risiko für ischämische Ereignisse innerhalb von 30 Tagen nach Koronarintervention assoziiert ist.

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnte die Rolle des KHK-Risikogens *GUCY1A3* weiter aufgeklärt werden, wodurch die Grundlage für neue individualisierte Therapiestrategien in der Prävention der KHK geschaffen wurde.

Summary

A risk for coronary artery disease has previously been genome-wide significantly associated with a chromosomal locus at 4q32.1. The locus encompasses *GUCY1A3*, which encodes the α_1 -subunit of the soluble guanylyl cyclase (sGC), a key enzyme in the nitric oxide (NO)/cyclic guanosine monophosphate (cGMP) signaling pathway. sGC acting as the receptor for nitric oxide catalyzes the formation of the second messenger cGMP, which appears to trigger several antiatherosclerotic effects, like platelet inhibition and smooth muscle cell migration. The present study was performed to understand the underlying mechanism linking common variants in this genomic region with coronary risk. Individuals treated at the German Heart Centre Munich were genotyped and the expression of *GUCY1A3* in blood cells was measured by qPCR. Additionally, the association of *GUCY1A3*-genotype with its phenotype was assessed by optical determination of platelet aggregation and Western Blot quantification of cGMP dependent phosphorylation of the target protein VASP. We observed that whole blood *GUCY1A3* mRNA levels were significantly lower in individuals homozygous for the lead (rs7692387) risk variant. *Ex vivo* studied platelets from homozygous risk allele carriers displayed significantly reduced inhibition of adenosine diphosphate-induced platelet aggregation by the NO donor sodium nitroprusside and the phosphodiesterase 5 inhibitor sildenafil as compared to homozygous non-risk allele carriers. Additionally, homozygous non-risk allele carriers showed a stronger phosphorylation of VASP compared to homozygous risk-allele carriers. The findings offer a mechanistic explanation underlying the association of the genomic variant and the increased risk of atherothrombosis. The reduced inhibition of platelet aggregation by NO and Sildenafil can be explained by a reduced expression of *GUCY1A3* that, according to other findings of our workgroup, can be traced back on the influence of an enhancer-region in the *GUCY1A3* gene.

Inhibition of platelet aggregation also plays an important role in preventing secondary events after manifestation of coronary artery disease. For example, the risk of stent thrombosis varies with the efficacy of aspirin to inhibit platelet reactivity. Topic of the second part of this study was to investigate whether the *GUCY1A3* genotype affects platelet reactivity under the influence of aspirin ("on-aspirin") as well as the risk for ischemic events after coronary intervention. The association of *GUCY1A3* genotype with on-aspirin platelet reactivity was analyzed by a genetics substudy of specimen from the ISAR-ASPI registry. Homozygous *GUCY1A3* risk allele carriers displayed significantly increased on-aspirin platelet reactivity compared to non-risk allele carriers. In addition,

significantly more homozygous risk allele carriers, compared to non-risk allele carriers, were identified in the high-risk group for ischemic events of the ISAR-ASPI registry.

The genotype-dependent effects, found in this study, contribute to the understanding of the genetic and functional relevance of sGC activity for CAD and MI risk. Modulating sGC activity or inhibiting the resulting cellular effects caused by reduced expression of *GUCY1A3* might open new therapeutic approaches for individuals carrying *GUCY1A3* risk alleles. Knowledge of *GUCY1A3* genotype can help to identify individuals with an increased risk for ischemic events secondary to PCI taking clopidogrel in addition to aspirin. It needs to be further investigated if these findings can contribute to tailoring antiplatelet strategies after PCI.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	III
Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	X
Abbildungsverzeichnis	XII
I Einleitung.....	16
1.1 Die koronare Herzerkrankung – Definition, Pathophysiologie, Klinik und Therapie, Sekundärkomplikationen	16
1.2 Risikofaktoren der koronaren Herzerkrankung	22
1.3 Genetische Risikofaktoren	22
1.4 Thrombozyten	23
1.4.1 Definition und Eigenschaften	23
1.4.2 Thrombozytenaktivierung und -hemmung.....	24
1.4.3 Rolle beim Myokardinfarkt und der Atherosklerose.....	25
1.5 Risikogen <i>GUCY1A3</i>	26
1.5.1 Mutationen in <i>GUCY1A3</i> und deren Einfluss auf die KHK	26
1.5.2 Häufige Variante in <i>GUCY1A3</i> und deren Einfluss auf die KHK	27
1.6 Die lösliche Guanylatzyklase.....	27
1.6.1 Der NO/cGMP-Signalweg.....	28
1.6.2 Funktion der sGC in glatten Gefäßmuskelzellen und Thrombozyten	29
1.7 Fragestellung	31
II Materialien	32
2.1 Chemikalien, Puffer und Lösungen	32
2.2 Verbrauchsmaterialien	36
2.3 Kits.....	36
2.4 Geräte.....	37
2.5 Primer, Antikörper und qPCR-Sonden.....	38
2.6 Software und Onlinedienste	39
2.7 Studienpopulation	40
2.7.1 Analysen in Abhängigkeit von Stickstoffmonoxid	40
2.7.2 Plättchenreaktivität unter Aspirintherapie / ISAR-ASPI Genetics Substudie	40
III Methoden	41
3.1 Aufklärung, Anamnese und körperliche Untersuchung.....	41
3.2 Probenentnahme und Prozessierung	41
3.3 Nukleinsäureextraktion.....	42

3.3.1	DNA-Extraktion.....	42
3.3.2	RNA-Extraktion.....	43
3.3.3	Konzentrationsbestimmung und Verdünnung von Nukleinsäuren	44
3.4	Lichttransmissionsaggregometrie.....	44
3.4.1	Funktionsprinzip	44
3.4.2	Herstellung der Reagenzien	45
3.4.3	Herstellung von plättchenarmem (PPP) und plättchenreichem Plasma (PRP).....	47
3.4.4	Vorbereitung der Testküvetten.....	47
3.4.5	Durchführung der Messung	48
3.4.6	Auswertung	49
3.5	Genotypisierung	50
3.6	Genexpressionsanalyse	51
3.6.1	Reverse Transkription	52
3.6.2	Quantitative Polymerase Kettenreaktion.....	53
3.6.3	Auswertung	54
3.7	Western Blot	55
3.7.1	Vorbereitung der Proben	55
3.7.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Blotting	55
3.7.3	Auswertung	57
3.8	Statistische Analyse	57
3.8.1	Untersuchungen zum Einfluss der häufigen <i>GUCY1A3</i> -Variante auf die sGC in Thrombozyten	57
3.8.2	Untersuchungen zum Einfluss der häufigen <i>GUCY1A3</i> -Genvariante auf die Thrombozytenreaktivität bei KHK-Patienten nach PCI	57
IV	Ergebnisse.....	58
4.1	Untersuchungen zum Einfluss der häufigen <i>GUCY1A3</i> -Genvariante auf die sGC in Thrombozyten.....	58
4.1.1	Genotypisierung und Auswahl der Probanden.....	58
4.1.2	Assoziation von <i>GUCY1A3</i> -Genotyp und mRNA-Expression im Vollblut	60
4.1.3	Assoziation von <i>GUCY1A3</i> -Genotyp und NO-abhängiger Inhibition der Thrombozytenaggregation.....	61
4.1.4	Assoziation zwischen <i>GUCY1A3</i> -Genotyp und cGMP-abhängige Phosphorylierung von VASP	65
4.2	Untersuchungen zum Einfluss der häufigen <i>GUCY1A3</i> -Varianten auf die Thrombozyten-Reaktivität bei KHK-Patienten nach PCI.....	67
4.2.1	Charakteristika der Studienpopulation	67
4.2.2	Assoziation von <i>GUCY1A3</i> -Genotyp und ADP-induzierter Thrombozytenaggregation.....	69
4.2.3	Assoziation von <i>GUCY1A3</i> -Genotyp und Arachidonsäure (AA) -induzierter Thrombozytenaggregation	69
4.2.4	Risikostratifizierung unter Berücksichtigung des <i>GUCY1A3</i> -Genotyps.....	70

V	Diskussion	72
5.1	Einfluss der häufigen <i>GUCY1A3</i> -Genvariante auf die sGC-Aktivität in Thrombozyten	72
5.2	Einfluss der häufigen <i>GUCY1A3</i> -Genvariante auf die Thrombozytenreaktivität unter Aspirintherapie	79
VI	Literaturverzeichnis.....	86
Anhang	XCVII
Veröffentlichungen.....		XCVII
Finanzielle Unterstützung		XCVIII
Danksagung		XCIX

Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis

α_1 -sGC	α_1 -Untereinheit der löslichen Guanylatcyclase (<i>soluble guanylyl cyclase</i>)
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASS	Acetylsalicylsäure
AU	willkürliche Einheit (<i>arbitrary unit</i>)
AUC	<i>Area under the curve</i>
BMI	Body-Mass-Index
bp	Basenpaar(e)
c	Stoffmengenkonzentration
CABG	Koronararterien-Bypass
cDNA	<i>complementary DNA</i> , Komplementär-DNA
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CI	Konfidenzintervall
CRP	C-reaktives Protein
CT	<i>Threshold Cycle</i>
CV	kardiovaskulär
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EP2	Prostaglandin EP2-Rezeptor
EP3	Prostaglandin EP3-Rezeptor
EtOH	Ethanol
GWAS	genomweite Assoziationsstudie
HAPR	<i>High on-aspirin platelet reactivity</i>
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
HR	<i>Hazard Ratio</i>
IRAG	IP ₃ -Rezeptor assoziiertes cGMP-Kinase Substrat
KHK	Koronare Herzkrankheit
M	molar
MI	Myokardinfarkt
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
NO	Stickstoffmonoxid

NSTEMI	Nicht-ST-Hebungsinfarkt
OR	<i>Odds Ratio</i>
P2Y ₁₂ -RA	P2Y ₁₂ -ADP-Rezeptorantagonist
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCI	Perkutane transluminale koronare Angioplastie
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDE 5	Phosphodiesterase 5
PKG	Proteinkinase G
PPP	plättchenarmes Plasma (platelet poor plasma)
PRP	plättchenreiches Plasma (platelet rich plasma)
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
SDS	Natriumlaurylsulfat
SE	Standardfehler (standard error)
sGC	lösliche Guanylatzyklase (<i>soluble guanylate cyclase</i>)
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
ST	Stentthrombose
STEMI	ST-Hebungsinfarkt
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TXA ₂	Thromboxan A ₂
ü.N.	über Nacht
VASP	Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein
vWF	Von-Willebrand-Faktor
ZEB1	Zinc finger E-box-binding homeobox 1

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis	VIII
Tabelle 2: Bestandteile der α- und δ-Granula in Thrombozyten	24
Tabelle 3: Verteilung der Variante rs7692387 des <i>GUCY1A3</i>-Gens in der europäischen Bevölkerung A. Allelfrequenz B. Verteilung der Genotypen (Quelle: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).....	27
Tabelle 4: In den Versuchsreihen verwendete Chemikalien	32
Tabelle 5: In den Versuchsreihen verwendete Assays	35
Tabelle 6: In den Versuchsreihen verwendete Verbrauchsmaterialien	36
Tabelle 7: In den Versuchsreihen verwendete Kits	36
Tabelle 8: In den Versuchsreihen verwendete Geräte	37
Tabelle 9: In den Versuchsreihen verwendete Primer zur Sequenzierung der <i>GUCY1A3</i> Genvariante rs7692387	38
Tabelle 10: In der Genexpressionsanalyse eingesetzte Oligonukleotid-Primer ...	38
Tabelle 11: In der Genexpressionsanalyse mittels Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) eingesetzte Sonden	38
Tabelle 12: Im Western Blot eingesetzte Primärantikörper	39
Tabelle 13: Im Western Blot eingesetzter Sekundärantikörper	39
Tabelle 14: Für die Auswertungen verwendete Software und Onlinedienste	39
Tabelle 15: Konzentrationen der Reagenzien in den Arbeitslösungen sowie Endkonzentrationen	46
Tabelle 16: Reaktionsgemisch Genotypisierung einer DNA-Probe mittels ViiA™-7-Real-Time-PCR-System	51
Tabelle 17: Ansatz für RT-PCR je 0,2 ml PCR-Tube	52
Tabelle 18: Hinzugefügte Reagenzien je 0,2 ml PCR-Tube	52
Tabelle 19: Reaktionsansatz pro Well auf einer 96-Well Mikrotiterplatte	53
Tabelle 20: Zusammensetzung des Acrylamidgels	56
Tabelle 21: Genotyp-abhängige Merkmalsverteilung im Probandenkollektiv der Thrombozytenaggregationsmessung Homozygote Risiko- (n=14) und Nicht-Risikoallel-Träger (n=8) unterscheiden sich nicht in Bezug auf das Vorliegen einer KHK, auf die Medikation mit Aspirin oder einem ADP-Rezeptor-antagonisten, bezüglich Alter oder Geschlecht und der Thrombozytenzahl im Vollblut. Ein Unterschied besteht in der Thrombozytenzahl in plättchenreichem Plasma ($p=0,01$). Alter und Thrombozytenzahlen sind als Mittelwert mit Standardfehler angegeben. KHK, koronare Herzkrankheit; PRP, plättchenreiches Plasma. ADP-RA, ADP-Rezeptor-Antagonist (Clopidogrel, Prasugrel und Ticagrelor) [89].	59
Tabelle 22: Genotyp-abhängige Merkmalsverteilung im Probandenkollektiv der Thrombozytenaggregationsmessung mit Ausschluss einer Koronaren Herzkrankheit Homozygote Risiko- (n=6) und Nicht-Risikoallel-Träger (n=6) unterscheiden sich nicht in Bezug auf die Medikation mit Aspirin oder einem ADP-Rezeptor antagonist, bezüglich Alter oder Geschlecht und der Thrombozytenzahl im Vollblut oder PRP. Alter und Thrombozytenzahlen sind als Mittelwert mit Standardfehler angegeben. KHK, koronare Herzkrankheit; PRP,	

plättchenreiches Plasma. ADP-RA, ADP-Rezeptor-Antagonist (Clopidogrel, Prasugrel und Ticagrelor) [89].....	60
Tabelle 23: Beschreibung der untersuchten Studie PCI, Koronarintervention; P2Y ₁₂ RA, P2Y ₁₂ -ADP-Rezeptorantagonist.....	67
Tabelle 24: Populationscharakteristika und Vorstellungsgründe der analysierten ISAR-ASPI-Studie Kontinuierliche Daten sind als Median [Interquartil-Bereich (IQR)] angegeben. Kategorische Daten sind als absolute Zahlen (%) angegeben. BMI, body mass index; CABG, Koronararterienbypass; NSTEMI, Nicht-ST-Strecken-Hebungs-Myokardinfarkt; STEMI, ST-Strecken-Hebungs-Myokardinfarkt.	67
Tabelle 25: Anzahl der Ereignisse je klinischem Endpunkt innerhalb von 30 Tagen in ISAR-ASPI CV, kardiovaskulär; MI, Myokardinfarkt; ST, Stentthrombose, CABG, Koronararterienbypass.....	68
Tabelle 26: GUCY1A3-Genotyp-Frequenzen für den KHK Lead-SNP (rs7692387) in der untersuchten Studie	68
Tabelle 27: Expression der Transkriptionsfaktoren Alle untersuchten Transkriptionsfaktoren werden sowohl im Vollblut als auch in der Arteria mammaria interna und in der atherosklerotischen Arterienwand exprimiert [89].	77

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Stadien der Atherogenese** Die Abbildung zeigt die normale Konfiguration einer Arterienwand sowie die Veränderungen des Zellbildes bei Fortschreiten der Erkrankung. **a.** Eine typische dreischichtige Arterie: Tunica Intima (Endothelzellschicht), Tunica Media (enthält glatte Muskelzellen, „SMCs“), Tunica Adventitia. **b.** Zu Beginn der Atherogenese kommt es zur Adhäsion und Migration von Leukozyten (insbesondere Monozyten), welche sich in Makrophagen umwandeln, Lipide aufnehmen und fortan Schaumzellen („foam cells“) genannt werden. **c.** Im weiteren Verlauf erfolgt eine Größenprogredienz der Läsion durch die Migration von glatten Muskelzellen und der Produktion extrazellulärer Matrix. Durch Apoptose freigesetzte Lipide akkumulieren und bilden den nekrotischen Lipidkern der Plaque. **d.** Als Hauptkomplikation der Atherosklerose kann beispielsweise durch physischen Stress eine Thrombose entstehen. Auf der Abbildung ist die Ruptur der Fibrinkappe der Plaque zu sehen, wodurch es zu direktem Kontakt von Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten mit den Bestandteilen der Plaque kommt, was die Bildung eines gefäßverschließenden Thrombus ermöglicht. [6] Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: Figure 1 from Nature 2011. 473(7347):317-325 (Libby et al. 2011), copyright © 2011. 18
- Abbildung 2: Der NO/cGMP-Signalweg** Ein Ca^{2+} /Calmodulin-(CaM)-Komplex bindet an die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS). NOS katalysiert die Oxidation von L-Arginin (L-Arg) zu L-Citrullin (L-Cit) und Stickstoffmonoxid (NO). NO bindet nach Diffusion an das Fe^{II} -Häm der $\beta 1$ -Untereinheit der löslichen Guanylatzyklase (sGC). Diese Bindung führt zu einer signifikanten Steigerung von cGMP und Pyrophosphat (PP_i). cGMP bindet und aktiviert anschließend cGMP abhängige Proteinkinasen (cGKs), Phosphodiesterasen (PDE5) und Ionenkanäle [75]. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von Annual Reviews: Figure 1 from Annual review of biochemistry 2012. 81, 533–559 (Derbyshire, Marletta 2012), copyright © 2012. 29
- Abbildung 3: Konzept des cGMP-Signalweges** Die Grafik zeigt cGMP-Bildner (grün) und Effektoren (rot) sowie weiterführende Signalwege und Zellfunktionen (grau), welche eine Rolle für den Effekt von endogenem cGMP und/oder cGMP-erhöhenden Medikamenten (blau) spielen. Der untere Teil zeigt einige aktuelle (blau) sowie potentiell zukünftige (schwarz) Indikationen für eine cGMP-Spiegel oder cGMP-abhängige Proteinkinasen modulierende Medikation. BNP, natriuretisches Peptid Typ B; cGKs, cGMP-abhängige Proteinkinasen; IRAG, IP3 Rezeptor-assoziiertes cGKI β -Substrat; PDEs, Phosphodiesterasen; pGC, (Plasma) membrangebundene Guanilatzyklase; sGC, lösliche Guanilatzyklase; VASP, Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein. [82] Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons: Figure 1 from Conference on cGMP generators, effectors and therapeutic implications 2006. Band 7, 149-153 (Feil R, Kemp-Harper B 2006), copyright © 2016. 30
- Abbildung 4: Vorbereitung der Testküvetten** Bestückung von je 3 Testküvetten pro Proband mit einem Magnetrührer und anschließender Befüllung mit 200 μl

- plättchenreichem Plasma (PRP). Als Leerprobe diente je Proband eine Testküvette befüllt mit 250 μ l plättchenarmem Plasma (PPP)..... 48
- Abbildung 5: Versuchsdurchführung der optischen Lichttransmissionsaggregometrie** Zugabe von zunächst 25 μ l (Kontrolllösung, Nitroprussid-Natrium-Lösung oder Nitroprussid-Natrium-Sildenafil-Lösung) in die Testküvetten mit zweiminütiger Inkubation. Nachfolgend Auslösung der Aggregation durch Zugabe von 25 μ l ADP-Lösung und Aufzeichnung der Aggregationskurve..... 49
- Abbildung 6: Darstellung der Aggregometriekurven** In Abhängigkeit zur verstrichenen Zeit (Abszisse) wurde für jeden Testschacht der Grad der Aggregation in Prozent (Ordinate) über 5 Minuten aufgezeichnet. In dieser Abbildung sind beispielsweise die Kanäle 1-3 und die Kanäle 4-6 je einem Probanden zugeordnet. Die erste Kurve (Kanal 1 bzw. 4) gibt den Verlauf der ADP-induzierten Plättchenaggregation ohne Zugabe von Inhibitoren (Kontrolllösung) an. Die zweite Kurve (Kanal 2 bzw. 5) zeigt den Verlauf der ADP-induzierten Plättchenaggregation nach Zugabe von Nitroprussid-Natrium. Die dritte Kurve (Kanal 3 bzw. 6) zeigt den Kurvenverlauf nach Zugabe von Nitroprussid-Natrium und des PDE5-Hemmers Sildenafil. 50
- Abbildung 7: Optische Darstellung der Messwerte der quantitativen PCR** Die Intensität der gemessenen Fluoreszenz wird abhängig von der Anzahl der Zyklen dargestellt. Die Software definiert hierbei automatisch für jede Kurve den Threshold. 54
- Abbildung 8: Die KHK Risikovariante von rs7692387 im *GUCY1A3*-Gen ist signifikant mit einer reduzierten *GUCY1A3* Expression im Vollblut assoziiert** Die Spiegel des *GUCY1A3*-Transkripts im Vollblut waren signifikant geringer in homozygoten Risikoallel-Trägern (n=4) als in homozygoten Nicht-Risikoallel-Trägern (n=4). Mittelwert und Standardfehler, T-Test. 61
- Abbildung 9: Genotyp-abhängige Thrombozytenreaktion auf Stickstoffmonoxid (NO) A.** Die Baseline ADP-induzierte Plättchenaggregation unterschied sich nicht zwischen den Genotypen (n=8 und n=14). **B, C.** Die Zugabe des NO-Donors Nitroprussid Natrium (10 μ M) führte zu einer signifikant stärkeren Hemmung der ADP-induzierten Plättchenaggregation in homozygoten Nicht-Risikoallel-Trägern (n=8) im Vergleich zu homozygoten Risikoallel-Trägern (n=14; p<0,001; **B**) mit zusätzlich stärkerem Effekt nach Inhibition des cGMP-Abbaus durch Sildenafil (10 μ M; p<0,0001; **C**). Median und Interquartilsabstand, Mann-Whitney Test.... 63
- Abbildung 10: Genotyp-abhängige Thrombozytenreaktion auf Stickstoffmonoxid (NO) – nur gesunde Probanden A.** Die Baseline ADP-induzierte Plättchenaggregation unterschied sich nicht zwischen den Genotypen. **B, C.** Die Zugabe des NO-Donors Nitroprussid Natrium (10 μ M) führte zu einer signifikant stärkeren Hemmung der ADP-induzierten Plättchenaggregation in homozygoten Nicht-Risikoallel-Trägern (n=6) im Vergleich zu homozygoten Risikoallel-Trägern (n=6, **B**) mit zusätzlich stärkerem Effekt nach Inhibition des cGMP-Abbaus durch Sildenafil (10 μ M, **C**). 64
- Abbildung 11: Korrelation der Anzahl an *GUCY1A3* Nicht-Risiko-Allelen (A) und der Thrombozytenreaktion auf den NO-Donor Nitroprussid-Natrium bezüglich der Hemmung der Aggregation** Die Anzahl der *GUCY1A3* Nicht-

- Risikoallele (rs7692387, A) korreliert signifikant mit der Reaktion auf die Zugabe des NO-Donors, d.h. die Hemmung der Thrombozytenaggregation ist stärker je mehr Nicht-Risikoallele vorliegen. Mittelwert und Standardfehler, lineare Regression. 65
- Abbildung 12: Stickstoffmonoxid führt bei homozygoten Nicht-Risikoallel-Trägern zu einer stärkeren cGMP-abhängigen Phosphorylierung von VASP** Die Phosphorylierung von VASP durch die cGMP-abhängige Proteinkinase G (PKG) wurde mittels Western Blot nachgewiesen. Die PKG-abhängige Phosphorylierung von VASP nach Zugabe des NO-Donors Nitroprussid-Natrium in homozygoten Nicht-Risikoallel-Trägern (n=8) stärker ($p < 0,01$). Nach zusätzlicher Zugabe von Sildenafil zeigten die homozygoten Nicht-Risikoallel-Träger (n=8) weiterhin eine signifikant stärkere Phosphorylierung von VASP im Vergleich zu homozygoten Risikoallel-Trägern (n=8; $p = 0,02$). Median und Interquartilsabstand, Mann-Whitney-Test. 66
- Abbildung 13: Keine Assoziation des *GUCY1A3*-Genotyps mit der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation** Die Träger der verschiedenen Genotypen von *GUCY1A3* zeigten vergleichbare Werte in der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation. AU, willkürliche Einheit (arbitrary units). Median und Interquartilsabstand, Kruskal-Wallis-Test. 69
- Abbildung 14: Assoziation des *GUCY1A3*-Genotyps mit der Thrombozytenreaktivität unter Aspirintherapie** Homozygote Risikoallel-Träger (GG) zeigten die höchsten Werte in der Arachidonsäure induzierten Thrombozytenaggregation. AU, willkürliche Einheit (arbitrary units). Median und Interquartilsabstand, Kruskal-Wallis-Test. 70
- Abbildung 15: Assoziation zwischen dem *GUCY1A3*-Genotyp und der Thrombozytenreaktivität unter Aspirintherapie** **A.** Homozygote *GUCY1A3*-Risikoallel-Träger (GG, n=1,145) zeigten eine höhere Thrombozytenreaktivität unter Aspirintherapie als Nicht-Risikoallel-Träger (AA/AG, n=533). Median und Interquartilsabstand, Kruskal-Wallis-Test. **B.** In der Gruppe hoher Thrombozytenreaktivität unter Aspirintherapie befanden sich prozentual mehr homozygote Risikoallel-Träger als Nicht-Risikoallel-Träger (AUC > 203 AU·min). AUC, area under the curve. Chi-Quadrat-Test. 71
- Abbildung 16: Der NO/cGMP Signalweg und seine funktionellen Auswirkungen, u.a. auf die Thrombozytenaggregation** In den Genen, welche für die Enzyme eNOS, sGC und PDE5A kodieren, wurde jeweils ein genomweit mit der KHK assoziierter Genlocus entdeckt. eNOS, Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase. sGC, lösliche Guanylylzyklase. PDE5A Phosphodiesterase 5A. GTP, Guanostriphosphat. cGMP, cyclischen Guanostriphosphat. GMP, Guanostriphosphat. PKG, Proteinkinase G. MCLP, Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase. IRAG, IP3-Rezeptor assoziiertes cGMP-Kinase-Substrat. VASP, Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein. Modifiziert nach [92]. 74
- Abbildung 17: Genotyp-abhängige Expression der α_1 -sGC in Thrombozyten** Die Expression der α_1 -sGC war in homozygoten Nicht-Risikoallel-Trägern (n=8) signifikant höher als in homozygoten Risikoallel-Trägern (n=14; $p < 0,001$). Mann-Whitney-Test. Daten mit freundlichem Einverständnis [89] 75
- Abbildung 18: Eine stärkere Expression der α_1 -sGC ist signifikant mit einer stärkeren Hemmung der Thrombozytenaggregation durch den NO-Donor**

- Nitroprussid-Natrium assoziiert** Hierbei zeigen homozygote Risikoallel-Träger eine geringere Expression der α_1 -sGC und eine geringere Hemmung der Thrombozytenaggregation durch NO im Vergleich zu homozygoten Nicht-Risikoallel-Trägern..... 76
- Abbildung 19: Prognose von Transkriptionsfaktoren-Bindungsstellen mittels Alibaba2** Es konnten zwei Bindungsstellen für das Risikoallel G (C/EBP & ICSP) und eine Bindungsstelle für das Nicht-Risikoallel A (MEB-1) gefunden werden. Analyse mittels Alibaba2 [89]. 77
- Abbildung 20: Assoziation des *GUCY1A3*-Genotyps und Tod kardiovaskulärer Genese oder Stentthrombose** Homozygote Risikoallel-Träger (GG) haben ein erhöhtes Risiko für den klinischen Endpunkt des Todes kardiovaskulärer Genese oder Stentthrombose im Vergleich zu Nicht-Risikoallel-Trägern (AA/AG). CI, Konfidenzintervall; SE, Standardfehler (standard error). [100] 80
- Abbildung 21: Assoziation des *GUCY1A3*-Genotyps mit anderen klinischen Endpunkten (innerhalb von 30 Tagen nach Koronarintervention)** Homozygote Risikoallel-Träger zeigten einen Trend zu einem erhöhten Risiko für „Tod jeglicher Ursache oder Stentthrombose“ (**A**), definitiver oder wahrscheinlicher Stentthrombose (**B**), Tod jeglicher Genese (**C**) und Tod jeglicher Genese oder Myokardinfarkt (**D**). CI, Konfidenzintervall; SE, Standardfehler (standard error). [100]..... 80
- Abbildung 22: Assoziation des *GUCY1A3*-Genotyps mit nicht-CABG-assoziierten-Blutungen** Der *GUCY1A3*-Genotyp war nicht mit einem erhöhten Blutungsrisiko innerhalb von 30 Tagen nach Koronarintervention assoziiert. CI, Konfidenzintervall; SE, Standardfehler (standard error). [100] 81
- Abbildung 23: Assoziation des *GUCY1A3*-Genotyps und ausgeprägten nicht-CABG-assoziierten-Blutungen** Der *GUCY1A3*-Genotyp war nicht mit einem erhöhten Risiko assoziiert, innerhalb von 30 Tagen nach Koronarintervention eine ausgeprägte nicht-CABG-assoziierte-Blutung erleiden. CI, Konfidenzintervall; SE, Standardfehler (standard error). [100] 81
- Abbildung 24: Hypothetische Interaktionen des Arachidonsäure-Metabolismus und des NO/cGMP-Signalweges in Thrombozyten** Es konnte bereits gezeigt werden, dass Arachidonsäure direkt die Stickstoffmonoxid-Bioverfügbarkeit in Thrombozyten reduziert, was durch die Inhibition der Cyclooxygenase 1 verhindert werden kann. 83
- Abbildung 25: Hypothetische Interaktionen des Arachidonsäure-Metabolismus und des NO/cGMP-Signalweges in Thrombozyten** Der Einfluss von Metaboliten der Arachidonsäure auf den cGMP/cAMP-Signalweg. Die Verfügbarkeit und Aktivität der sGC wird durch den *GUCY1A3*-Genotyp beeinflusst. 84

I Einleitung

1.1 Die koronare Herzerkrankung – Definition, Pathophysiologie, Klinik und Therapie, Sekundärkomplikationen

Definition und Epidemiologie

Kardiovaskuläre Erkrankungen gehören zu den häufigsten Todesursachen in der westlichen Welt und sind für 45 % der Todesursachen in Europa verantwortlich [1]. Zu ihnen gehören neben dem Befall der hirnersorgenden (zerebrovaskuläre Erkrankungen), den peripheren (periphere arterielle Verschlusskrankheit) und abdominalen Arterien (abdominale arterielle Verschlusskrankheit) vor allem der Befall der Koronararterien (koronare Herzkrankheit).

Die koronare Herzerkrankung ist eine weit verbreitete chronische Erkrankung des Herzens. Hierbei tritt als Folge von atherosklerotischen Veränderungen eine progrediente Verengung der Koronargefäße auf. Diese sogenannten Koronarstenosen können wiederum Durchblutungsstörungen des Herzmuskels verursachen, welche sich in einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und dessen Verfügbarkeit äußern. Diese Ischämie kann vorübergehend unter Belastung auftreten und pektanginöse Beschwerden hervorrufen. Sie kann aber auch, wenn ein Koronargefäß nach Ruptur einer atherosklerotischen Plaque mit konsekutiver Atherothrombose verschlossen ist, zu einem Myokardinfarkt und damit zum irreversiblen Untergang von Kardiomyozyten führen.

Trotz großer Fortschritte in der medikamentösen, interventionellen und chirurgischen Therapie ist die koronare Herzkrankheit mit rund 20% nach wie vor die häufigste Todesursache der europäischen Bevölkerung [2]. Während die Mortalität der Erkrankung in westlichen Industrienationen durch die Fortschritte in der Therapie leicht rückläufig ist [3], hat sie sich in Entwicklungsländern wie Indien in den letzten 30 Jahren nahezu verdoppelt [4].

Pathophysiologie

In den letzten Jahrzehnten hat sich das Verständnis über die Pathophysiologie der Atherosklerose deutlich verändert. Während man die Erkrankung vor einigen Jahren noch als Cholesterin-Speichererkrankung angesehen hat, geht die moderne Wissenschaft heute von einer entzündlichen Genese aus. Diese beruht auf einem

komplexen Zusammenspiel verschiedener Zelltypen des Blutes und der Gefäßwand als Reaktion auf kardiovaskuläre Risikofaktoren. Zu Beginn der Atherogenese bewirken diese in der Arterienwand eine gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen, wodurch vermehrt Leukozyten, insbesondere Monozyten und T-Lymphozyten in die Intima migrieren. Hier kommunizieren die Leukozyten mit glatten Muskelzellen (smooth muscle cells, SMCs) und Endothelzellen und führen so zur gegenseitigen Aktivierung. Dabei spielen inflammatorische und immunologische Mediatoren wie Prostaglandine und Leukotriene eine entscheidende Rolle. Monozyten wandeln sich daraufhin in Makrophagen um, nehmen zunehmend Lipide auf und werden aufgrund ihres mikroskopischen Aussehens fortan als Schaumzellen („foam cells“) bezeichnet. Andere Autakoide wie beispielsweise Histamin regulieren zudem den Tonus der glatten Muskulatur und erhöhen so weiter die Gefäßpermeabilität. Dabei kommt es auch zu einer Migration von SMCs aus der Tunica media in die Intima der Gefäßwand. Das Ergebnis dieses inflammatorischen und immunologischen Geschehens ist die Entstehung eines frühen Atheroms. Im weiteren Verlauf proliferieren die Zellen hier und bilden eine komplexe extrazelluläre Matrix. Zusammen mit Endothelzellen und Monozyten sezernieren sie sogenannte Matrix-Metalloproteasen (MMPs), welche eine Vielzahl an Funktionen der Gefäßzellen regulieren und so den Vorgang weiter verstärken. Einige Bestandteile der extrazellulären Matrix, wie beispielsweise Proteoglykane binden Lipoproteine in der Gefäßintima und führen zu deren Oxidation und Glykation, was die inflammatorische Antwort ebenfalls stimuliert. Im Rahmen der wachsenden Läsion, kommt es dann, ähnlich wie bei der Knochenbildung, zu einer progredienten Kalzifizierung. Durch Bildung extrazellulärer Matrix, Lipidablagerung und progredienter Kalzifizierung, entsteht eine zunehmende Verengung des Gefäßlumens. Parallel zur Proliferation kommt es in der atherosklerotischen Läsion zu einem vermehrten Zelltod. Der Untergang lipidbeladener Makrophagen führt zur extrazellulären Freisetzung der Lipide, welche zusammengefließen den lipidreichen nekrotischen Kern der atherosklerotischen Plaque bilden [5,6]. Je nach Zusammensetzung und geometrischer Konfiguration unterscheidet man stabile von instabilen Plaques. Rupturiert die Plaque nun aufgrund einer Änderung der Plaque-Konfiguration in Kombination mit Scherstress, kommt es zur Exposition des atherosklerotischen Materials gegenüber Blut. Hierdurch werden insbesondere Thrombozyten aktiviert und es kann zur Entstehung eines gefäßverschließenden Thrombus kommen [7].

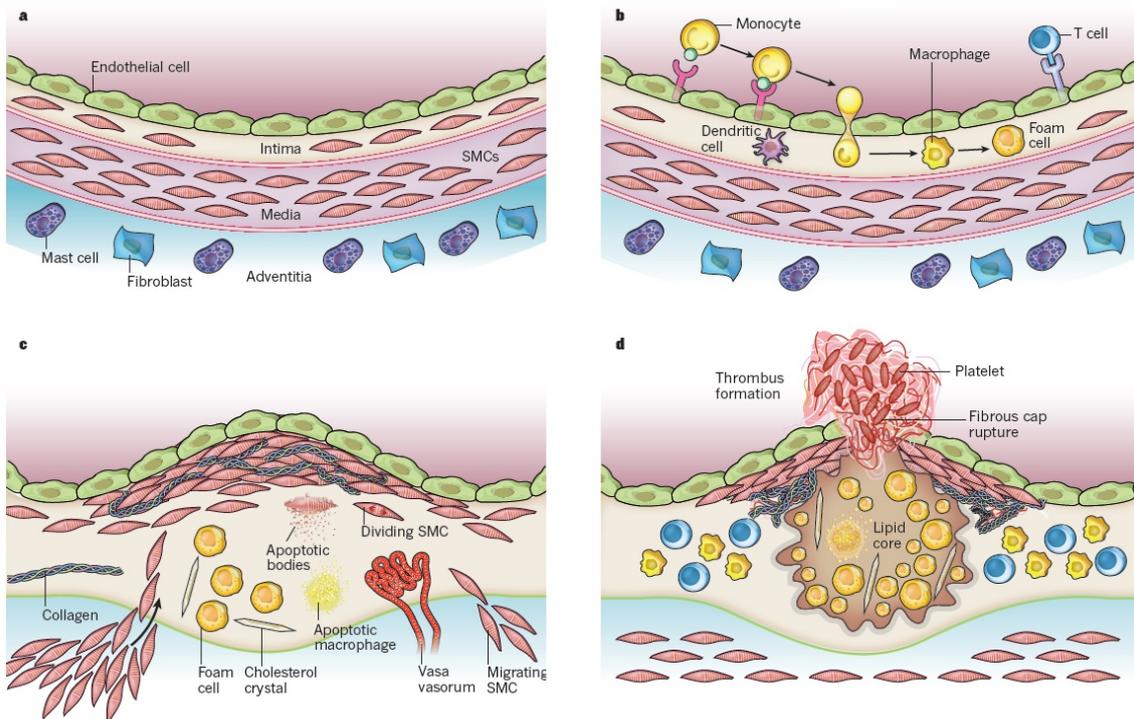


Abbildung 1: Stadien der Atherogenese

Die Abbildung zeigt die normale Konfiguration einer Arterienwand sowie die Veränderungen des Zellbildes bei Fortschreiten der Erkrankung. **a.** Eine typische dreischichtige Arterie: Tunica Intima (Endothelzellschicht), Tunica Media (enthält glatte Muskelzellen, „SMCs“), Tunica Adventitia. **b.** Zu Beginn der Atherogenese kommt es zur Adhäsion und Migration von Leukozyten (insbesondere Monozyten), welche sich in Makrophagen umwandeln, Lipide aufnehmen und fortan Schaumzellen („foam cells“) genannt werden. **c.** Im weiteren Verlauf erfolgt eine Größenprogredienz der Läsion durch die Migration von glatten Muskelzellen und der Produktion extrazellulärer Matrix. Durch Apoptose freigesetzte Lipide akkumulieren und bilden den nekrotischen Lipidkern der Plaque. **d.** Als Hauptkomplikation der Atherosklerose kann beispielsweise durch physischen Stress eine Thrombose entstehen. Auf der Abbildung ist die Ruptur der Fibrinkappe der Plaque zu sehen, wodurch es zu direktem Kontakt von Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten mit den Bestandteilen der Plaque kommt, was die Bildung eines gefäßverschließenden Thrombus ermöglicht. [6] Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: Figure 1 from Nature 2011. 473(7347):317-325 (Libby et al. 2011), copyright © 2011.

Klinik und Therapie

Aufgrund von Stenosen in den Koronargefäßen kommt es bei erhöhtem Sauerstoffverbrauch des Herzmuskels zu einer relativen Unterversorgung des betroffenen Myokards. Diese kann sowohl durch psychische als auch physische Belastung entstehen und führt zu dem typischen Leitsymptom der KHK, der Angina pectoris (AP). Diese äußert sich meist durch ein retrosternales Druckgefühl, häufig mit Ausstrahlung in den linken Arm, den Rücken, den Bauch oder den Kiefer. Man unterscheidet die stabile von der instabilen Angina pectoris. Die stabile Angina pectoris

bildet sich definitionsgemäß nach Beendigung der Belastung wieder vollständig zurück. Da der Herzmuskel in diesem Fall nur bei erhöhtem Sauerstoffverbrauch unterversorgt ist, spricht man auch von einem relativen Sauerstoffmangel. Die instabile Angina pectoris hingegen tritt belastungsunabhängig auch in Ruhe auf und zeichnet sich durch einen inkonstanten Verlauf aus. Sie kann Vorbote oder aber auch schon Symptom eines akuten Myokardinfarkts sein und sollte daher zeitnah abgeklärt werden. Es handelt sich hierbei um einen absoluten Sauerstoffmangel, welcher auch in Ruhe nicht kompensiert werden kann. Zusätzlich können beim akuten Myokardinfarkt vegetative Symptome wie Kaltschweißigkeit, Übelkeit und Erbrechen auftreten.

Die Therapie der koronaren Herzkrankheit baut auf der medikamentösen Therapie sowie den interventionellen und chirurgischen Verfahren auf. Während letztere immer effektiver darin werden, bereits verengte oder verschlossene Koronargefäße zu dilatieren, wieder zu eröffnen oder zu umgehen, versucht man durch die medikamentöse Therapie unterstützend den Prozess der Atherosklerose aufzuhalten sowie Myokardschäden und -umstrukturierung zu minimieren. Hierbei spielen thrombozytenhemmende Medikamente eine herausragende Rolle. Aber auch Plaque stabilisierende Medikamente und Medikamente, welche den myokardialen Stoffwechsel modulieren werden KHK-Patienten standardmäßig verschrieben. Hierzu gehören:

- Acetylsalicylsäure: Sie hemmt die Cyclooxygenase in Thrombozyten und senkt dadurch deren Aggregationsbereitschaft, wodurch die Mortalität nach einem Herzinfarkt deutlich sinkt.
- P2Y₁₂-Rezeptorantagonisten: ADP, welches aus Thrombozytengranula oder von verletzten Zellen freigesetzt wird, bindet unter anderem an den P2Y₁₂-Rezeptor der Thrombozytenoberfläche und aktiviert so die Thrombozytenaggregation. Aktive Metaboliten eines Thienopyridins (z.B. Ticlopidin, Clopidogrel und Prasugrel) binden kovalent an den P2Y₁₂-Rezeptor und sind somit irreversible indirekte Hemmer der Plättchenaggregation. Andere, direkt wirkende P2Y₁₂-Rezeptorantagonisten wie Ticagrelor, Cangrelor und Elinogrel verändern dagegen die Konformation des P2Y₁₂-Rezeptors, was eine reversible, konzentrationsabhängige Hemmung zur Folge hat.
- Betablocker: Sie hemmen die Bindung adrenerger Substanzen an die Betarezeptoren des Herzens. Hierdurch sinken Myokardkontraktilität und Herzfrequenz, was den myokardialen Sauerstoffverbrauch und somit auch die Sauerstoffunterversorgung vermindert.
- Nitrate: Stickstoffmonoxid wird physiologisch von Gefäßendothelzellen freigesetzt und führt zu einer Relaxation der glatten Muskulatur, sowie zur Hemmung der

Thrombozytenaggregation. Es besteht die Möglichkeit NO über organische Nitrats oder Molsidomin dem Körper zuzuführen.

- Kalziumantagonisten: Sie blockieren die L-Typ Kalziumkanäle, was die Kalziumkonzentration in der Zelle erniedrigt. Dies führt zu einer Dilatation epikardialer Gefäße sowie zur Senkung der kardialen Kontraktilität und der Herzfrequenz. Somit kommt es zu einer besseren Blutversorgung und zu einem niedrigeren Sauerstoffverbrauch des Myokards.
- Plaque-Stabilisierung: Die Plaqueruptur und der damit verbundene thrombotische Verschluss von Koronararterien sind für etwa drei Viertel der akuten Myokardinfarkte verantwortlich [8]. Die für eine Ruptur prädisponierten atherosklerotischen Plaques sind mit einer dünnen Fibrinkappe und großem Lipidkern konfiguriert. Ein Ziel der medikamentösen Therapie ist es diese sogenannten vulnerablen Plaques zu stabilisieren. Neben antiinflammatorischen Ansätzen gibt es zahlreiche Hinweise auf einen positiven Effekt durch die Senkung des LDL-Spiegels durch HMG-CoA-Reduktasehemmer (Statine). Zudem gibt es Hinweise auf eine Plaque-stabilisierende Wirkung von Thrombozytenhemmern, Betablockern und Hemmern des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems [9].

Die moderne Kardiologie fokussiert sich auf die Entwicklung neuer Techniken, die den Blutfluss in Arterien mit hämodynamisch relevanten Stenosen wiederherstellen. Als Reaktion auf eine bereits vorhandene Unterversorgung des Herzmuskels oder einen akuten Myokardinfarkt haben diese Strategien jedoch nur einen sekundärprophylaktischen Effekt. Auch Medikamente wie Aspirin und Statine, welche nachgewiesenermaßen das Risiko für künftige Ereignisse senken, werden aktuell nur bei Patienten mit bekannter koronarer Herzkrankheit oder stark ausgeprägtem Risikoprofil empfohlen [7].

Sekundärkomplikationen

Die Behandlung mit Aspirin als Teil der dualen Plättchenhemmung in Kombination mit einem P2Y₁₂-Rezeptorantagonisten wie Clopidogrel, Prasugrel oder Ticagrelor ist essentieller Bestandteil der medikamentösen Therapie nach einer Koronarintervention (PCI), um die Wahrscheinlichkeit von ischämischen Ereignissen, insbesondere von Stentthrombosen zu reduzieren. In klinischen Studien beobachtet man jedoch weiterhin bei etwa 1,4 % der Koronarinterventionen eine Stentthrombose [10].

In der Vergangenheit hat sich bereits eine hohe interindividuelle Variabilität im Ansprechen auf P2Y₁₂-Rezeptorantagonisten gezeigt [11,12], so dass durch weitere Untersuchungen die Korrelation zwischen einer erhöhten Plättchenreaktivität unter

Clopidogreltherapie (high on-clopidogrel treatment platelet reactivity - HCPR) und einem schlechteren klinischen Ergebnis in Form von Tod oder Stentthrombose bereits etabliert werden konnte [13]. Clopidogrel wird seit Jahren zusammen mit Aspirin nach Koronarinterventionen eingesetzt. Es wird durch Cytochrom P450 2C19 bioaktiviert, welches wiederum vom *CYP2C19*-Gen kodiert wird. Interindividuelle Polymorphismen im *CYP2C19*-Gen sind die Ursache für das Vorkommen sogenannter „Poor Metabolizer“ mit verminderter Aktivierung des Prodrugs Clopidogrel [14]. Im Anschluss an eine Koronarintervention zeigen diese Varianten eine verminderte Thrombozytenhemmung und haben eine höhere Wahrscheinlichkeit ein ischämisches Ereignis, wie beispielsweise eine Stentthrombose, zu erleiden [15].

In der ISAR-ASPI-Studie konnte mittels Arachidonsäure-induzierter Aggregometrie gezeigt werden, dass eine hohe Thrombozytenreaktivität unter Aspirintherapie ebenfalls mit ischämischen Ereignissen wie beispielsweise Stentthrombosen assoziiert ist [16]. In Bezug auf die Hintergründe dieser „Aspirinresistenz“ standen bisher vor allem die Dosierung und die Dosierungsintervalle im Vordergrund, während genetische Ursachen bisher unbekannt blieben (zum Überblick siehe [17]). Im Rahmen der ISAR-ASPI Studie erfolgte die Blutentnahme nach der intravenösen Gabe von 500 mg Acetylsalicylsäure sowie einem ADP-Antagonisten vor der Koronarintervention. Die Plättchenreaktivität wurde durch ADP- sowie Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregometrie gemessen. Quantifiziert wurde die Plättchenreaktivität mit Hilfe eines Multiplate Analyzers (Roche Diagnostics, Schweiz). Hierbei handelt es sich um ein standardisiertes Testverfahren, welches mittels elektrischer Impedanz-Messung den Grad der Aggregation berechnet. Arachidonsäure wird in Thrombozyten von der Cyclooxygenase in Prostaglandin H_2 und anschließend von der Thromboxan-Synthase in Thromboxan A_2 (TXA₂) umgewandelt. Thromboxan A_2 ist ein potenter Agonist der Thrombozytenaggregation und führt über die Freisetzung der Granula zu einer weiteren TXA₂-Produktion und zu einer anhaltenden GpIIb-IIIa Aktivierung. Durch die Gabe von Acetylsalicylsäure wird die Cyclooxygenase I irreversibel durch Anlagerung eines Acetylrests gehemmt, was zu einer Blockade des oben genannten Signalwegs führt und die Thrombozytenaggregation bzw. Plättchenreaktivität reduziert. In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir homozygote Risikoallel-Träger der *GUCY1A3*-Variante rs7692387 auf eine veränderte Thrombozyten-Reaktivität unter Aspirintherapie, auch in Bezug auf ein schlechteres klinisches Outcome nach einer Koronarintervention.

1.2 Risikofaktoren der koronaren Herzerkrankung

Ausgehend von den Ergebnissen der Framingham-Studie wurden seit 1948 die klassischen Risikofaktoren für die koronare Herzkrankheit identifiziert [18]. Hierbei unterscheidet man zwischen beeinflussbaren und nicht beeinflussbaren Risikofaktoren. Zu den beeinflussbaren Risikofaktoren zählen Hypercholesterinämie, arterielle Hypertonie, Nikotinabusus und Diabetes mellitus. Weitere Risikofaktoren wie Bewegungsmangel, Adipositas und Stress wirken nur indirekt über negative Auswirkungen auf die zuvor genannten Risikofaktoren. Zu den nicht beeinflussbaren Risikofaktoren zählen Alter, männliches Geschlecht sowie die familiäre Disposition. [19-21]

Von den auf epidemiologischen Studien basierenden klassischen Risikofaktoren lassen sich als Ergebnis aktueller Forschung neue Risikofaktoren abgrenzen. Hierzu zählen spezielle Lipidstoffwechselstörungen (Hypertriglyzeridämie, spezifische LDL-Morphologie, Lipoprotein(a)-Erhöhung, Apolipoproteine-A-I- und B100-Varianten), Gerinnungsstörungen (u.a. erhöhte prothrombotische Aktivität, verminderte Fibrinolyse, hoher Fibrinogenspiegel, niedriger Antithrombinspiegel), Insulinresistenz, Hyperinsulinämie, Glukosetoleranz, ausgeprägter Alkoholkonsum, Hyperhomocysteinämie sowie eine Erhöhung des C-reaktiven Proteins. [22-33]

1.3 Genetische Risikofaktoren

Zwillings- und Familienstudien konnten einen signifikanten Anteil (40-50%) der Erkrankungsfälle auf Vererbung zurückführen [19,34,35]. Da unterschiedliche Genotypen in der Regel nicht von anderen Risiko- und Umweltfaktoren beeinflusst werden, bieten genetische Analysen die Möglichkeit, kausale Risikofaktoren und damit therapeutische Ansätze aufzufindig zu machen [36,37].

Während die Suche nach genetischen Risikofaktoren zunächst bis auf wenige Ausnahmen, wie den LDL-Rezeptor, keine Erfolge verzeichnen konnte, konnten in den letzten Jahren durch genomweite Assoziationsstudien (*Genome-Wide Association Studies*, GWAS) eine Vielzahl von genetischen Varianten identifiziert werden, die mit hoher statistischer Wahrscheinlichkeit mit der KHK assoziiert sind (zum Überblick siehe [38,39]). Interessanterweise ist nur ca. ein Drittel dieser Loci mit traditionellen Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie oder arterieller Hypertonie assoziiert [38]. Insgesamt geht man davon aus, dass durch alle bisher identifizierten Varianten, unter

Einschluss von Varianten mit geringerer statistischer Assoziation, etwa 20 % der genetischen Disposition der KHK erklärt werden können [40].

In der vorliegenden Arbeit wurde einer dieser Loci in Bezug auf die Thrombozytenaggregation untersucht. Der SNP rs7692387 befindet sich im *GUCY1A3*-Gen auf Chromosom 4, das für die α_1 -Untereinheit der löslichen Guanylatzyklase (sGC) kodiert [41].

1.4 Thrombozyten

1.4.1 Definition und Eigenschaften

Thrombozyten oder Blutplättchen wurden zum ersten Mal 1865 von Max Schultze (1825-1874) als Bestandteil des Blutes beschrieben. Giulio Bizzozero (1846-1901) erkannte bei weiteren Nachforschungen bereits 1882 ihre herausragende Rolle bei der Blutstillung. Er stellte fest, dass sie sich als erste Blutbestandteile an einer verletzten Gefäßwand anlagern [42]. Thrombozyten (*Platelets*), deren Hauptaufgabe der schnelle Verschluss von Blutgefäßen ist, sind diskoide Zellfragmente mit einem Durchmesser von 2-3 μm . In jedem Mikroliter Blut befinden sich etwa 150.000 – 300.000 Thrombozyten. Ihren Ursprung haben sie im Knochenmark, wo sie von Megakaryozyten abgeschnürt werden und so ins Blut gelangen. Einmal abgeschnürt überleben die Thrombozyten ca. 8-10 Tage und werden schließlich vom retikuloendothelialen System der Leber und Milz abgebaut [43]. Als anukleäre Zellen besitzen sie keine genomische DNA. Sie enthalten jedoch messenger-RNA (mRNA) der Megakaryozyten sowie die für die Proteinbiosynthese nötige Translationsmaschinerie. Auch das Splicing von Prä-mRNA, das normalerweise im Zellkern stattfindet, konnte im Thrombozytenplasma nachgewiesen werden [44]. Da Thrombozyten auch Mitochondrien besitzen, sind sie in der Lage Glucose und Fettsäuren abzubauen und sind somit sehr effizient in der ATP-Synthese. Außerdem besitzen sie zahlreiche Vesikel, u.a. α - und δ -Granula, deren Inhalt in Tabelle 2 aufgeführt ist.

Tabelle 2: Bestandteile der α - und δ -Granula in Thrombozyten

α-Granula	δ-Granula
vWF (von Willebrand Faktor)	Adenosintriphosphat (ADP)
Gerinnungsfaktor VIII	Serotonin
Gerinnungsfaktor V	Ca ²⁺ -Ionen
Fibrinogen (= Gerinnungsfaktor I)	
Fibronektin	
versch. Wachstumsfaktoren u.a. Platelet-derived Growth Factor (PDGF)	

Unabhängig von den Granula werden die Stoffe Thromboxan A₂ (TXA₂) und der Plättchenaktivierende Faktor (PAF) sezerniert. Hierbei bewirkt Thromboxan A₂ zum einen die Aktivierung weiterer Thrombozyten, zum anderen eine Vasokonstriktion der Gefäße. Das Protein wird von dem Enzym Cyklooxygenase gebildet, welches durch die Einnahme von Acetylsalicylsäure irreversibel gehemmt wird.

1.4.2 Thrombozytenaktivierung und -hemmung

Um Defekte im Gefäßendothel detektieren zu können, exponieren Thrombozyten eine Reihe von Rezeptorproteinen in ihrer Plasmamembran. Diese Proteine binden an Komponenten der extrazellulären Matrix wie beispielsweise Kollagen, welche bei Beschädigung der Gefäßwand exponiert werden. Freigelegtes Kollagen wird sofort vom von-Willebrand-Faktor (vWF) gebunden und so für die Thrombozyten markiert. Der vWF wirkt hierbei als Adaptermolekül zwischen exponiertem Kollagen und dem Thrombozyten-Oberflächenrezeptor GP Ib. Bei der Bindung des Rezeptors an den vWF werden die Thrombozyten am Kollagen verankert und gleichzeitig aktiviert [45,46]. Im nicht aktivierten Zustand weisen Thrombozyten eine typische diskoide Form auf. Nach Aktivierung durch lösliche Agonisten oder bei Adhäsion an den vWF kommt es dann zu einer Formveränderung („shape change“). Die Thrombozyten werden kugelförmig, bilden kleine Fortsätze (Lamellipodien) aus und vergrößern ihre Oberfläche so auf bis zu 18 μm^2 [47]. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Konformationsänderung des Oberflächen-Glykoproteins GP IIb/IIIa, welches dadurch in seinen aktiven Zustand versetzt wird und dabei seine Affinität zum vWF und zu Fibronektin erhöht. Da Fibronektin ebenfalls in subendothelialen Schichten vorkommt, können die Thrombozyten nun auch vWF-unabhängig an geschädigte Stellen der Gefäßwände

binden. Lösliches Fibronectin ermöglicht außerdem die Quervernetzung und Stabilisierung des wachsenden Thrombus. GPIIb/IIIa bindet auch Fibrinogen und Fibrin, was ebenfalls zur Quervernetzung beiträgt und die Thrombozyten in das entstehende Fibrinnetzwerk einbindet. Nun werden auch die Inhaltsstoffe der α - und δ -Granula durch Fusion mit der Zellmembran freigesetzt und es kommt zur Sekretion von TXA_2 und des Plättchenaktivierenden Faktors (PAF). Durch die Ausschüttung von sekundären Botenstoffen wie ADP oder Thromboxan A_2 werden G-Protein gekoppelte Rezeptoren auf der Oberfläche der Thrombozyten aktiviert, was den Aggregationsvorgang zusätzlich verstärkt [48,49].

Um eine ungewollte Aktivierung der Thrombozytenaggregation zu verhindern, werden von den Zellen des Gefäßendothels ständig Antagonisten freigesetzt. Stoffe wie Prostaglandine, Prostacycline, Ektonukleotidasen und Stickstoffmonoxid (NO) hemmen auf unterschiedliche Art und Weise die Aktivierung von Thrombozyten. Durch diese Antagonisten werden die Guanylatcyclase und die Adenylatcyclase aktiviert, was wiederum den Anstieg der *second messenger* cGMP und cAMP zur Folge hat. Diese zyklischen Nukleotide aktivieren dann die entsprechenden Proteinkinasen. Die vorliegende Arbeit fokussiert auf das von Gefäßendothelzellen freigesetzte NO, welches in die Thrombozyten diffundiert und hier zu einer Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase führt. Diese wiederum bewirkt eine Erhöhung des cGMP-Spiegels, wodurch die Proteinkinase G aktiviert wird. Die Details des NO/cGMP-Signalweges werden in Kapitel 1.4.2 dargestellt. Durch die Phosphorylierung zahlreicher Proteine durch Proteinkinasen werden Thrombozytenfunktionen wie Adhäsion [48], Fibrinogenbindung [49], Aggregation [50], Sekretion und Formveränderung [50] gehemmt. Die zyklischen Nukleotide cGMP und cAMP werden durch Phosphodiesterasen (PDE) abgebaut. In Thrombozyten konnten bislang die Phosphodiesterasen PDE 2,3 und 5 nachgewiesen werden [50].

1.4.3 Rolle beim Myokardinfarkt und der Atherosklerose

Autopsiestudien aus den 70ern bis in die 90er Jahre konnten zeigen, dass bei letalen Herzinfarkten meist eine komplette Ruptur der Fibrinkappe einer atherosklerotischen Plaque vorliegt [8,51]. Mechanismen wie oberflächliche Erosionen, Plaqueeinblutungen oder Erosion kalzifizierter Knoten spielen hingegen nur eine untergeordnete Rolle [52]. Praktisch alle Koronarthrombosen sind somit auf die Zerstörung einer atherosklerotischen Plaque zurückzuführen. Eine rupturierte Plaque führt über verschiedene Wege zu einer Thrombusbildung. Auf der einen Seite löst der Kontakt mit Kollagen aus der extrazellulären Matrix der Plaque eine Thrombozytenaggregation aus.

Auf der anderen Seite aktiviert der von Makrophagen und glatten Muskelzellen produzierte Gewebefaktor die Gerinnungskaskade [53]. Da auch die Thrombinbildung die Aktivierung von Thrombozyten bewirkt, werden die beiden Systeme der Blutstillung also zugleich stimuliert und verstärken sich zusätzlich gegenseitig. Die Konversion von Fibrinogen zu Fibrin und die Freisetzung des Von-Willebrand-Faktors von aktivierten Thrombozyten unterstützt die Bildung einer dreidimensionalen Netzstruktur aus Thrombozyten und Fibrin.

Neben ihrer Funktion bei der Hämostase und Thrombusbildung, wurden in den letzten Jahren zunehmend auch immunologische Funktionen von Thrombozyten bekannt [54,55]. Mittlerweile werden sie als essentielle Faktoren bei entzündlichen Prozessen wie Atherosklerose, Allergien, rheumatoider Arthritis und bei Krebs angesehen [56]. Hierfür exprimieren Thrombozyten eine Vielzahl von Rezeptoren, um mit Monozyten [57,58], neutrophilen Granulozyten [59,60], dendritischen Zellen [61,62], T-Zellen [63] und auch mit Lipoproteinen [64] zu interagieren. So zeigten Thrombozyten von Patienten mit Hypercholesterinämie eine erhöhte Aggregationsbereitschaft [65,66]. Thrombozyten vermitteln somit zwischen Entzündung, Thrombusbildung und Atherosklerose. Ihr Repertoire reicht von der Rekrutierung von Leukozyten bis hin zur direkten Abwehr bakterieller Pathogene. Nach Aktivierung setzen sie eine Reihe von Zytokinen, Chemokinen und antibakteriellen Proteinen frei und exprimieren gleichzeitig eine Vielzahl immunrelevanter Rezeptoren. Thrombozyten sind somit Zellen, die entzündliche Vorgänge detektieren und anschließend proinflammatorische Mediatoren freisetzen. Diese verstärken das entzündliche Umfeld indem sie weitere inflammatorische Zelltypen rekrutieren und deren inflammatorische Antwort potenzieren [56].

1.5 Risikogen *GUCY1A3*

1.5.1 Mutationen in *GUCY1A3* und deren Einfluss auf die KHK

In einer Vorarbeit unserer Arbeitsgruppe [67] konnte mittels Exom-Sequenzierung in einer Familie mit hoher Prävalenz frühzeitiger Myokardinfarkte bzw. schwerer Fälle von koronarer Herzkrankheit (KHK) eine deletäre, digenische Mutation identifiziert werden. Bei einem dieser Gene handelt es sich um das *GUCY1A3*-Gen, bei dem anderen um das *CCT7*-Gen, das für ein assoziiertes Chaperon Protein (*CCT7*) kodiert. Diese Mutationen haben eine reduzierte Menge an α - und β -Untereinheit der sGC und einen reduzierten cGMP-Gehalt der Thrombozyten zur Folge. In Mäusen, welche die alpha-Untereinheit der sGC nicht exprimieren, konnte man zudem die schnellere Bildung eines

gefäßverschließenden Thrombus im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen zeigen. Diese Resultate weisen auf eine wichtige Rolle der sGC im Rahmen der Thrombozytenaggregation hin, so dass Mutationsträger frühzeitig eine Atherothrombose erleiden könnten. Der Einfluss der sGC auf die Atherosklerose als eher chronischen Prozess sowie speziell die zelluläre Konsequenz der häufigen Varianten, die in genomweiten Assoziationsstudien mit der KHK assoziiert wurden, waren jedoch bisher unklar, zumal für *GUCY1A3* auch eine Assoziation mit arterieller Hypertonie gezeigt werden konnte [68].

1.5.2 Häufige Variante in *GUCY1A3* und deren Einfluss auf die KHK

Bei dem SNP rs7692387 handelt es sich um eine häufige Variante des *GUCY1A3*-Gens, welche mit hoher Signifikanz ($p = 2,65 \times 10^{-11}$) mit koronarer Herzkrankheit und Herzinfarkt assoziiert ist [41]. Interessanterweise sind über 60 % der europäischen Bevölkerung homozygote Risikoallel-Träger, während nur ca. 4 % homozygot für das Nicht-Risikoallel sind.

Tabelle 3: Verteilung der Variante rs7692387 des *GUCY1A3*-Gens in der europäischen Bevölkerung

A. Allelfrequenz **B.** Verteilung der Genotypen (Quelle: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

A			B			
Allel	A	G	Genotyp	A/A	A/G	G/G
Prävalenz	0,196	0,804	Prävalenz	0,036	0,321	0,643

1.6 Die lösliche Guanylatzyklase

Guanylatzyklasen kommen in den meisten Geweben von Säugetieren vor. Hierbei kann man zwischen löslichen, d.h. zytosolischen und nichtlöslichen, membrangebundenen Guanylatzyklasen unterscheiden. Membrangebundene Guanylatzyklasen steigern ihre Aktivität vornehmlich bei Anwesenheit der natriuretischen Peptide Atriales Natriuretisches Peptid (ANP) und Brain Natriuretic Peptide (BNP), welche von Herzmuskelzellen bei erhöhter Vorlast ausgeschüttet werden. An der Niere führen sie zu einer gesteigerten Diurese, während sie an den Gefäßmuskelzellen eine vermehrte Vasodilatation bewirken. Die lösliche Guanylatzyklase wird wiederum von Stickstoffmonoxid (NO) aktiviert [69].

Die lösliche Guanylatzyklase (sGC) ist ein heterodimeres Häm-Protein, welches aus den beiden homologen Untereinheiten α und β besteht. Neben der häufigsten Isoform α_1/β_1 konnten auch die Isoformen α_2 und β_2 identifiziert werden. Während die Isoformen α_1 und β_1 in den meisten Geweben von Säugetieren vorkommen, findet man die Untereinheiten α_2 hauptsächlich in Gehirn, Lunge, Dickdarm, Herz, Milz, Uterus und Plazenta. Die β_2 Untereinheit konnte dagegen bisher nur in der Niere nachgewiesen werden. Die Isoformen α_1/β_1 und α_2/β_1 besitzen sehr ähnliche biochemische Eigenschaften, unterscheiden sich jedoch in ihrer Lokalisation und daher auch in ihrer Funktion. Während die α_1/β_1 Isoform im Zytosol der Zelle vorkommt, findet man die α_2/β_1 Isoform in vielen Geweben membrangebunden. Untersuchungen der β_2 Isoform zeigten, dass sie mit den Untereinheiten α_1 und α_2 einen inaktiven Komplex bildet, in Abwesenheit einer α -Untereinheit jedoch möglicherweise ein aktives Homodimer bildet [70].

1.6.1 Der NO/cGMP-Signalweg

Die sGC spielt u. a. eine entscheidende Rolle im NO/cGMP-Signalweg. Die genauen Abläufe dieses Signalweges wurden in den 1980er Jahren entschlüsselt. Doch bereits 100 Jahre zuvor hatte man damit begonnen, ihn medikamentös zu modulieren, ohne den genauen Wirkmechanismus zu kennen. Mit der klinischen Anwendung von organischen Nitriten (Isoamylnitrit) [71] und Nitraten (Glycerintrinitrat) [72] gegen die Beschwerden der Angina pectoris stimulierte man unwissentlich die cGMP Produktion. Diese führt über die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur zu einer Vasodilatation der venösen Kapazitätsgefäße, deren Weitstellung („venöses Pooling“) die Vorlast des Herzens vermindert. Das diastolische Füllungsvolumen nimmt ab, die Wandspannung wird reduziert und der Sauerstoffverbrauch sinkt. Dadurch linderte man erfolgreich die Symptomatik dieser Erkrankung. Viele Jahre wurde daraufhin nach dem Zusammenhang zwischen den Molekülen und ihrer Wirkung gesucht, bis man bei den Forschungen auf die herausragende Rolle des Stickstoffmonoxids als Signalmolekül stieß.

Das zweiatomige NO-Molekül wird von sogenannten Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) aus der Aminosäure L-Arginin gebildet [73]. Beim Menschen spielt vor allem die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) eine entscheidende Rolle. Sie ist in den Gefäßendothelzellen lokalisiert und bildet bei Anwesenheit eines Calcium/Calmodulin-Komplexes, beispielsweise aufgrund einer erhöhten Schubspannung an der Gefäßwand, vermehrt NO [74]. Dieses dient nach rascher Diffusion durch die Zellmembranen in die Gefäßmuskelzellen als Hauptaktivator der löslichen Guanylatzyklase. NO bindet an den Häm-Cofaktor der sGC und bildet mit ihm

einen stabilen Komplex. Diese Bindung bewirkt eine signifikante Erhöhung des cyclischen Guanosinmonophosphat (cGMP)-Spiegels der Zelle [75].

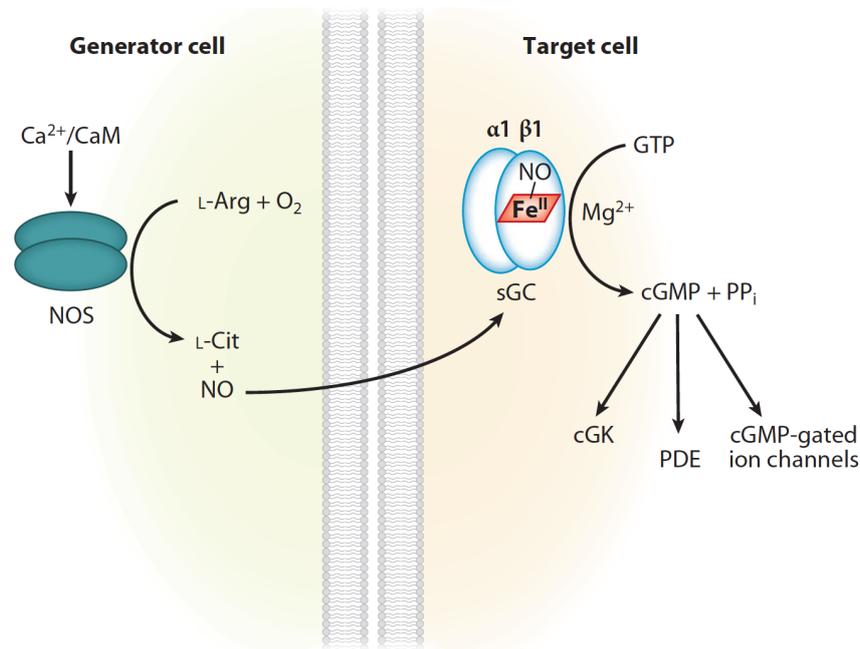


Abbildung 2: Der NO/cGMP-Signalweg

Ein Ca²⁺/Calmodulin-(CaM)-Komplex bindet an die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS). NOS katalysiert die Oxidation von L-Arginin (L-Arg) zu L-Citrullin (L-Cit) und Stickstoffmonoxid (NO). NO bindet nach Diffusion an das Fe^{II}-Häm der β1-Untereinheit der löslichen Guanylatzyklase (sGC). Diese Bindung führt zu einer signifikanten Steigerung von cGMP und Pyrophosphat (PP_i). cGMP bindet und aktiviert anschließend cGMP abhängige Proteinkinasen (cGKs), Phosphodiesterasen (PDE5) und Ionenkanäle [75]. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von Annual Reviews: Figure 1 from Annual review of biochemistry 2012. 81, 533–559 (Derbyshire, Marletta 2012), copyright © 2012.

cGMP besitzt als *second messenger* eine ganze Reihe von Zielproteinen. Neben Phosphodiesterasen (PDEs) und Ionenkanälen bindet es an die cGMP-abhängige Proteinkinase (Proteinkinase G, PKG). Diese spielt bei der Regulation physiologischer Prozesse wie Vasodilatation [76], Plättchenaggregation [77] und Neurotransmission [78] eine wichtige Rolle.

1.6.2 Funktion der sGC in glatten Gefäßmuskelzellen und Thrombozyten

Die Proteinkinase G (PKG) ist eine Serin/Threonin-spezifische Proteinkinase, welche durch cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) aktiviert wird. Ein Zielprotein ist hierbei die Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP), die von der Isoform Iα der PKG phosphoryliert wird. Dieses Enzym kommt in den Zellen der glatten Muskulatur vor und

wird durch die Phosphorylierung aktiviert. Die MLCP selbst dephosphoryliert wiederum die regulatorische leichte Kette des Myosins, was zu einer Relaxation der glatten Muskulatur und zur Vasodilatation führt. Von der Isoform I β der Proteinkinase G wird zudem das IP₃-Rezeptor-assoziierte cGKI β -Substrat (IRAG) phosphoryliert. Dies führt zu einer Hemmung der intrazellulären Ca²⁺-Freisetzung, was ebenfalls eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur bewirkt. Auch ist IRAG zu einem gewissen Maße an der antithrombozytären Wirkung von NO beteiligt [79]. Ein weiteres Zielprotein der Proteinkinase G ist das Vasodilator-stimulierte Phosphoprotein (VASP) [80] und wird sowohl von der I α - als auch von der I β -Isoform phosphoryliert: Dieses 379 Aminosäuren lange, Aktin-bindende Protein kommt in besonders hohen Konzentrationen in Thrombozyten vor. Es kann an drei Stellen phosphoryliert werden (Ser157, Ser239 und Thr278) und wird dann als Phospho-VASP (P-VASP) bezeichnet. Die Phosphorylierung der Proteinkinase G erfolgt hierbei an Ser239. Einige Arbeiten erhärten die Annahme, dass VASP die Aktivierung der Blutplättchen sowie die Aggregation und Vernetzung des Adhäsionsmoleküls Glykoprotein IIb-IIIa hemmt. Diese Effekte werden durch die Phosphorylierung von VASP verstärkt [49,81].

Zusammengefasst bewirkt das vom Gefäßendothel gebildete Stickoxid (NO) also indirekt über eine Konzentrationserhöhung von cGMP in den Gefäßmuskelzellen eine Vasodilatation sowie eine Hemmung der Thrombozytenaggregation [75].

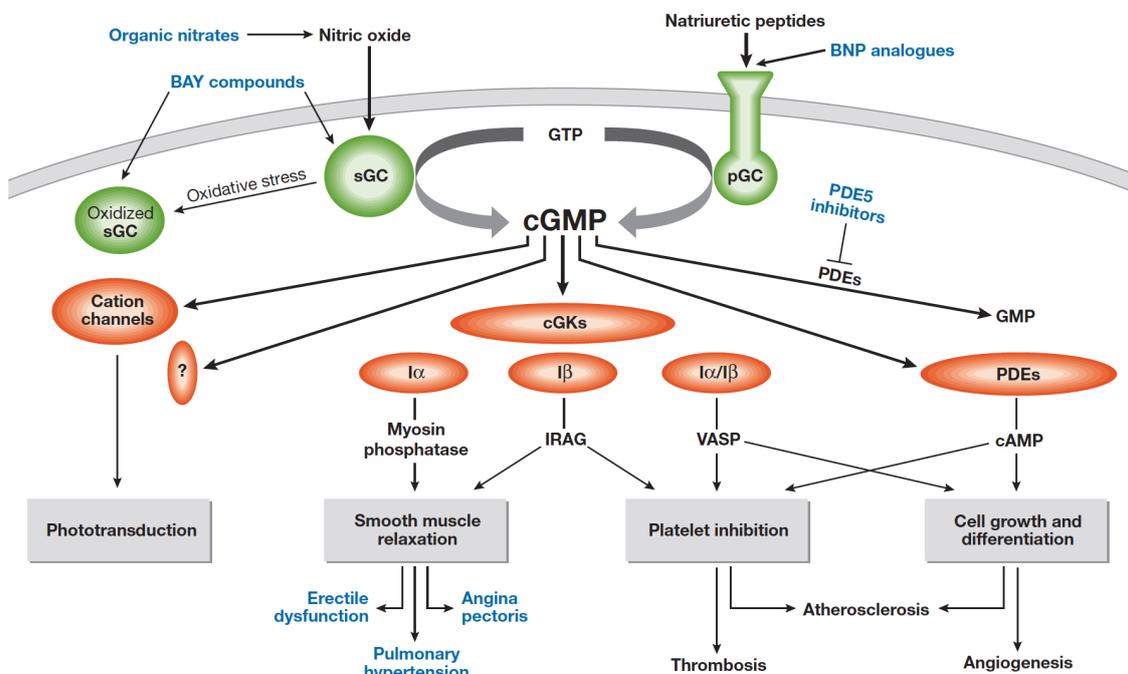


Abbildung 3: Konzept des cGMP-Signalweges

Die Grafik zeigt cGMP-Bildner (grün) und Effektoren (rot) sowie weiterführende Signalwege und Zellfunktionen (grau), welche eine Rolle für den Effekt von endogenem cGMP und/oder cGMP-erhöhenden Medikamenten (blau) spielen. Der untere Teil zeigt einige aktuelle (blau) sowie

potentiell zukünftige (schwarz) Indikationen für eine cGMP-Spiegel oder cGMP-abhängige Proteinkinasen modulierende Medikation. BNP, natriuretisches Peptid Typ B; cGKs, cGMP-abhängige Proteinkinasen; IRAG, IP3 Rezeptor-assoziiertes cGKI β -Substrat; PDEs, Phosphodiesterasen; pGC, (Plasma) membrangebundene Guanilatzyklase; sGC, lösliche Guanilatzyklase; VASP, Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein. [82] Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons: Figure 1 from Conference on cGMP generators, effectors and therapeutic implications 2006. Band 7, 149-153 (Feil R, Kemp-Harper B 2006), copyright © 2016.

1.7 Fragestellung

Zielsetzung der Arbeit war es, die funktionellen Mechanismen, die der genomweiten Assoziation der häufigen Variante des *GUCY1A3*-Gens rs7602387 mit der koronaren Herzkrankheit bzw. Myokardinfarkten zugrunde liegen, zu untersuchen. Hierzu sollten Genotyp-spezifische Unterschiede von der Genexpression bis hin zu funktionellen Auswirkungen auf Zellebene analysiert werden. Mögliche Genotyp-abhängige Effekte in der Genregulation sollten durch eine Expressionsanalyse des *GUCY1A3*-Gens dargestellt werden. Funktionelle Effekte sollten wiederum mittels ADP-induzierter Thrombozytenaggregometrie anhand von Genotyp-abhängigen Unterschieden in der NO- bzw. Sildenafil-vermittelten Thrombozytenhemmung abgebildet werden. Um die Beteiligung und Aktivierung des NO/cGMP-Signalweges darzustellen, sollten letztlich Thrombozytenisolate auf den Grad der Phosphorylierung des Effektorproteins VASP untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollen zu einem besseren Verständnis der Pathophysiologie des KHK-Risikogens *GUCY1A3* beitragen und eine Grundlage für zukünftige Therapieoptionen im Sinne einer personalisierten Systemmedizin bieten.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit sollte anhand von Aggregationsdaten aus dem ISAR-ASPI Register und durch Genotypisierung des Kollektivs eine mögliche Assoziation des *GUCY1A3*-Genotyps mit der Thrombozytenreaktivität unter Aspirin-Therapie sowie der Wahrscheinlichkeit einer Stentthrombose nach Koronarintervention untersucht werden. Neue Erkenntnisse in diesem Bereich würden die Grundlage für weitere Untersuchungen eines bislang unbekanntem funktionellen Mechanismus darstellen.

II Materialien

2.1 Chemikalien, Puffer und Lösungen

Chemikalien

Tabelle 4: In den Versuchsreihen verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Hauptsitz	Artikelnummer
10X RIPA	New England Biolabs	Ipswich, USA	9806S
10X TRIS/glycine/SDS	Bio-Rad	Hercules, CA, USA	161-0772
2-propanol ROTIPURAN® ≥99.8 %	Carl Roth	Karlsruhe	6752
20x TE Buffer, RNase-free	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	T11493
2X laemmli	Bio-Rad	Hercules, CA, USA	1610737
ADP (2 x 10 ⁻⁴ M)	möLab GmbH	Langenfeld	0203011
Ammonium persulfate	Sigma Aldrich	St. Louis, USA	A3678
Color prestained protein standard, broad range (11-245 kDa)	New England Biolabs	Ipswich, USA	P7712S
Dimethylsulfoxid (DMSO), Molecular biology grade	Sigma Aldrich	St. Louis, USA	D8418
Dulbecco's PBS solution without Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Merck Millipore/Biochrom	Billerica, USA	L 1825
EMPURA® ethanol absolute	Merck Millipore	Billerica, USA	1070172511
Ethanol denatured ≥96 %	Carl Roth	Karlsruhe	T171
Gibco™ PBS (10X), pH 7.4	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	70011044
Glycine PUFFERAN® ≥99 %	Carl Roth	Karlsruhe	3908
H ₂ O dest. aus Milli-Q® Reference Anlage	Merck Milipore	Billerica, USA	
Hydrochloric acid (HCl), 6 mol/l - 6 N	Carl Roth	Karlsruhe	281
Invitrogen™ UltraPure™ DNase/RNase-free distilled Water	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	10977035

Invitrogen™ UltraPure™ TRIS-borate-EDTA (TBE) buffer, 10X	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	15581028
Methanol (MeOH)	AppliChem	Darmstadt	131091
Nonfat dry milk powder <i>BioChemica</i>	AppliChem	Darmstadt	A0830
Novex™ MagicMark™ XP Western protein standard	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	LC5602
PeqGREEN	VWR	Erlangen	37-5010
Quick-Load® 2-Log DNA ladder (0.1-10.0 kb)	New England Biolabs	Ipswich, USA	N04695
Rotiphorese Gel 30, acrylamide 30%, bisacrylamide 0,8%	Carl Roth	Karlsruhe	3029.1
Sildenafil citrate salt	Sigma Aldrich	St. Louis, USA	PZ0003
Sodium dodecyl sulphate (SDS)	Carl Roth	Karlsruhe	0183.3
Sodium nitroferri-cyanide(III) dehydrate	Sigma Aldrich	St. Louis, USA	431451
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	17919
Thermo Scientific™ BupH™ phosphate buffered saline packs	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	87785
TRIS hydrochloride (TRIS-HCl) PUFFERAN® ≥99 %	Carl Roth	Karlsruhe	9090
TRIS PUFFERAN® ≥99.9 %	Carl Roth	Karlsruhe	4855
Tween® 20 <i>BioChemica</i>	AppliChem	Darmstadt	A1389
Universal agarose, peqGOLD	VWR	Erlangen	732-2789
β-mercaptoethanol	Sigma Aldrich	St. Louis, USA	M3148

*Puffer und Lösungen*1X phosphate buffered saline (PBS)

Endkonzentration von 1 mM KH₂PO₄, 0,16 M NaCl, 2,97 mM Na₂HPO₄-7H₂O, pH 7,4
bei Raumtemperatur

100 ml 10X Gibco™ PBS (Thermo Fisher Scientific)

ad 1000 ml Millipore® Wasser

Lagerung bei Raumtemperatur

1X PBS-T

Mit einer Endkonzentration von 1 mM KH₂PO₄, 0,16 M NaCl, 2,97 mM Na₂HPO₄-
7H₂O, 0,2 % v/v Tween® 20, pH 7,4 bei Raumtemperatur

100 ml 10X Gibco™ PBS (Thermo Fisher Scientific)

2 ml Tween® 20 (AppliChem)

ad 1000 ml Millipore® Wasser

0,5 M Tris-HCL

0,5 M Tris-HCL, 10 M Natronlauge, 6 M Salzsäure, pH 6,8 bei Raumtemperatur

Lagerung bei 5°C

1,5 M Tris-HCL

1,5 M Tris-HCL, 10 M Natronlauge, 6 M Salzsäure, pH 8,8 bei Raumtemperatur

Lagerung bei 5°C

1X radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer

10 ml 10X RIPA (New England Biolabs)

ad 100 ml Millipore® Wasser

Lagerung bei -20 °C

2X Laemmli Puffer

Mit einer Endkonzentration von 355 mM β-mercaptoethanol

50 µl β-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich)

950 µl 2X Laemmli (Bio-Rad)

Lagerung bei -20 °C

1X Elektrophorese Puffer

100 ml 10X Tri/Glycine/SDS (Bio-Rad)

2 ml Tween® 20 (AppliChem)
 ad 1000 ml Millipore® Wasser
 Lagerung bei Raumtemperatur

1X Transfer Puffer

3,03 g TRIS PUFFERAN® (Carl Roth)
 14,4 g glycine PUFFERAN® (Carl Roth)
 0,2 l methanol (AppliChem)
 ad 1000 ml Millipore® Wasser
 Lagerung bei Raumtemperatur

5 % w/v Milch in PBS

5 g Magermilchpulver (AppliChem)
 ad 100 ml 1X PBS (10X Gibco™ PBS verdünnt in Millipore® Wasser)
 Lagerung bei 4 °C für maximal 2 Tage

2.5 % w/v Milch in PBS-T

2,5 g Magermilchpulver (AppliChem)
 ad 100 ml 1X PBS-T (siehe oben)
 Lagerung bei 4 °C für maximal 2 Tage

Assays

Tabelle 5: In den Versuchsreihen verwendete Assays

Assay/Enzym	Hersteller	Hauptsitz	Artikelnummer
SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA	34080
TaqMan® SNP Genotyping Assay C__29125113_10	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA	4351379
TaqMan® Universal Master Mix II, no UNG	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA	4440040

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 6: In den Versuchsreihen verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller	Ort	Artikelnummer
PAXgene Blood RNA Tube (IVD)	PreAnalytiX GmbH	Hombrechtikon, Schweiz	762165
Plastikröhrchen für Patientenplasma	möLab GmbH	Langenfeld	0303020
Rührstäbe, mikro	möLab GmbH	Langenfeld	0403013
S-Monovette® 2,7 ml K3E, K3 EDTA	Sarstedt	Nümbrecht	04.1917
S-Monovette® 2,7 ml, ohne Präparierung	Sarstedt	Nümbrecht	05.1729.001
S-Monovette® 5 ml 9NC, Citrat 3,2% (1:10)	Sarstedt	Nümbrecht	05.1071
S-Monovette® 7,5 ml LH, Lithium-Heparin	Sarstedt	Nümbrecht	01.1604
S-Monovette® 9 ml K3E, K3 EDTA	Sarstedt	Nümbrecht	02.1066.001
Spezial-Pipettenspitzen, extra lang	möLab GmbH	Langenfeld	0303032
Testtuben, mikro	möLab GmbH	Langenfeld	0303014

2.3 Kits

Tabelle 7: In den Versuchsreihen verwendete Kits

Kit	Hersteller	Ort	Artikelnummer
Gentra® Puregene® Blood Kit	Qiagen	Venlo, Niederlande	158389
NucleoSEQ® Columns	Marcherey-Nagel	Düren	740523.10
NucleoSpin® Blood	Marcherey-Nagel	Düren	740951.10
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Marcherey-Nagel	Düren	740609.10
PAXgene™ Blood RNA Kit	PreAnalytiX GmbH	Hombrechtikon, Schweiz	762174

ThermoScript™ RT-PCR system for first-strand cDNA synthesis	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	11146016
---	--------------------------	--------------	----------

2.4 Geräte

Tabelle 8: In den Versuchsreihen verwendete Geräte

Gerät	Hersteller	Hauptsitz
ABI Prism® 3130xl Genetic Analyzer	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Centrifuge 5425	Eppendorf	Hamburg
Centrifuge 5430	Eppendorf	Hamburg
Elektrische Pipettierhilfe e300	Biohit	Helsinki, Finnland
Elektrische Pipettierhilfe Multipette® stream	Eppendorf	Hamburg
Elektrische Pipettierhilfe Xplorer	Eppendorf	Hamburg
Feinwaage, MC1	Sartorius	Göttingen
Heraeus Biofuge fresco	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Heraeus Megafuge 1.0R	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Heraeus Megafuge 2.0R	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
ImageQuant LAS 4000	GE Healthcare	Chicago, USA
Infinite® F200 PRO	Tecan Group	Männedorf, Schweiz
Mikrozentrifuge ZM16	A. Hartenstein	Würzburg
PAP-8E Plättchenaggregometer	Bio/Data Corporation	Horsham, USA
Research Pipettierhilfe	Eppendorf	Hamburg
Sysmex KX-21N	Sysmex	Kobe, Japan
Thermomixer comfort, 1,5ml	Eppendorf	Hamburg
Veriti 96 Well Thermal Cycler	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
ViiA™ 7 Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA

2.5 Primer, Antikörper und qPCR-Sonden

Sequenzierungsprimer

Tabelle 9: In den Versuchsreihen verwendete Primer zur Sequenzierung der *GUCY1A3* Genvariante rs7692387

Gen		Primersequenz (5'-3')	Fragmentgröße
<i>GUCY1A3</i>	forward	GTGAGATAATTCAAAGTATGGC	475 bp
	reverse	AGGGATGGTCACTGCTGTATC	

Primer für qPCR

Tabelle 10: In der Genexpressionsanalyse eingesetzte Oligonukleotid-Primer

Gen	Name	Sequenz (5'-3')
<i>GUCY1A3</i>	<i>GUCY1A3_for</i>	CAA CCG TGC CCA TCT GTC AAG
	<i>GUCY1A3_rev</i>	CAT TCA GCC GTT CAA ACT CTG G
<i>RPLP0</i>	<i>RPLP0_for</i>	GGC ACC ATT GAA ATC CTG AGT G
	<i>RPLP0_rev</i>	GAT GAC CAG CCC AAA GGA GAA G

Taqman-Sonden für qPCR

Tabelle 11: In der Genexpressionsanalyse mittels Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) eingesetzte Sonden

Gen	Sequenz (5'-3')	Tags
<i>GUCY1A3_p</i>	CCT GAG AAG AAC ATA CAA GAA AGT CTT CCT C	5'FAM/3'BHQ1
<i>RPLP0_p</i>	GCA GCT GAT CAA GAC TGG AGA CAA AGT G	5'FAM/3'BHQ1

*Antikörper für Western Blot***Tabelle 12: Im Western Blot eingesetzte Primärantikörper**

Name	Molekulargewicht des Zielproteins	Isotyp	Hersteller	Hauptsitz	Artikelnummer
GAPDH (D16H11) XP® Rabbit mAb	37 kDa	Rabbit IgG	Cell Signaling Technology	Cambridge, UK	5174P
Phospho-VASP (Ser239) Antibody	48,50 kDa	Rabbit IgG	Cell Signaling Technology	Cambridge, UK	3114S

Tabelle 13: Im Western Blot eingesetzter Sekundärantikörper

Name/Hersteller	Hersteller	Hauptsitz	Artikelnummer
Anti-rabbit IgG, HRP linked Antibody	Cell Signaling Technology	Cambridge, UK	7074S

2.6 Software und Onlinedienste**Tabelle 14: Für die Auswertungen verwendete Software und Onlinedienste**

Software/Website	Betreiber/Entwickler	Hauptsitz
Alibaba2 [83]: http://www.gene-regulation.com/pub/databases.html	geneXplain GmbH	Wolfenbüttel
ExpressionSuite Software v1.0.3	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
GraphPad Prism version 7.0a for Mac OS X	GraphPad Software Inc.	La Jolla, USA
i-control 1.10 (for infinite reader)	Tecan Group	Männedorf, Schweiz
ImageQuant LAS 4000 Version 1.2	GE Healthcare	Chicago, USA
ImageQuant TL 1D Version 8.1	GE Healthcare	Chicago, USA
NCBI Gene: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene	National Center for Biotechnology Information, USA	Bethesda, USA

NCBI Nucleotide: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide	National Center for Biotechnology Information, USA	Bethesda, USA
NCBI Primer-BLAST: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/	National Center for Biotechnology Information, USA	Bethesda, USA
ViiA 7 Software Version 1.2.2	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA

2.7 Studienpopulation

2.7.1 Analysen in Abhängigkeit von Stickstoffmonoxid

Alle Probanden gaben vor Entnahme der Proben ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an diesem wissenschaftlichen Projekt. Die Ethikkommission der Technischen Universität München genehmigte das Protokoll. Alle Untersuchungen an menschlichen Proben standen im Einklang mit der Deklaration von Helsinki. Die Rekrutierung der Probanden erfolgte bei sich konsekutiv im Deutschen Herzzentrum München vorgestellten Patienten. Einschlusskriterium war eine bereits erfolgte oder noch erfolgende invasive Bestimmung des Koronarstatus mittels Koronarangiographie.

2.7.2 Plättchenreaktivität unter Aspirintherapie / ISAR-ASPI Genetics Substudie

In der ISAR-ASPI-Studie [16] wurde der Zusammenhang zwischen einer erhöhten Thrombozytenreaktivität unter Aspirintherapie (high on-aspirin treatment platelet reactivity – HAPR) und einem schlechteren klinischen Outcome weitergehend untersucht. Um genotypspezifische Unterschiede zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit 1.678 Probanden der ISAR-ASPI Studie [16] für die Variante im *GUCY1A3*-Gen genotypisiert. Hierbei handelte es sich um konsekutive Patienten des „Deutschen Herzzentrums München“ und des „Klinikums Rechts der Isar“ in München, welche eine Koronarintervention erhalten hatten. Patienten mit stabiler und instabiler Angina Pectoris, sowie Patienten mit STEMI und NSTEMI wurden in die Studie eingeschlossen. Patienten mit kardiogenem Schock und/oder Stentthrombose wurden ausgeschlossen [16].

III Methoden

3.1 Aufklärung, Anamnese und körperliche Untersuchung

Das Studienprotokoll wurde vor Beginn der Arbeit von der Ethikkommission der Technischen Universität München geprüft und genehmigt. Alle Untersuchungen an menschlichen Proben wurden nach ausführlicher Aufklärung über das Projekt, sowie nach Einholen einer schriftlichen Einverständniserklärung der Probanden durchgeführt. Diese entsprachen ausnahmslos den ethischen Grundsätzen für die medizinische Forschung am Menschen nach der Deklaration von Helsinki. Anschließend wurde jeder Proband im Rahmen der stationären Aufnahme ausführlich anamnestiziert und körperlich untersucht. Für dieses Projekt wurde insbesondere auf die Krankengeschichte und die Aufnahmemedikation eingegangen, da eine Vielzahl der Patienten thrombozytenhemmende Medikamente einnahmen. Hierbei wurden für dieses Projekt folgende Parameter erhoben:

- aktuelle Medikation: P2Y₁₂-Rezeptor-Hemmer, Acetylsalicylsäure, bestehende orale Antikoagulation
- bestehende (Vor-) Erkrankungen: koronare Herzkrankheit, erfolgter akuter Myokardinfarkt, arterielle Verschlusskrankheit
- kardiale Eingriffe in der Krankengeschichte: Koronarintervention, Koronararterien-Bypass
- Symptomatik bei Aufnahme: stabile Angina pectoris, instabile Angina pectoris
- körperlicher Untersuchungsbefund: Herzfrequenz, Blutdruck

3.2 Probenentnahme und Prozessierung

Die Blutentnahme wurde bei Patientenaufnahme und vor der initialen Verabreichung eines P2Y₁₂-Rezeptorantagonisten durchgeführt, um einen Einfluss auf die Ergebnisse der Thrombozytenaggregometrie zu verhindern. Im Rahmen der Venenpunktion wurde darauf geachtet, den Sog bei der Aspiration und damit die Scherkräfte in der Hohnadel möglichst gering zu halten, um vorzeitige Aktivierungsvorgänge der Thrombozyten zu verhindern. Ebenso wurden Transport und Lagerung der Proben bei Raumtemperatur und möglichst erschütterungsarm durchgeführt.

Durch periphere Venenpunktion wurden folgende Probenbehälter befüllt:

- 1) Eine 2,7 ml EDTA-, eine 7,5 ml Heparin- und eine 5 ml Citrat-Monovette[®] für die Untersuchung des Routinelabors inklusive Blutbild, Elektrolyte und Retentionsparameter
- 2) Eine 9 ml EDTA-Monovette[®] zur Isolierung genomischer DNA aus Vollblut
- 3) Ein PAX-Gene-Blood-RNA-Tube[®] zur Isolierung von RNA aus Vollblut
- 4) Zwei 5 ml Citrat-Monovetten[®] zur Präparation von plättchenreichem (PRP) und plättchenarmem Plasma (PPP)

Die Proben für das Routinelabor wurden direkt nach Entnahme in das Institut für Laboratoriumsmedizin der Klinik weitergeleitet und dort unter klinisch standardisierten Bedingungen analysiert. Die 9 ml EDTA-Monovette[®] und das PAX-Gene-Blood-RNA-Tube wurden bis zur Isolierung der DNA bzw. RNA bei 5°C gelagert. Die Citrat-Monovetten wurden maximal 1,5 Stunden bei Raumtemperatur gelagert, ehe mit der Präparation von PRP und PPP begonnen wurde.

3.3 Nukleinsäureextraktion

3.3.1 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem „Genomic-DNA-from-Blood-Kit“ von Marcherey-Nagel. Hierbei wurde das vom Hersteller empfohlene Verfahren an die jeweiligen Laborbedingungen angepasst und bezüglich DNA-Ausbeute und -Reinheit optimiert. Das Verfahren gliedert sich in die Schritte der Zelllyse, Proteinpräzipitation, DNA-Präzipitation und DNA-Hydratation.

Zelllyse

7 ml „RBC-Lysis-Solution“ wurden in einem Zentrifugenröhrchen vorgelegt und 3 ml EDTA-Blut des Probanden hinzugegeben. Während der 20-minütigen Inkubation wurde mehrmals geschwenkt. Daran schloss sich eine Zentrifugation von 10 Minuten bei 3100 rpm an (Megafuge 2.0R). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in der restlichen Zellflüssigkeit mittels Schüttler resuspendiert. Nach Zugabe von 3 ml „Cell-Lysis-Solution“ erfolgte nach erneutem Schütteln die vollständige Resorption der Zellen.

Proteinpräzipitation

1 ml „Protein-Precipitation-Solution“ wurde zum Zelllysate gegeben und geschwenkt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 3100 rpm über 10 min.

DNA-Präzipitation

Zunächst wurde in einem Zentrifugenröhrchen 3 ml Isopropanol vorgelegt und anschließend der Überstand der Proteinpräzipitation hinzugegeben. Nach Schwenken des verschlossenen Röhrchens, kann man die DNA als fädiges Geflecht erkennen. Nach erneuter Zentrifugation über 10 Minuten bei 3100 rpm wurde der Überstand verworfen. Zum Waschen der DNA wurden zum Pellet 1 ml Ethanol (70%) hinzugegeben, mehrmals auf- und abpipettiert und anschließend in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Nun wurde mit der „Biofuge fresco“ Tischzentrifuge 10 Minuten bei 8500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Restflüssigkeit abpipettiert. Danach erfolgte eine zehnmünütige Trocknung des DNA-Pellets bei offenem Deckel.

DNA-Hydration

Es wurden 300 µl „Hydration Solution“ zum Pellet gegeben und anschließend für eine Stunde bei 65 °C im Thermomixer „Comfort“ inkubiert (Intervallschütteln alle 5 min für eine Minute mit 800 rpm). Anschließend wurde die Lösung 3-5 Tage bei Raumtemperatur inkubiert, um die DNA-Ausbeute zusätzlich zu steigern.

Lagerung

Isolierte DNA wurde bei -20 °C gelagert.

3.3.2 RNA-Extraktion

Für die Extraktion der RNA wurde das PAXgene™-Blood-RNA-Kit verwendet. Bis auf die Eluierung wurden alle Schritte nach Anweisung des Herstellers durchgeführt.

Eluierung

Im ersten Eluierungsschritt wurden 30 µl „Elution Buffer (BR5)“ verwendet. Diese im zweiten Eluierungsschritt erneut auf die Probe aufgetragen, um die RNA-Konzentration zu erhöhen.

Lagerung

Isolierte RNA wurde bei -80 °C gelagert.

3.3.3 Konzentrationsbestimmung und Verdünnung von Nukleinsäuren

Konzentrationsbestimmung

Zur Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren wurde der Tecan Infinite® F200 PRO genutzt. Hierbei wurde eine Absorptionmessung in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt.

Verdünnung der DNA

Für die Genotypisierung wurde die DNA mit Aqua destillata auf eine Konzentration von 10 ng/µl verdünnt.

3.4 Lichttransmissionsaggregometrie

3.4.1 Funktionsprinzip

Allgemeines zur Lichttransmissionsaggregometrie

Das Prinzip der Lichttransmissionsaggregometrie (LTA, „Born-Aggregation“) ist ein 1963 von G. V. R. Born und M. J. Cross entwickeltes Verfahren zur Messung der Thrombozytenfunktion. Hierbei befindet sich plättchenreiches Plasma (PRP) des Probanden zwischen einer Leuchtdiode und einer Photozelle. Bei Aggregation der Thrombozyten sinkt deren Fähigkeit die Strahlung des Lichts zu streuen. Die Lichtdurchlässigkeit des Plasmas steigt somit an und es gelangt mehr Licht auf die Fotozelle. Diese Veränderung der Lichtintensität wird registriert und kann vom Gerät ausgewertet werden [84]. Die Aggregation kann hierbei, je nach Fragestellung, von verschiedenen Agonisten ausgelöst, sowie durch Antagonisten gehemmt werden.

Aggregometrie im klinischen Alltag

Die duale Plättchenhemmung mit Acetylsalicylsäure und einem P2Y₁₂-Inhibitor ist die Therapie der Wahl, um thrombotischen Komplikationen bei Patienten während und nach einer Koronarintervention vorzubeugen [85]. Es konnte gezeigt werden, dass eine Vormedikation mittels einer hohen Einzeldosis des P2Y₁₂-Inhibitors vorteilhaft ist [86], wenngleich das individuelle Ansprechen der Patienten auf den P2Y₁₂-Inhibitor einer hohen Variabilität unterliegt [87]. In der Folge wiesen immer mehr prospektive und retrospektive Studien darauf hin, dass es nach einer Koronarintervention trotz Therapie mit P2Y₁₂-Inhibitor zu einer erhöhten Thrombozyten-Reaktivität und damit zu einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse kommt [90-94]. Die meisten dieser Studien wurden mittels Lichttransmissionsaggregometrie in PRP durchgeführt. Nach

Einführung des Roche Multiplate Analyzers konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse der hierbei verwendeten elektrischen Impedanzaggregometrie mit denen der optischen Lichtaggregationsaggregometrie vergleichbar sind [88]. Da diese Methode einen wesentlich geringeren Zeitaufwand in Anspruch nimmt und zugleich eine bessere Standardisierung ermöglicht, wird heute das Ansprechen auf P2Y₁₂-Inhibitoren im klinischen Alltag mittels ADP induzierter elektrischer Impedanzaggregometrie gemessen. Da die Aggregometrie mit dem „Multiplate Analyzer“ jedoch nur mit Vollblut möglich ist, kann keine isolierte Untersuchung einzelner Blutbestandteile wie beispielsweise Thrombozyten erfolgen. Daher nimmt die Lichttransmissionsaggregometrie mit plättchenreichem Plasma nach wie vor einen wichtigen Stellenwert im Bereich der Forschung ein.

3.4.2 Herstellung der Reagenzien

In dieser Arbeit erfolgte die Induktion der Aggregation mittels Adenosindiphosphat (ADP). Zur Hemmung der Aggregation wurde der NO-Donor Nitroprussid-Natrium sowohl alleine als auch in Kombination mit dem PDE5-Hemmer Sildenafil eingesetzt. Zur Bestimmung der Baseline-Werte wurde außerdem eine Probe ohne Hemmung der Aggregation mitgeführt. Die nicht wasserlöslichen Reagenzien wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Da DMSO ebenfalls proaggregatives Potential besitzt, wurden die DMSO-Konzentrationen der einzelnen Reagenzien, insbesondere auch der Kontrollen, angeglichen (s.u.).

ADP-Lösung

Die ADP-Lösung wurde vom Hersteller des Aggregometriegeräts bezogen und besitzt eine Ausgangskonzentration von 200 µM. Diese wurde mit H₂O auf 20 µM verdünnt und zur Induktion der Thrombozytenaggregation eingesetzt.

Kontrolllösung

Um eine einheitliche DMSO-Konzentration zu erhalten, wurde für die Kontrolle DMSO mit H₂O im Verhältnis 1:50 verdünnt.

Nitroprussid-Natrium-Grundlösung

Zur Herstellung dieser Lösung wurden zunächst 30 mg Nitroprussid-Natrium mit der Feinwaage (MC1) abgewogen und in 500 µl DMSO gelöst. Daraus ergab sich eine Konzentration der Ausgangslösung von 200 mM. Es erfolgte eine Verdünnung mit H₂O auf eine Endkonzentration von 200 µM NO. Das DMSO-H₂O-Verhältnis betrug hier 1:1000.

Nitroprussid-Natrium-Arbeitslösung

Die Nitroprussid-Natrium-Grundlösung wurde mit einer DMSO-H₂O-(1:25)-Lösung im Verhältnis 1:2 verdünnt. Die Nitroprussid-Natrium-Konzentration betrug nun 100 µM und das DMSO-Verhältnis 1:48,7. Die fertige Lösung ist bei Raumtemperatur 24 Stunden lang stabil.

Nitroprussid-Natrium-Sildenafil-Lösung

Zur Herstellung dieser Lösung wurden zunächst 5 mg Sildenafil in 1,5 ml DMSO gelöst. Daraus ergab sich eine Konzentration von 5 mM. Diese Lösung wurde mit H₂O auf 200 µM verdünnt. Hier betrug die DMSO-Konzentration 1:25. Diese Lösung wurde nun im Verhältnis 1:2 mit der Nitroprussid-Natrium-Grundlösung verdünnt. Die Sildenafil-Konzentration betrug nun 100 µM, die NO-Konzentration 100 µM und das DMSO-Verhältnis 1:48,7.

In jede Testküvette wurden bei der Messung 25 µl eines der Reagenzien sowie 25 µl der ADP-Lösung zur Induktion der Aggregation hinzugegeben. Daraus ergab sich ein Gesamtvolumen von 250 µl.

Tabelle 15: Konzentrationen der Reagenzien in den Arbeitslösungen sowie Endkonzentrationen

		Arbeitslösungen				
		ADP-Lösung	Kontroll-Lösung	NO-Lösung	NO-Sildenafil-Lösung	
Enthaltene Reagenzien	ADP	Konzentration in Lösung	20 µM			
		Endkonzentration in Testküvette	2 µM			
	DMSO	Verhältnis in Lösung		1:50	1:48,7	1:48,7
		Verhältnis in Testküvette		1:500	1:487	1:487
	NO	Konzentration in Lösung			100 µM	100 µM
		Endkonzentration in Testküvette			10 µM	10 µM
	Sildenafil	Konzentration in Lösung				100 µM
		Endkonzentration in Testküvette				10 µM

3.4.3 Herstellung von plättchenarmem (PPP) und plättchenreichem Plasma (PRP)

Zunächst wurde die Thrombozytenzahl im EDTA-Vollblut mit Hilfe des automatischen SYSMEX Hämatologiesystems KX-21N gemessen. Alle Proben lagen hierbei im Bereich zwischen 150.000 und 400.000/ μl . Nach Vorbereitung von plättchenreichem Plasma (PRP) wurde die Thrombozytenzahl erneut gemessen.

Die Herstellung von plättchenarmem (PPP) und plättchenreichem Plasma (PRP) erfolgte über verschiedene Zentrifugationsschritte. Durch differentielle Zentrifugation (stufenweise höheren Zentrifugalbeschleunigungen bei schrittweise verlängerten Zentrifugationszeiten) wurden die verschiedenen Blutbestandteile voneinander getrennt. Hierbei war darauf zu achten, dass Thrombozyten sehr empfindlich auf Erschütterung, Temperaturunterschiede und Scherkräfte reagieren. Um bereits bei der Blutentnahme erfolgte Aktivierungsvorgänge zu bremsen, wurden die Citrat-Monovetten zunächst mindestens 20 Minuten bei Raumtemperatur gelagert. Mit der Herstellung von PRP wurde dann innerhalb von 1,5 Stunden nach Blutentnahme begonnen.

Der erste Zentrifugationsschritt diente der Herstellung von PRP, also der Auftrennung der Thrombozyten von den restlichen korpuskulären Blutbestandteilen. Während der Zentrifugation verblieb die Probe in der Monovette und wurde bei 800 rpm über 10 Minuten ohne Bremse zentrifugiert (Megafuge 1.0R). Hierbei sanken die schweren Blutbestandteile wie Erythrozyten, Retikulozyten und Leukozyten ab. Das gewonnene Plasma enthielt nun hauptsächlich Thrombozyten. Dieses plättchenreiche Plasma (PRP) wurde nun mittels Plastikpasteurpipette entnommen und in einem Kunststoffröhrchen gesammelt.

Im zweiten Zentrifugationsschritt wurden die Monovetten 10 Minuten bei 3000 rpm mit Bremse zentrifugiert. Das nun entstandene plättchenarme Plasma (PPP) enthielt so gut wie keine Thrombozyten mehr und wurde ebenfalls mittels einer Plastikpasteurpipette in einem Kunststoffröhrchen gesammelt.

3.4.4 Vorbereitung der Testküvetten

Die Messung der Thrombozytenaggregation erfolgte in speziellen Testküvetten (möLab). Um eine ausreichende Durchmischung der Reagenzien mit dem Plasma zu gewährleisten, wurden die Küvetten mit Magnetrührern (möLab) bestückt. Dadurch konnte außerdem der direkte Kontakt zwischen den Thrombozyten erreicht werden. Je Probe wurden drei Küvetten mit 200 μl PRP befüllt. Eine vierte wurde zur Leerwertbestimmung mit 250 μl PPP derselben Probe befüllt. Für das Befüllen der

Küvetten wurde die Elektrische Pipettierhilfe e300 verwendet. Um die Scherkräfte hierbei auf ein Minimum zu reduzieren, wurde mit niedrigster Geschwindigkeitsstufe pipettiert.

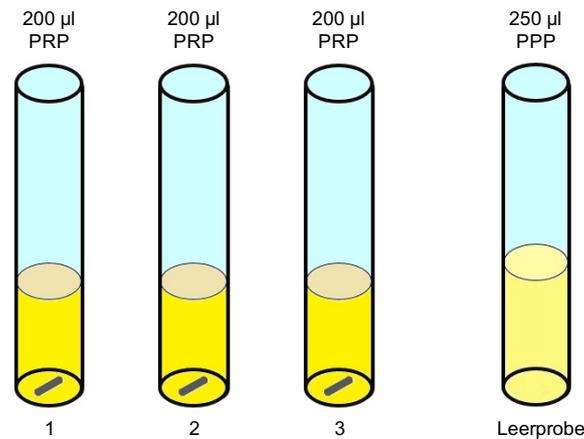


Abbildung 4: Vorbereitung der Testküvetten

Bestückung von je 3 Testküvetten pro Proband mit einem Magnetrührer und anschließender Befüllung mit 200 µl plättchenreichem Plasma (PRP). Als Leerprobe diente je Proband eine Testküvette befüllt mit 250 µl plättchenarmem Plasma (PPP).

3.4.5 Durchführung der Messung

Die Messungen der Thrombozytenfunktion wurden an einem PAP-8E Thrombozytenaggregometer durchgeführt.

Zunächst wurden die vorbereiteten Testküvetten in den Inkubationsschächten auf 37°C erwärmt, um physiologische Bedingungen herzustellen. Für jeden Testschacht wurde der Leerwert mit Hilfe des PPP-Röhrchens bestimmt. Anschließend wurden in die Probenküvetten 25 µl der jeweiligen Reagenzien (Kontrolllösung, Nitroprussid-Natrium-Lösung oder Nitroprussid-Natrium-Sildenafil-Lösung) pipettiert und jeweils für zwei Minuten rührend inkubiert. Nach Inkubation wurden die Probenküvetten in die Testschächte gestellt und die Messung gestartet. Nach zehn Sekunden Messung wurde die Aggregation mit 25 µl ADP-Lösung ausgelöst und die Zugabe am Gerät bestätigt. Die Messung des Verlaufs der Aggregationskurve dauerte sechs Minuten (s. Abbildung 5). Im Anschluss an die Lichttransmissionsaggregometrie wurden die Proben für den Einsatz im Western Blot vorbereitet.

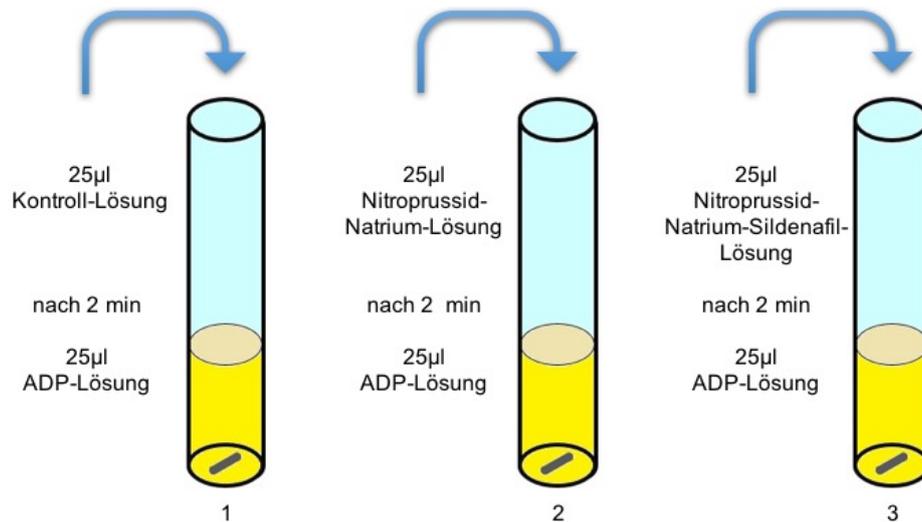


Abbildung 5: Versuchsdurchführung der optischen Lichttransmissionsaggregometrie

Zugabe von zunächst 25 µl (Kontrolllösung, Nitroprussid-Natrium-Lösung oder Nitroprussid-Natrium-Sildenafil-Lösung) in die Testküvetten mit zweiminütiger Inkubation. Nachfolgend Auslösung der Aggregation durch Zugabe von 25 µl ADP-Lösung und Aufzeichnung der Aggregationskurve.

3.4.6 Auswertung

Nach erfolgter Plättchenaggregation gibt das Aggregometriegerät PAP-8E den jeweiligen Aggregationskurvenverlauf für jede Probe aus. Abbildung 6 zeigt die Aggregometrie曲ven zweier Probanden. Dargestellt ist der Grad der Lichttransmission (Ordinate) in Abhängigkeit zu der verstrichenen Zeit nach Start der Messung in Minuten (Abszisse). Bei der Leerwertbestimmung wird die Lichtdurchlässigkeit des plättchenarmen Plasmas als 100% und somit der Grad der Aggregation als 0% definiert. Alle folgenden Messungen wurden auf diesen Leerwert bezogen. Die Zahlen über den Kurven geben Auskunft über die jeweiligen Messkanäle.

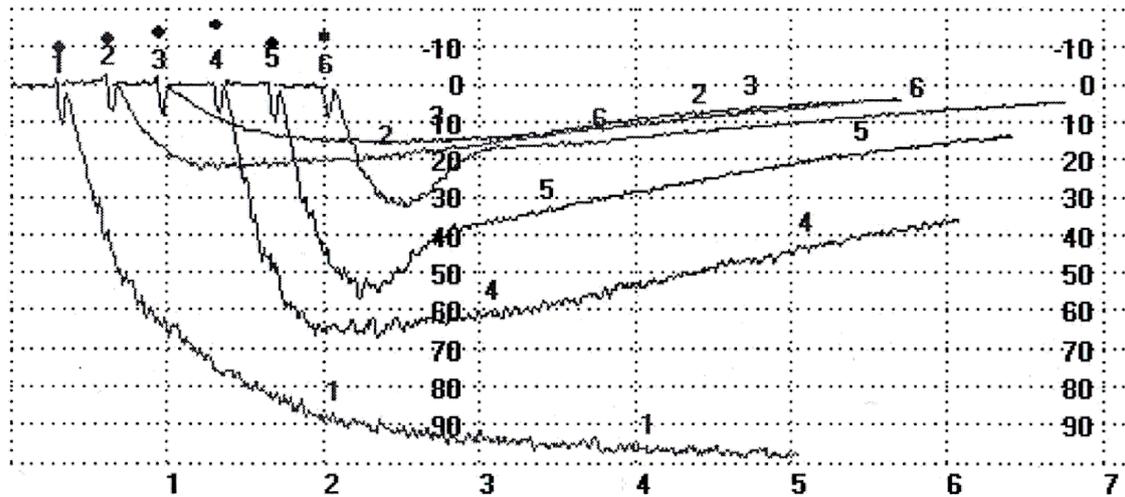


Abbildung 6: Darstellung der Aggregometriekurven

In Abhängigkeit zur verstrichenen Zeit (Abszisse) wurde für jeden Testschacht der Grad der Aggregation in Prozent (Ordinate) über 5 Minuten aufgezeichnet. In dieser Abbildung sind beispielsweise die Kanäle 1-3 und die Kanäle 4-6 je einem Probanden zugeordnet. Die erste Kurve (Kanal 1 bzw. 4) gibt den Verlauf der ADP-induzierten Plättchenaggregation ohne Zugabe von Inhibitoren (Kontrolllösung) an. Die zweite Kurve (Kanal 2 bzw. 5) zeigt den Verlauf der ADP-induzierten Plättchenaggregation nach Zugabe von Nitroprussid-Natrium. Die dritte Kurve (Kanal 3 bzw. 6) zeigt den Kurvenverlauf nach Zugabe von Nitroprussid-Natrium und des PDE5-Hemmers Sildenafil.

Das Aggregometriegerät gibt für jeden Messkanal tabellarisch verschiedene Messwerte aus. Als primären Endpunkt der Messung wurde die Fläche unter der Kurve (Area under the curve – AUC) der Plättchenaggregation gewählt, welche als willkürliche Einheit (arbitrary unit – AU) x min dargestellt wird.

3.5 Genotypisierung

Zur Genotypisierung der Proben wurde das ViiA™-7-Real-Time-PCR-System verwendet. Es wurde hierbei mit der „Fast“-Methode des Herstellers gearbeitet. Für jede Probe wurden hierfür folgende Reagenzien in eine 96 Well-Platte pipettiert:

Tabelle 16: Reaktionsgemisch Genotypisierung einer DNA-Probe mittels ViiA™-7-Real-Time-PCR-System

Reagenzien	Volumen
TaqMan GTXpress Master Mix	5 µl
Taqman SNP assay 20x (in TE)	0,5 µl
H ₂ O	3,5 µl
DNA-Probe (c=10 ng/µl)	1 µl
Gesamt	10 µl

Die Einstellungen am Gerät sowie die Temperaturkurven wurden nach Herstellerempfehlungen gewählt.

3.6 Genexpressionsanalyse

Die Quantifizierung der exprimierten RNA erfolgte mit Hilfe einer quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR). Hierbei handelt es sich um die Erfassung von Fluoreszenzmarkern, welche während der PCR mit genspezifischen Primern aktiviert werden. Dazu gibt es eine Vielzahl verschiedener Methoden. In dieser Arbeit wurde der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) mittels Taqman-Sonden verwendet. Diese Sonden bestehen aus einem DNA-Strang, der komplementär zu dem zu detektierenden DNA-Abschnitt aufgebaut ist. An einem Ende ist er mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff und am anderen Ende mit einem Quencher versehen. Der in diesem Fall sogenannte Dark-Quencher unterdrückt bei räumlicher Nähe die Fluoreszenz des Reporters und somit das detektierbare Signal. Dark-Quencher haben gegenüber dem früher ausschließlich verwendeten TAMRA-Quencher den Vorteil, dass sie keine zusätzliche Fluoreszenz freisetzen, die insbesondere bei Multiplex Real-Time-PCR-Applikationen stören könnten.

Die Taq-Polymerase besitzt zusätzlich zur Polymeraseaktivität eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität, wodurch die gebundene Sonde während der Synthese des Gegenstrangs abgebaut wird. Damit wird die räumliche Beziehung von Quencher und Reporter aufgelöst, das Fluoreszenzsignal wird nicht weiter unterdrückt, und es kann eine steigende Reporter-Fluoreszenz gemessen werden. Diese Messung findet am Ende der Elongation nach jedem Zyklus statt.

3.6.1 Reverse Transkription

Für die Genexpressionsanalyse wird cDNA (*complementary DNA*) benötigt. Die extrahierte RNA wird daher zunächst mittels reverser Transkription umgeschrieben. Für diesen Schritt wurde das Thermoscript RT-PCR-Kit von Invitrogen verwendet. Die cDNA ist eine Abschrift der RNA und enthält im Gegensatz zum kodierenden DNA-Abschnitt keine Introns.

Verfahren

In die RT-PCR wurden jeweils 1050 ng RNA eingesetzt. Je nach RNA Konzentration in der Probe musste das entsprechende Volumen berechnet und mit RNase freiem Wasser ergänzt werden. In ein 0,2 ml PCR-Tube wurde Folgendes pipettiert:

Tabelle 17: Ansatz für RT-PCR je 0,2 ml PCR-Tube

Reagenzien	Volumen/Masse
RNA	1050 ng
Random hexamers	1 μ l
Oligo (dT)s	1 μ l
dNTPs [10 nM each]	2 μ l
RNase freies Wasser	ad. 12 μ l

Es erfolgte eine 5minütige Inkubation der Proben bei 65°C in einem Thermocycler. Anschließend wurden die Proben für mindestens eine Minute auf Eis gelegt, um mögliche Sekundärstrukturen zu eliminieren. Im Anschluss erfolgte die Zugabe folgender Reagenzien:

Tabelle 18: Hinzugefügte Reagenzien je 0,2 ml PCR-Tube

Reagenzien	Volumen
5x synthesis buffer	4 μ l
DTT	1 μ l
RNase OUT	1 μ l
RNase freies Wasser	1 μ l
Reverse Transkriptase	1 μ l

Es erfolgte ein 10minütiger Inkubationsschritt bei 25°C. Währenddessen lagern sich die Primer an die DNA an und werden verlängert. Anschließend wurde für 50 min bei 50°C, dann 5 min bei 85°C inkubiert. Nach der Zugabe von 1 µl RNase H folgte eine 20-minütige Inkubation bei 37°C. Bis zur Durchführung der Genexpressionsanalyse musste die fertige cDNA bei -20°C gelagert werden.

3.6.2 Quantitative Polymerase Kettenreaktion

Für die qPCR fand das ViiA™-7-Real-Time-PCR-System Verwendung. Alle isolierten RNA-Proben wurden zuvor revers transkribiert und enthielten je Probe 1050 ng cDNA, welche bei einem Reaktionsvolumen von 21 µl in einer Konzentration von 50 ng/µl vorlagen.

Für die Expressionsanalyse mussten die Sonden jeweils auf 5 µM in H₂O verdünnt werden. Es wurde jeweils eine Sonde für das *GUCY1A3*-Gen, sowie für die spätere Normalisierung der Messwerte eine Sonde für das Housekeeping-Gen *RPLP0* mitgeführt. Die Primer wurden auf 8 µM verdünnt.

Anschließend erfolgte für jede Probe eine Vorpipettierung folgender Reagenzien auf eine 96-well Mikrotiterplatte:

Tabelle 19: Reaktionsansatz pro Well auf einer 96-Well Mikrotiterplatte

Reagenzien	Volumen
Universal Mastermix II, no UNG	10 µl
Sonde [5 µM] <i>GUCY1A3</i> bzw. <i>RPLP0</i>	1 µl
forward Primer [8 µM] <i>GUCY1A3</i> bzw. <i>RPLP0</i>	1 µl
reverse Primer [8 µM] <i>GUCY1A3</i> bzw. <i>RPLP0</i>	1 µl
H ₂ O	6 µl
gesamt	19 µl

Anschließend wurde je 1 µl cDNA (c = 50 ng/µl) hinzupipettiert. Durch die Messung von Triplets konnte die Messvarianz minimiert werden. Als Negativkontrollen wurden 1 µl H₂O sowie 1 µl der Negativkontrolle aus der vorangegangenen reversen Transkription hinzu pipettiert. Anschließend folgte Definition und Zuordnung der Proben- und Negativkontrollen am Gerät. Anschließend wurde eine qPCR „Comparative C_T“ gestartet. Die Softwareeinstellungen richteten sich nach den Empfehlungen des Herstellers.

3.6.3 Auswertung

Die Ausgabe der qPCR erfolgte in der Anzahl der für eine Fluoreszenzdetektion nötigen Zyklen, welche C_T (cycle threshold) genannt wird. Die C_T definiert hierbei die Anzahl an Zyklen, nach denen das Fluoreszenzsignal den Threshold (zu Deutsch: Schwelle) übersteigt. Als Threshold wird eine Grenzlinie definiert, welche parallel zur Abszisse verläuft und im Allgemeinen das Hintergrundrauschen von einem signifikanten Signal abgrenzt. Dieser Threshold sollte bestenfalls in der exponentiellen Phase der jeweiligen Kurven liegen. Je weniger der nachzuweisenden DNA vorhanden ist, desto mehr Zyklen werden benötigt, um den Threshold zu überschreiten. Das C_T -Level ist somit umgekehrt proportional zur Menge der Ziel-DNA in der Probe.

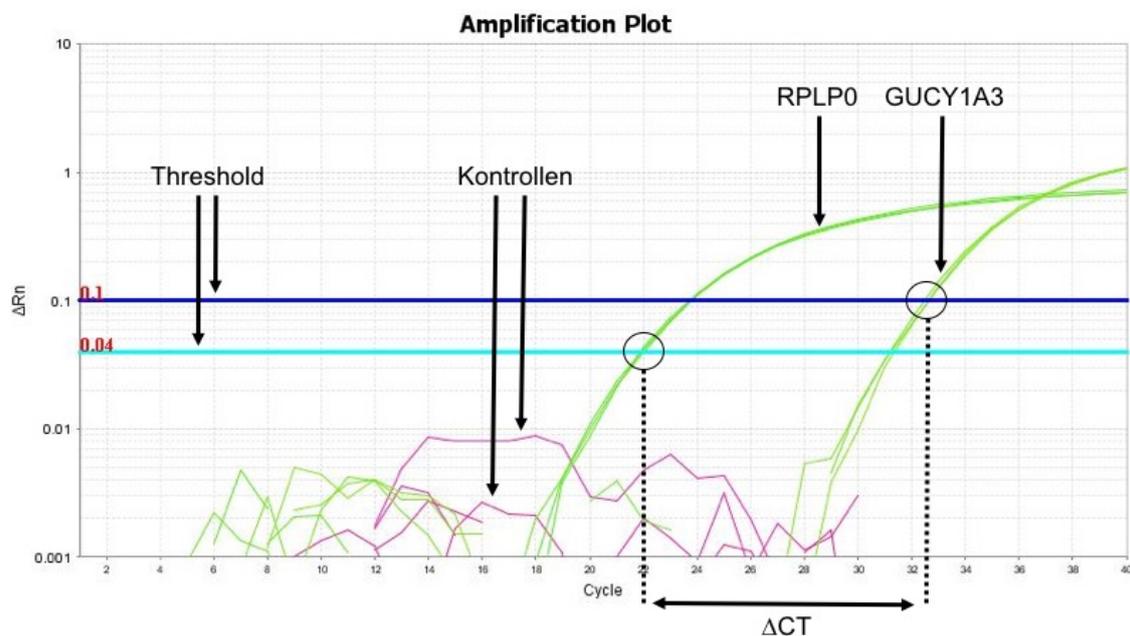


Abbildung 7: Optische Darstellung der Messwerte der quantitativen PCR

Die Intensität der gemessenen Fluoreszenz wird abhängig von der Anzahl der Zyklen dargestellt. Die Software definiert hierbei automatisch für jede Kurve den Threshold.

Die Auswertung erfolgte mit der ExpressionSuite-Software (V1.0.3) des Herstellers. Hierbei wurden die Daten aller qPCR Durchläufe gemeinsam ausgewertet und für jede Probe je ein C_T -Wert für *GUCY1A3* und *RPLP0* ausgegeben. Die Differenz der beiden C_T -Werte ergibt den ΔC_T -Wert, welcher das Ausmaß der individuellen Genexpression repräsentiert. Um die Genexpression in verschiedenen Individuen zu vergleichen, wurden die ΔC_T -Werte mittels unabhängigem T-Test ausgewertet und als $2^{-\Delta C_T}$ Werte dargestellt.

3.7 Western Blot

Um die Aktivität der löslichen Guanylatzyklase zu bestimmen, wurde die cGMP abhängige Phosphorylierung des VASP-Proteins an Serin 239 durch die Proteinkinase G bestimmt. Dafür musste ein Western Blot mit den Thrombozytenisolaten der optischen Lichttransmissionsaggregometrie durchgeführt werden. Hierbei kam ein P-VASP_{S239}-spezifischer Antikörper zum Einsatz. Zur Normalisierung an die Proteingesamtmenge der einzelnen Proben, wurde zudem ein Antikörper für das Housekeeping-Protein GAPDH mit eingesetzt.

3.7.1 Vorbereitung der Proben

Nach erfolgter Lichttransmissionsaggregometrie, wurden die Proben jeweils in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und anschließend für 10 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Nach der Absaugung des Überstandes mittels Vakuumpumpe, konnte das Pellet abgesaugt und anschließend in 25 µl 1x RIPA-Puffer und 25 µl 2x Laemmli-Puffer gelöst werden.

Lagerung

Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80 °C.

Denaturierung

Nach der Denaturierung über 5 Minuten bei 95 °C und der anschließenden Kühlung auf Eis, erfolgte die Einsetzung der Proben im Western Blot.

3.7.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Blotting

Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Separierung der Proteine erfolgte mit Hilfe einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE). Hierfür war das Auftragen von 15 µl jeder Probe, sowie 5 µl der Pre-stained-Ladder (Proteinmarker) auf ein 12 %iges Polyacrylamid-Gel notwendig. Für die Elektrophorese mussten für den Verlauf im Stacking Gel (Sammelgel) 100 V und für den Verlauf im Resolving Gel (Trenngel) 150 V angelegt werden.

Tabelle 20: Zusammensetzung des Acrylamidgels

Stacking Gel 4 %		Resolving Gel 12 %	
Reagenz	Anteil	Reagenz	Anteil
30 % Acrylamide/bis	13,2 %	30 % Acrylamide/bis	40 %
0,5 M Tris-HCL, pH 6,8	25,2 %	1,5 M Tris-HCL, pH 8,8	25 %
10 % SDS	1 %	10 % SDS	1 %
Aqua dest.	60 %	Aqua dest.	33,5 %
TEMED	0,1 %	TEMED	0,05 %
10 % APS	0,5 %	10 % APS	0,5 %

Transfer des Proteins auf die Membran

Im Anschluss erfolgte die Übertragung des Proteins mit Hilfe des Elektrotransferprinzips auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid-Membran). Dieses „Blotting“ verlangte die Anlegung eines elektrischen Feldes von 100 V für 90 min senkrecht zur Membran bzw. zum Gel.

Blocken unspezifischer Bindungsstellen

Membranen, welche für den Western Blot genutzt werden, besitzen eine sehr hohe Bindungsaffinität gegenüber Proteinen. Daher ist es nach dem Proteintransfer sehr wichtig, die restliche freie Oberfläche der Membran zu blockieren. Dies verhindert eine spätere unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran. Hierfür ist eine schüttelnde Inkubation der Membran für eine Stunde in einer 5-%-igen Milchpulver-PBS-Lösung notwendig.

Inkubation mit primärem und sekundärem Antikörper

Als Primärantikörper kamen Phospho-VASP 1:10.000 und GAPDH 1:100.000 (vom Kaninchen) zur Anwendung, welche in einer 2,5%-igen Milchpulver-PBS-T-Lösung verdünnt wurden. Über Nacht konnte dann inkubiert werden. Nach einem erneuten Waschschrift erfolgte die Inkubation für eine Stunde mit dem Sekundärantikörper anti-rabbit 1:100.000, welcher durch Meerrettichperoxidase (engl.: Horseradish Peroxidase - HRP) markiert war. Als nächster Schritt war ein weiterer Waschschrift notwendig.

Peroxidase-Reaktion

Mit Hilfe des „SuperSignal-West-Pico-Substrate“ von „Thermo Scientific“ wurde nun eine Peroxidasereaktion ausgelöst. Hierbei katalysiert die HRP die Umsetzung von Luminol

in seine oxidierte Form, dessen Lumineszenz detektiert werden kann. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

Detektion und Auswertung der Messungen

Die Detektion der Banden erfolgte mittels LAS4000. Die Belichtungszeiten wurden an die jeweilige Intensität der Banden angepasst. Um die Pre-stained-Ladder abzubilden und um damit die Proteingröße zu bestimmen, ist es notwendig, nach der eigentlichen Belichtung jeweils ein Digitalisierungsbild anzufertigen.

3.7.3 Auswertung

Die Auswertung der Messung erfolgte mit der ImageQuant-TL-Software des Herstellers. Hierbei wurde die Intensität der einzelnen Banden nach Vorgaben des Herstellers gemessen und anschließend auf die jeweiligen GAPDH-Bande normalisiert.

3.8 Statistische Analyse

Zur statistischen Auswertung kam die GraphPad Prism Version 7.0a für Mac OS X zum Einsatz.

3.8.1 Untersuchungen zum Einfluss der häufigen *GUCY1A3*-Variante auf die sGC in Thrombozyten

Die Bewertung der Verteilung der Daten erfolgte mittels D'Agostino-Pearson-Test. Wenn nicht anders angegeben, wurden normalverteilte Daten mit Hilfe des unabhängigen t-Tests und die nicht-normalverteilten Daten mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test ausgewertet. Die Berechnung der Korrelationen erfolgte mittels linearer Regression. Beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen kam in der Regel die one-way ANOVA-Varianzanalyse mit Tukey's-multiple-Comparison, bei kategorischen Variablen der Chi-Quadrat-Test zur Anwendung. P-Werte $< 0,05$ wurden als signifikant bewertet.

3.8.2 Untersuchungen zum Einfluss der häufigen *GUCY1A3*-Genvariante auf die Thrombozytenreaktivität bei KHK-Patienten nach PCI

Kontinuierliche Daten erhielten mittels t-test/ANOVA oder Kruskal-Wallis-Test und die kategorische Daten mittels Chi-Quadrat-Test eine entsprechende Analyse.

IV Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zum Einfluss der häufigen *GUCY1A3*-Genvariante auf die sGC in Thrombozyten

4.1.1 Genotypisierung und Auswahl der Probanden

Das Studienprotokoll erlangte nach Prüfung durch die Ethikkommission der Technischen Universität München seine Genehmigung. Im Rahmen elektiver Einbestellungen wurden 105 Patienten des Deutschen Herzzentrums München für diese Arbeit gescreent, um die Studienteilnehmer zu identifizieren. Alle teilnehmenden Probanden gaben hierzu ihr schriftliches Einverständnis. Über die Krankengeschichte, das Aufnahmelabor sowie die körperliche Untersuchung konnten die unten genannten Parameter gesammelt werden. Bei allen rekrutierten Probanden war bei klinischer Indikation der koronare Gefäßstatus mittels Herzkatheteruntersuchung dargestellt worden.

Die Genotypisierung erfolgte mittels ViiA™ 7 Real-Time-PCR-System und dem Taqman-Assay für die Variante rs7692387 von *GUCY1A3*. Zur Untersuchung des Einflusses des *GUCY1A3*-Genotyps wurden nur homozygote Risiko- und Nicht-Risikoallel-Träger miteinander verglichen, da in diesen Gruppen am ehesten ein Unterschied zu erwarten war. Damit konnten acht homozygote Nicht-Risikoallel-Träger und 14 homozygote Risikoallel-Träger in die Studie eingeschlossen werden. Wie in Tabelle 21 angegeben, ergab sich bezüglich der erhobenen klinischen Parameter kein signifikanter Unterschied zwischen den homozygoten Risikoallel-Trägern und den homozygoten Nicht-Risikoallel-Trägern. In Bezug auf ein vorangegangenes PTCA/Stenting oder eine Bypass-Operation konnte ebenfalls keine signifikante Differenz zwischen den Gruppen gezeigt werden. Auch in den Laborparametern des Routineaufnahmelabors, welches unter anderen die Werte für die Thrombozytenzahl enthält, gab es keine signifikanten Unterschiede. Bei der Anamnese wurde insbesondere auf eine bestehende aggregationshemmende Medikation eingegangen. Homozygote Risikoallel-Träger und homozygote Nicht-Risikoallel-Träger unterschieden sich nicht in der Vormedikation mit ASS oder einem P2Y₁₂-Rezeptor-Hemmer. Auch bezüglich des Geschlechts und Alters gab es keine signifikanten Unterschiede. Nach Herstellung des plättchenreichen Plasmas erfolgte erneut eine Messung der Thrombozytenzahl. Hierbei zeigte sich ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p=0,01$), wobei homozygote Risikoallel-Träger niedrigere Werte aufwiesen.

Tabelle 21: Genotyp-abhängige Merkmalsverteilung im Probandenkollektiv der Thrombozytenaggregationsmessung

Homozygote Risiko- (n=14) und Nicht-Risikoallel-Träger (n=8) unterscheiden sich nicht in Bezug auf das Vorliegen einer KHK, auf die Medikation mit Aspirin oder einem ADP-Rezeptor-antagonisten, bezüglich Alter oder Geschlecht und der Thrombozytenzahl im Vollblut. Ein Unterschied besteht in der Thrombozytenzahl in plättchenreichem Plasma ($p=0,01$). Alter und Thrombozytenzahlen sind als Mittelwert mit Standardfehler angegeben. KHK, koronare Herzkrankheit; PRP, plättchenreiches Plasma. ADP-RA, ADP-Rezeptor-Antagonist (Clopidogrel, Prasugrel und Ticagrelor) [89].

	AA n=8	GG n=14	p
an einer KHK erkrankt, n (%)	2 (25)	5 (36)	>0.99
Routine Aspirin-Therapie, n (%)	2 (25)	7 (50)	0.38
Routine ADP-RA-Therapie, n (%)	0 (0)	0 (0)	>0.99
männliches Geschlecht, n (%)	4 (50)	6 (43)	>0.99
Alter, in Jahren	59 ± 4	67 ± 4	0.17
Vollblut Thrombozytenzahl, 10 ³ /μl	267 ± 17	218 ± 15	0.06
PRP Thrombozytenzahl, 10 ³ /μl	476 ± 22	381 ± 22	0.01

Um den Einfluss einer bestehenden atherosklerotischen Erkrankung auszuschließen, wurden Probanden in einer Untergruppe zusammengeführt, deren Koronarangiographie das Vorliegen einer koronaren Herzkrankheit ausschloss. In dieser Gruppe ergaben sich zwischen den Genotypen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in den untersuchten Merkmalen (s. Tabelle 22).

Tabelle 22: Genotyp-abhängige Merkmalsverteilung im Probandenkollektiv der Thrombozytenaggregationsmessung mit Ausschluss einer Koronaren Herzkrankheit
 Homozygote Risiko- (n=6) und Nicht-Risikoallel-Träger (n=6) unterscheiden sich nicht in Bezug auf die Medikation mit Aspirin oder einem ADP-Rezeptor antagonist, bezüglich Alter oder Geschlecht und der Thrombozytenzahl im Vollblut oder PRP. Alter und Thrombozytenzahlen sind als Mittelwert mit Standardfehler angegeben. KHK, koronare Herzkrankheit; PRP, plättchenreiches Plasma. ADP-RA, ADP-Rezeptor-Antagonist (Clopidogrel, Prasugrel und Ticagrelor) [89].

	AA n=6	GG n=6	p
an einer KHK erkrankt, n (%)	0 (0)	0 (0)	>0.99
Routine Aspirin-Therapie, n (%)	0 (0)	0 (0)	>0.99
Routine ADP-RA-Therapie, n (%)	0 (0)	0 (0)	>0.99
männliches Geschlecht, n (%)	3 (50)	3 (50)	>0.99
Alter, in Jahren	55,2 ± 4,3	54,7 ± 5,4	0.94
Vollblut Thrombozytenzahl, 10 ³ /µl	268 ± 24	241 ± 23	0.42
PRP Thrombozytenzahl, 10 ³ /µl	495 ± 26	423 ± 37	0.14

4.1.2 Assoziation von *GUCY1A3*-Genotyp und mRNA-Expression im Vollblut

Um die Expression von *GUCY1A3* zu untersuchen, wurde eine quantitative Expressionsanalyse durchgeführt. Hierfür musste zunächst mRNA aus dem Vollblut von jeweils vier Probanden, die homozygot das Risikoallel bzw. das Nicht-Risikoallel trugen, isoliert werden. Anschließend wurde die isolierte RNA mittels reverser Transkription in cDNA transkribiert und schließlich durch eine Realtime-PCR quantifiziert. Als Housekeeping-Gen fand *MAPK1* Verwendung.

Im Mittel zeigte sich bei den homozygoten Nicht-Risikoallel-Trägern ein ΔC_T -Wert von -4,528 und ein Wert von -2,072 bei den homozygoten Risikoallel-Trägern. Anschließend wurden die $2^{-\Delta C_T}$ -Werte berechnet, um das Expressionslevel des *GUCY1A3* Gens darzustellen. Hierbei ergaben sich $2^{-\Delta C_T}$ -Werte von 23,8 für die homozygoten Nicht-Risikoallel-Träger und 7,013 für die homozygoten Risikoallel-Träger.

Im T-Test zeigte sich bei den homozygoten Risikoallel-Trägern ein signifikant niedrigeres *GUCY1A3* mRNA Level im Vergleich zu homozygoten Nicht-Risikoallel-Trägern (p = <0,001; s. Abbildung 8)

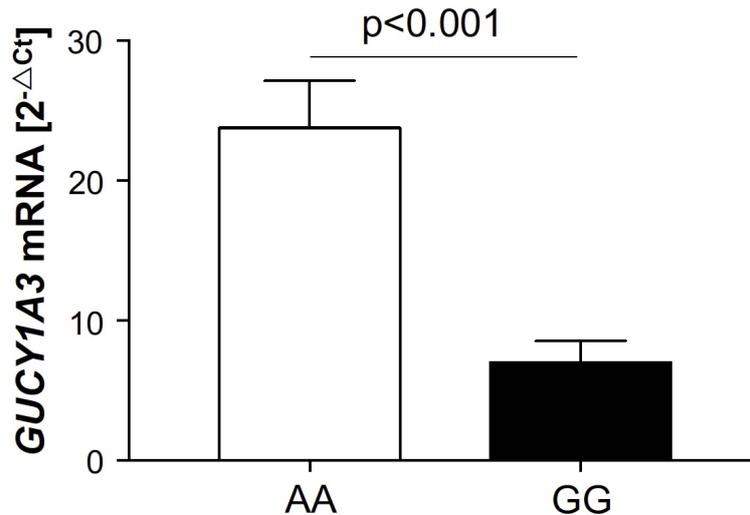


Abbildung 8: Die KHK Risikovariante von rs7692387 im *GUCY1A3*-Gen ist signifikant mit einer reduzierten *GUCY1A3* Expression im Vollblut assoziiert

Die Spiegel des *GUCY1A3*-Transkripts im Vollblut waren signifikant geringer in homozygoten Risikoallel-Trägern (n=4) als in homozygoten Nicht-Risikoallel-Trägern (n=4). Mittelwert und Standardfehler, T-Test.

4.1.3 Assoziation von *GUCY1A3*-Genotyp und NO-abhängiger Inhibition der Thrombozytenaggregation

Homozygote Risikoallel-Träger zeigten im Vergleich zu homozygoten Nicht-Risikoallel-Trägern signifikant reduzierte *GUCY1A3* mRNA-Spiegel im Vollblut. Zur weiterführenden Analyse funktioneller Auswirkungen einer reduzierten α_1 -sGC-Expression, fokussierten wir unsere weiteren Untersuchungen auf die enzymatische Aktivität der löslichen Guanylatzyklase. Eine Steigerung der Aktivität ist mit einer vermehrten Bildung des Second messengers cGMP verbunden, welcher indirekt die Thrombozytenaggregation hemmt. Daher führten wir eine ADP-induzierte Thrombozytenaggregationsmessung mittels optischer Lichttransmissionsaggregometrie durch und stimulierten die sGC mit einem NO-Donor. Aufgrund der Versuchsanordnung und dem geringen Zeitfenster nach Blutentnahme, musste die Messung vor Anwendung der Ein- und Ausschlusskriterien und damit für alle gescreenten Probanden erfolgen.

In der Genotyp abhängigen Auswertung der ADP-induzierten Thrombozytenggregationsmessung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der AUC (= Area-Under-the-Curve/Fläche unter der Kurve) zwischen den homozygoten Risikoallel-Trägern und den homozygoten Nicht-Risikoallel-Trägern (p=0,70). Im Gegensatz hierzu führte die Zugabe von Nitroprussid-Natrium als NO-Donor zu einer stärkeren Hemmung der Thrombozytenaggregation bei homozygoten

Nicht-Risikoallel-Trägern im Vergleich zu homozygoten Risikoallel-Trägern. Der Median der AUC fiel mit 29 bei homozygoten Nicht-Risikoallel-Trägern mit einem p-Wert von $< 0,001$ signifikant niedriger aus als bei homozygoten Risikoallel-Trägern mit einer AUC von 116. Um hierbei den Stellenwert der cGMP-Bildung zu bestimmen, gaben wir in einem dritten Ansatz zusätzlich zu Nitroprussid-Natrium den Phosphodiesterase-5 (PDE-5)-Hemmer Sildenafil hinzu. Die Phosphodiesterase-5 katalysiert den Abbau von cGMP zu GMP, wodurch der Second messenger seine Affinität zur Proteinkinase G und somit seine aggregationshemmende Wirkung verliert. PDE-5-Hemmer wirken dem Abbau von cGMP entgegen und erhöhen dadurch zusätzlich den cGMP-Spiegel im Thrombozyten. Durch die Zugabe von Sildenafil kam es zu einer zusätzlichen Verminderung der Thrombozytenaggregation in beiden Gruppen mit einem stärkeren Effekt bei homozygoten Nicht-Risikoallel-Trägern. Während die AUC bei homozygoten Risikoallel-Trägern hier bei 83,5 lag, zeigte sie sich bei homozygoten Nicht-Risikoallel-Trägern nun mit 20,5 ($p < 0,0001$; s. Abbildung 9).

Um einen Einfluss bestehender atherosklerotischer Veränderungen auf die Thrombozytenfunktion und die Ergebnisse der Aggregometrie auszuschließen, analysierten wir separat eine Untergruppe von Probanden, bei denen eine koronare Herzerkrankung mittels Koronarangiographie ausgeschlossen werden konnte. Hierbei ergaben sich vergleichbare Ergebnisse zu der Analyse im Gesamtkollektiv (s. Abbildung 10).

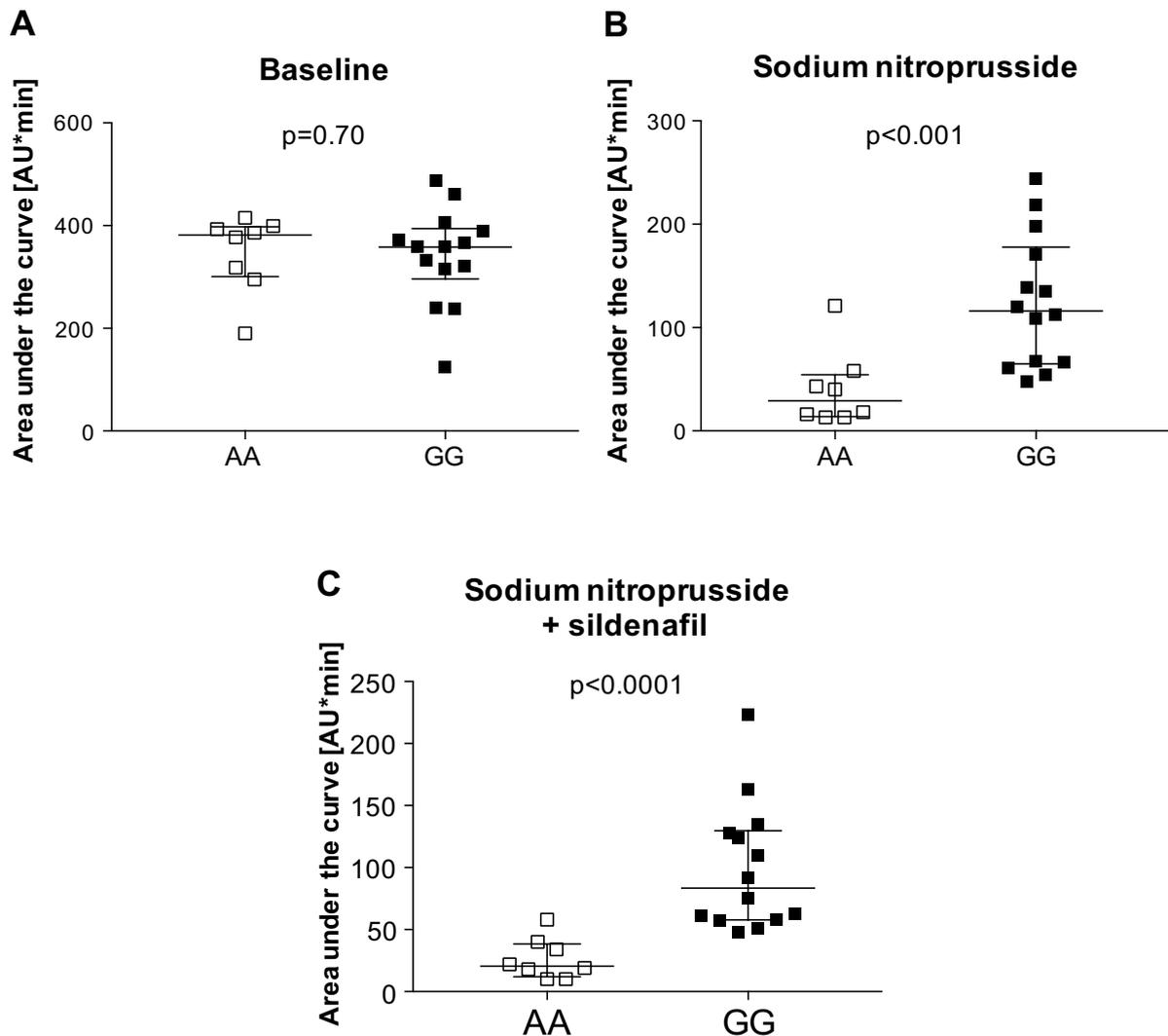


Abbildung 9: Genotyp-abhängige Thrombozytenreaktion auf Stickstoffmonoxid (NO)

A. Die Baseline ADP-induzierte Plättchenaggregation unterschied sich nicht zwischen den Genotypen (n=8 und n=14). **B, C.** Die Zugabe des NO-Donors Nitroprussid Natrium (10 μ M) führte zu einer signifikant stärkeren Hemmung der ADP-induzierten Plättchenaggregation in homozygoten Nicht-Risikoallel-Trägern (n=8) im Vergleich zu homozygoten Risikoallel-Trägern (n=14; p<0,001; **B**) mit zusätzlich stärkerem Effekt nach Inhibition des cGMP-Abbaus durch Sildenafil (10 μ M; p<0,0001; **C**). Median und Interquartilsabstand, Mann-Whitney Test.

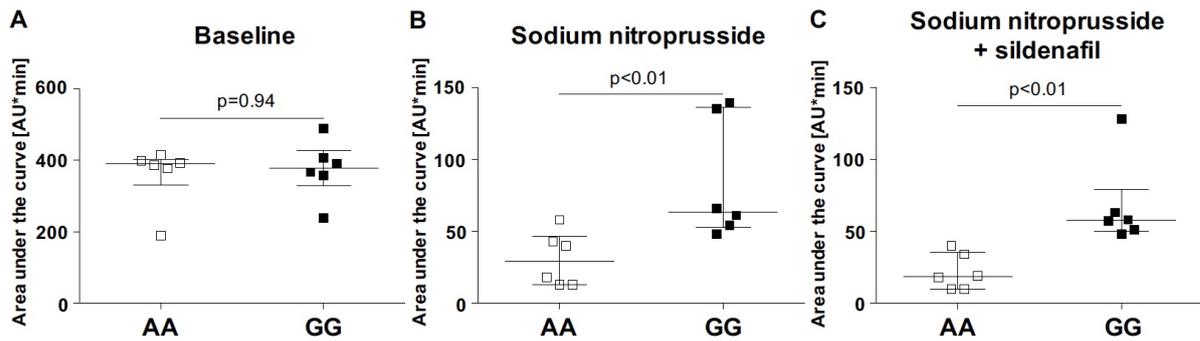


Abbildung 10: Genotyp-abhängige Thrombozytenreaktion auf Stickstoffmonoxid (NO) – nur gesunde Probanden

A. Die Baseline ADP-induzierte Plättchenaggregation unterschied sich nicht zwischen den Genotypen. **B, C.** Die Zugabe des NO-Donors Nitroprussid Natrium (10 μ M) führte zu einer signifikant stärkeren Hemmung der ADP-induzierten Plättchenaggregation in homozygoten Nicht-Risikoallel-Trägern (n=6) im Vergleich zu homozygoten Risikoallel-Trägern (n=6, **B**) mit zusätzlich stärkerem Effekt nach Inhibition des cGMP-Abbaus durch Sildenafil (10 μ M, **C**).

Um den Einfluss des Risikoallels auf die Funktion der sGC weiter zu untersuchen, analysierten wir die Aggregationsdaten der NO-vermittelten Hemmung in Abhängigkeit von der Anzahl der Risikoallele. Hierbei zeigte sich eine stärkere Hemmung der Thrombozytenaggregation durch den NO-Donor je mehr Nicht-Risikoallele vorlagen. Hierzu wurden auch die Daten von vier heterozygoten Individuen eingeschlossen, die nicht in der primären Analyse untersucht wurden (s. Abbildung 11).

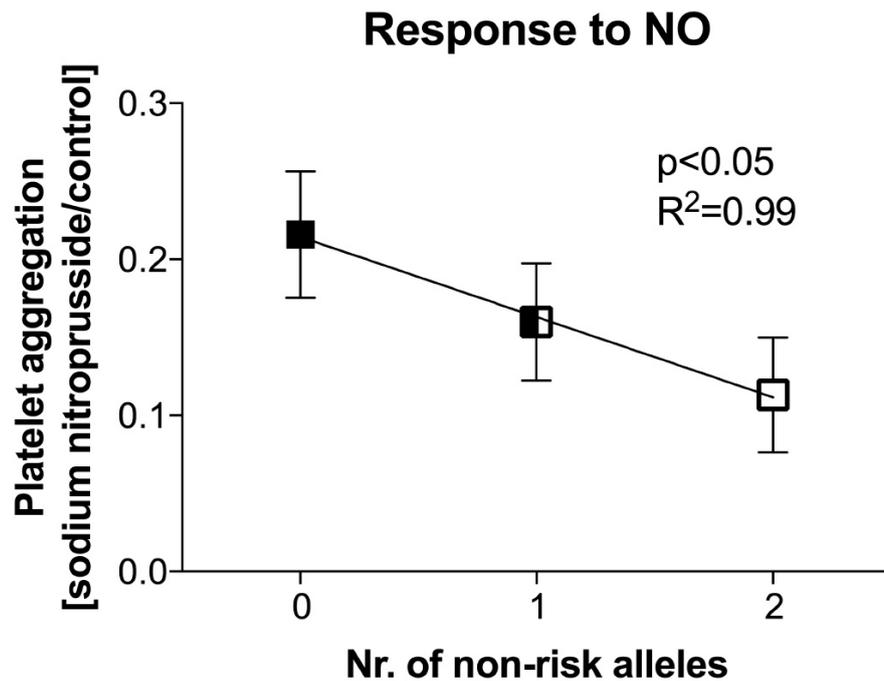


Abbildung 11: Korrelation der Anzahl an *GUCY1A3* Nicht-Risiko-Allelen (A) und der Thrombozytenreaktion auf den NO-Donor Nitroprussid-Natrium bezüglich der Hemmung der Aggregation

Die Anzahl der *GUCY1A3* Nicht-Risikoallele (rs7692387, A) korreliert signifikant mit der Reaktion auf die Zugabe des NO-Donors, d.h. die Hemmung der Thrombozytenaggregation ist stärker je mehr Nicht-Risikoallele vorliegen. Mittelwert und Standardfehler, lineare Regression.

4.1.4 Assoziation zwischen *GUCY1A3*-Genotyp und cGMP-abhängige Phosphorylierung von VASP

Die Aktivierung der Proteinkinase G durch den Second messenger cGMP hat eine Reihe von Phosphorylierungen zur Folge, welche letztendlich zu einer Hemmung der Thrombozytenfunktion beitragen. Während die NO-vermittelte Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase die cGMP-Produktion steigert und somit die Thrombozytenaggregation inhibiert, verhindert der PDE-5-Hemmer Sildenafil den Abbau von cGMP zu GMP. In der Thrombozytenaggregometrie konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Sildenafil die NO-vermittelte Hemmung der Plättchenaggregation zusätzlich verstärkt, was eine Beteiligung von cGMP verdeutlicht. In einem weiteren Schritt sollte nun in einem unabhängigen Assay gezeigt werden, dass der Genotyp mit der cGMP-Bildung assoziiert ist. Hierzu wurde im Anschluss an die Thrombozytenaggregometrie der Grad der cGMP-vermittelten Phosphorylierung des Vasodilatator-stimuliertes Phosphoproteins (VASP) durch die Proteinkinase G bestimmt. Hierzu wurden nach erfolgter Plättchenaggregationsmessung die Thrombozyten aus den jeweiligen Versuchsansätzen isoliert. Anschließend wurde das phosphorylierte Protein (P₂₃₉-VASP)

mittels Western Blot detektiert und quantifiziert. Um Schwankungen in der Proteinmenge auszugleichen, wurde auf die Werte des Housekeeping-Proteins GAPDH normalisiert. Es zeigte sich eine stärkere Phosphorylierung des VASP-Proteins an Serin₂₃₉ nach der Zugabe von Nitroprussid-Natrium bei homozygoten Nichtrisiko-Allel-Trägern als bei Risikoallel-Trägern ($p < 0,01$). Dieser Effekt konnte wiederum bei den Versuchsansätzen, welche zusätzlich den PDE5-Hemmer Sildenafil enthalten, verstärkt dargestellt werden, wobei sich eine signifikant stärkere cGMP-abhängige Phosphorylierung von VASP in homozygoten Nicht-Risikoallel-Trägern im Vergleich zu Risikoallel-Trägern zeigte ($p = 0,02$; s. Abbildung 12).

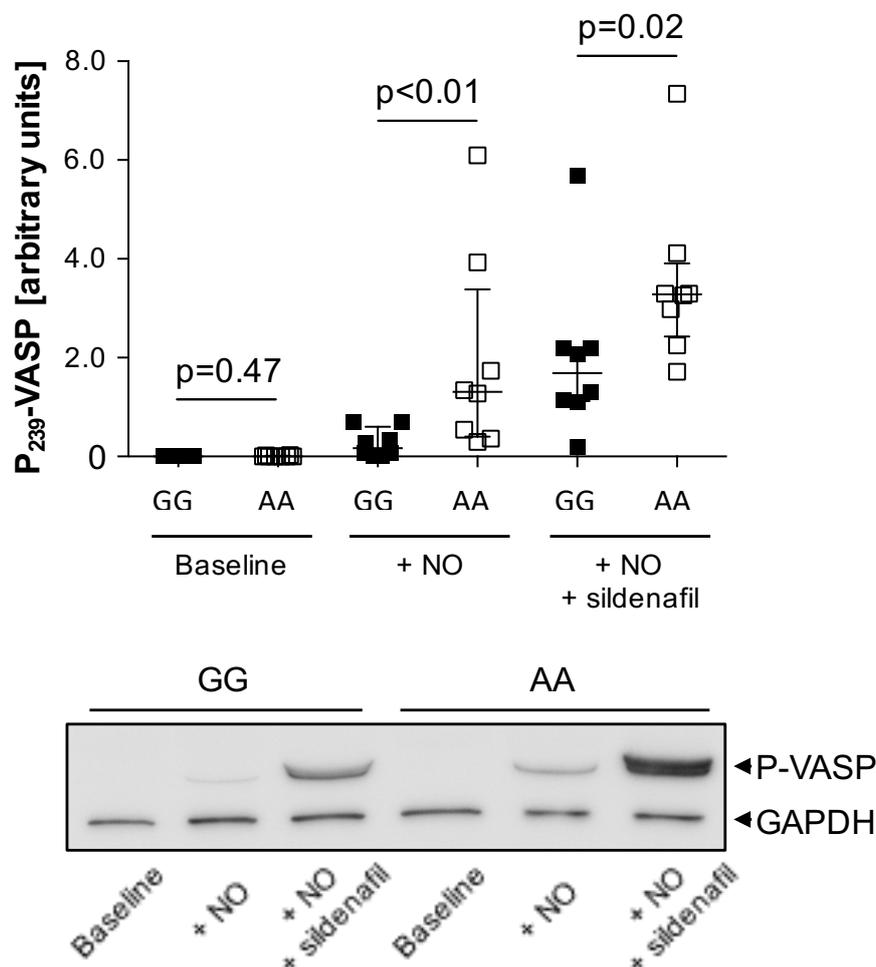


Abbildung 12: Stickstoffmonoxid führt bei homozygoten Nicht-Risikoallel-Trägern zu einer stärkeren cGMP-abhängigen Phosphorylierung von VASP

Die Phosphorylierung von VASP durch die cGMP-abhängige Proteinkinase G (PKG) wurde mittels Western Blot nachgewiesen. Die PKG-abhängige Phosphorylierung von VASP nach Zugabe des NO-Donors Nitroprussid-Natrium in homozygoten Nicht-Risikoallel-Trägern ($n=8$) stärker ($p < 0,01$). Nach zusätzlicher Zugabe von Sildenafil zeigten die homozygoten Nicht-Risikoallel-Träger ($n=8$) weiterhin eine signifikant stärkere Phosphorylierung von VASP im Vergleich zu homozygoten Risikoallel-Trägern ($n=8$; $p=0,02$). Median und Interquartilsabstand, Mann-Whitney-Test.

4.2 Untersuchungen zum Einfluss der häufigen *GUCY1A3*-Varianten auf die Thrombozyten-Reaktivität bei KHK-Patienten nach PCI

4.2.1 Charakteristika der Studienpopulation

Die Charakteristika der Studienpopulation und die Anzahl der Ereignisse werden in Tabelle 23, Tabelle 24 und Tabelle 25 dargestellt. Die Genotyp-Frequenzen entsprachen dem Hardy-Weinberg-Gesetz (Tabelle 26).

Tabelle 23: Beschreibung der untersuchten Studie

PCI, Koronarintervention; P2Y₁₂RA, P2Y₁₂-ADP-Rezeptorantagonist.

Studie	Design	Objekt	n	Therapie	Referenz
ISAR-ASPI	retrospektiv	On-aspirin platelet reactivity and outcome after PCI	1,678	Aspirin + P2Y ₁₂ RA	[16]

Tabelle 24: Populationscharakteristika und Vorstellungsgründe der analysierten ISAR-ASPI-Studie

Kontinuierliche Daten sind als Median [Interquartil-Bereich (IQR)] angegeben. Kategorische Daten sind als absolute Zahlen (%) angegeben. BMI, body mass index; CABG, Koronararterienbypass; NSTEMI, Nicht-ST-Strecken-Hebungs-Myokardinfarkt; STEMI, ST-Strecken-Hebungs-Myokardinfarkt.

Charakteristika	n=1,678
Alter in Jahren	69 [62-76]
männliches Geschlecht	1,334 (79.5)
BMI, kg/m ²	27 [25-30]
arterielle Hypertonie	522 (31.1)
Dyslipidämie	1,253 (74.7)
Diabetes mellitus	509 (30.3)
Myokardinfarkt in Vorgeschichte	590 (35.2)
CABG in Vorgeschichte	282 (16.8)

Vorstellungsgrund	
STEMI	70 (4.2)
NSTEMI	120 (7.2)
instabile Angina Pectoris	409 (24.4)
andere	1079 (64.3)

Tabelle 25: Anzahl der Ereignisse je klinischem Endpunkt innerhalb von 30 Tagen in ISAR-ASPI

CV, kardiovaskulär; MI, Myokardinfarkt; ST, Stentthrombose, CABG, Koronararterienbypass.

klinischer Endpunkt	ISAR-ASPI n=1,678
Tod (CV) oder ST (definitiv/wahrscheinlich), n (%)	12 (0.7)
Tod (alle Ursachen) oder ST (definitiv/wahrscheinlich), n (%)	13 (0.7)
definitive ST, n (%)	7 (0.4)
definitive/wahrscheinliche ST, n (%)	10 (0.6)
Tod (alle Ursachen), n (%)	6 (0.4)
Tod (CV), n (%)	5 (0.3)
MI, n (%)	46 (2.7)
Tod (alle Ursachen) oder MI, n (%)	49 (2.9)
Nicht-CABG geringe oder starke Blutung, n (%)	72 (4,3)
Nicht-CABG starke Blutung, n (%)	19 (1,1)

Tabelle 26: GUCY1A3-Genotyp-Frequenzen für den KHK Lead-SNP (rs7692387) in der untersuchten Studie

Genotyp	ISAR-ASPI n=1,678
GG, n (%)	1,145 (68.2)
AG, n (%)	481 (28.7)
AA, n (%)	52 (3.1)

4.2.2 Assoziation von *GUCY1A3*-Genotyp und ADP-induzierter Thrombozytenaggregation

Als Maßeinheit wurden Aggregationseinheiten (AU, Ordinate) sowie die verstrichene Zeit (min, Abszisse) dargestellt, welche zusammengefasst die Area-under-the-curve (AU x min) bilden. Um eine Assoziation des *GUCY1A3*-Genotyps mit einer erhöhten Thrombozytenreaktivität unter Aspirintherapie zu untersuchen, analysierten wir 1,678 Individuen des ISAR-ASPI-Registers auf den KHK Lead-SNP (rs7692387). Die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation war vom *GUCY1A3*-Genotyp nicht beeinflusst (s. Abbildung 13).

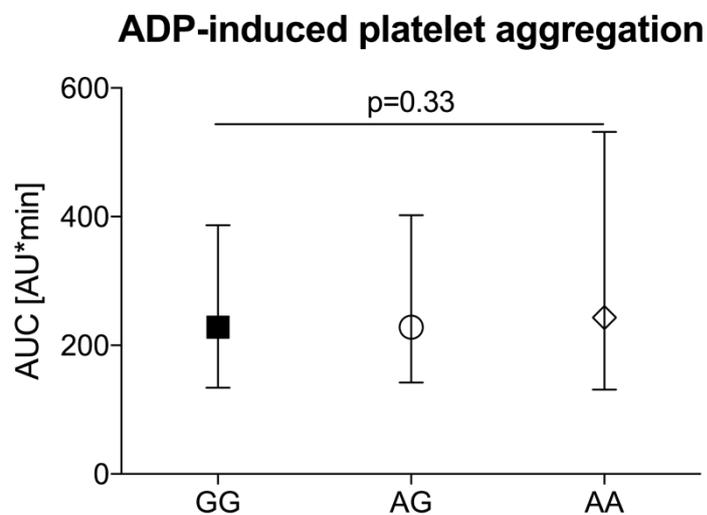


Abbildung 13: Keine Assoziation des *GUCY1A3*-Genotyps mit der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation

Die Träger der verschiedenen Genotypen von *GUCY1A3* zeigten vergleichbare Werte in der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation. AU, willkürliche Einheit (arbitrary units). Median und Interquartilsabstand, Kruskal-Wallis-Test.

4.2.3 Assoziation von *GUCY1A3*-Genotyp und Arachidonsäure (AA) - induzierter Thrombozytenaggregation

In der Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregometrie zeigten homozygote Risikoallel-Träger (Median 171,89 [IQR 91-209] AU·min, n=1,145) eine signifikant höhere Thrombozytenreaktivität unter Aspirintherapie im Vergleich zu Nicht-Risikoallel-Trägern (Median 155,72 [IQR 85-194] AU·min, n=533; $p < 0,01$; Abbildung 14, Abbildung 15A).

Arachidonic acid-induced platelet aggregation

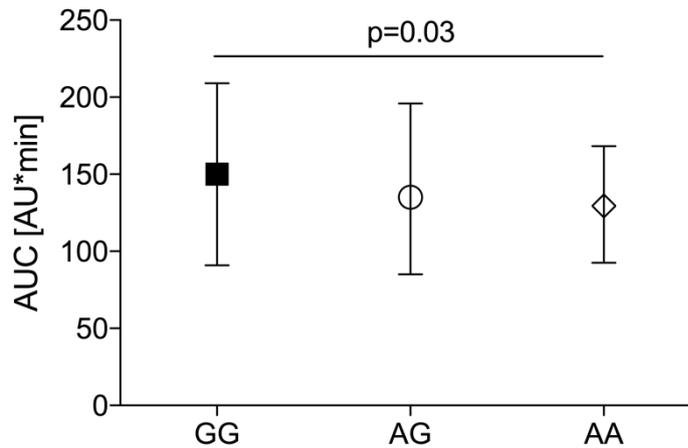


Abbildung 14: Assoziation des *GUCYA3*-Genotyps mit der Thrombozytenreaktivität unter Aspirintherapie

Homozygote Risikoallel-Träger (GG) zeigten die höchsten Werte in der Arachidonsäure induzierten Thrombozytenaggregometrie. AU, willkürliche Einheit (arbitrary units). Median und Interquartilsabstand, Kruskal-Wallis-Test.

4.2.4 Risikostratifizierung unter Berücksichtigung des *GUCY1A3*-Genotyps

Individuen mit einer Thrombozytenreaktivität unter Aspirintherapie, welche in der Arachidonsäure induzierten Thrombozytenaggregometrie den Wert 203 AU·min überschreiten (*high on-aspirin platelet reactivity*), haben ein signifikant erhöhtes Risiko für Komplikationen (Tod oder Stentthrombose) innerhalb des ersten Jahres nach einer Koronarintervention [16]. Um eine Genotyp-abhängige Risikostratifizierung für ischämische Ereignisse zu erstellen, analysierten wir die Verteilung der Genotypen auf die Niedrigrisiko- und Hochrisikogruppe. Hierbei befanden sich mehr homozygote Risikoallel-Träger in der HAPR-Gruppe (n=338/1,145, 29,5%) im Vergleich zu den Nicht-Risikoallel-Trägern (n=129/533, 24,2%; p<0,05, Abbildung 15B). Folglich haben homozygote Risikoallel-Träger ein erhöhtes Risiko für eine hohe Thrombozyten-Reaktivität unter Aspirintherapie (Odds Ratio (OR) 1,31 [95% Konfidenzintervall (KI) 1,04-1,66]).

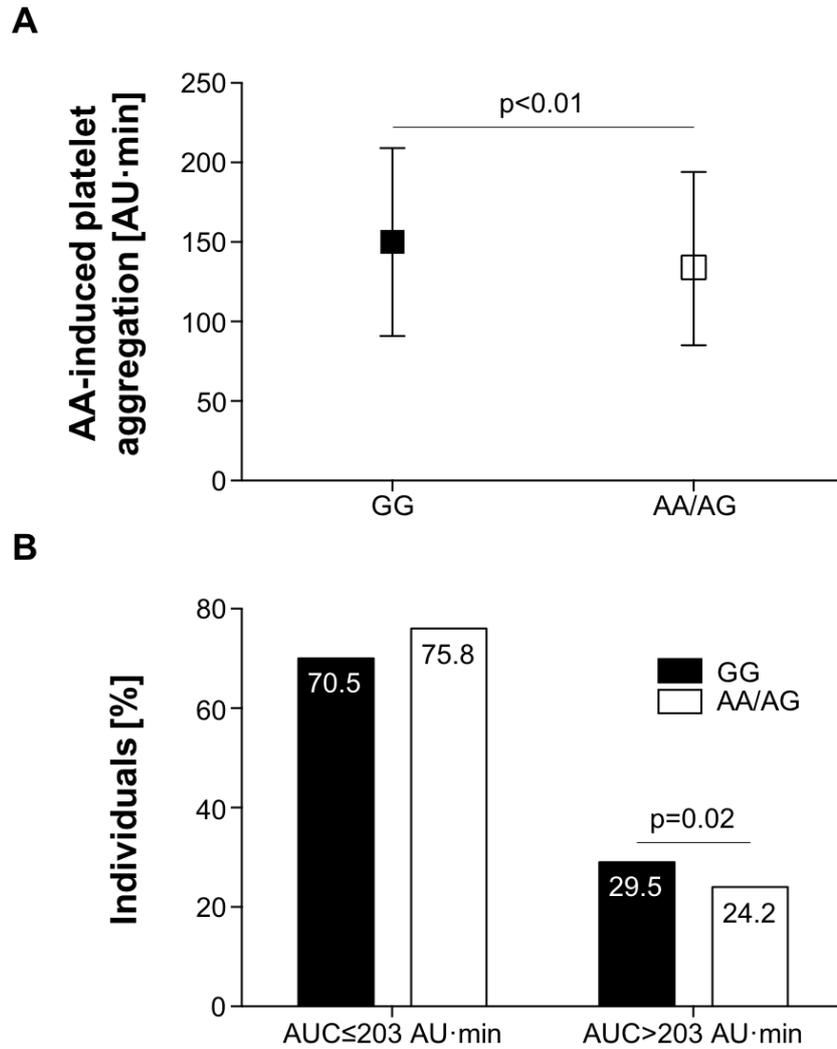


Abbildung 15: Assoziation zwischen dem *GUCY1A3*-Genotyp und der Thrombozytenreaktivität unter Aspirintherapie

A. Homozygote *GUCY1A3*-Risikoallel-Träger (GG, n=1,145) zeigten eine höhere Thrombozytenreaktivität unter Aspirintherapie als Nicht-Risikoallel-Träger (AA/AG, n=533). Median und Interquartilsabstand, Kruskal-Wallis-Test. **B.** In der Gruppe hoher Thrombozytenreaktivität unter Aspirintherapie befanden sich prozentual mehr homozygote Risikoallel-Träger als Nicht-Risikoallel-Träger (AUC > 203 AU·min). AUC, area under the curve. Chi-Quadrat-Test.

V Diskussion

5.1 Einfluss der häufigen *GUCY1A3*-Genvariante auf die sGC-Aktivität in Thrombozyten

Die lösliche Guanylatzyklase ist ein Schlüsselenzym im NO/cGMP-Signalweg und bewirkt über die Bildung von cGMP eine Aktivierung der Proteinkinase G. Diese führt über die Phosphorylierung von Zielproteinen wie beispielsweise VASP zu einer Hemmung der Thrombozytenaggregation (s. Abbildung 16) [90]. Durch die Aufdeckung von Varianten im *GUCY1A3*-Gen, welches für die α_1 -Untereinheit der löslichen Guanylatzyklase kodiert, entstand die Hypothese einer Störung im NO/cGMP-Signalweg mit konsekutiv verminderter Hemmung der Thrombozytenaggregation und dadurch erhöhtem Herzinfarktrisiko. Tatsächlich konnte unsere Arbeitsgruppe in der Vergangenheit bereits den Einfluss von Mutationen und seltenen kodierenden Varianten in *GUCY1A3* auf die Entwicklung der Atherosklerose und des Myokardinfarkts zeigen. In einer Vorarbeit wurde eine Familie mit hoher Prävalenz frühzeitiger koronarer Herzkrankheit (KHK) und Myokardinfarkten (MI) untersucht. Die Familienmitglieder trugen eine seltene digenische Mutation in den Genen für die α_1 -Untereinheit der sGC (*GUCY1A3*) und das Chaperonprotein CCT η (*CCT7*), die eine Funktionseinschränkung der sGC zur Folge hat. Außerdem konnte in Mäusen mit einem Mangel an α_1 -Untereinheit, eine beschleunigte Thrombusbildung gezeigt werden [67]. In anderen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe ist es gelungen bei Patienten mit frühzeitiger koronarer Herzerkrankung und Herzinfarkten außerdem eine Häufung seltener Varianten des *GUCY1A3*-Gens nachzuweisen [91].

Die Projekte beschäftigten sich bisher überwiegend mit seltenen Varianten des *GUCY1A3*-Gens, wodurch zwar die funktionellen Auswirkungen einer deutlich verminderten Aktivität der löslichen Guanylatzyklase dargelegt werden konnten, sich die direkte Relevanz für die Allgemeinbevölkerung allerdings in Grenzen hielt. In dieser Arbeit wurde nun explizit auf die Auswirkungen einer Risikovariante mit einer sehr hohen Risikoallel-Frequenz eingegangen. Genomweite Assoziationsstudien (GWAS) identifizierten den Einzelnukleotid-Polymorphismus rs7692387 im *GUCY1A3*-Gen, der hochsignifikant mit der koronaren Herzkrankheit assoziiert ist [41]. Etwa 60% der westeuropäischen Bevölkerung sind homozygote Risikoallel-Träger und nur etwa 4% homozygote Nicht-Risikoallel-Träger. Bei den meisten, durch genomweite Assoziationsstudien identifizierten Varianten, handelt es sich um Varianten, welche in nicht-kodierenden Genomabschnitten liegen [41]. Folglich resultiert die Assoziation der

Varianten mit dem Phänotyp mechanistisch am ehesten aus einer Änderung der Expressionsregulation. Bisher gab es keine Arbeiten über die funktionellen Auswirkungen der in *GUCY1A3* identifizierten Variante auf zellulärer Ebene. Die Tatsache, dass es sich hierbei um eine sehr häufige Variante mit hochsignifikanter Assoziation zur koronaren Herzkrankheit handelt, sowie die Wahrscheinlichkeit einer Involvierung in die Thrombozytenfunktion, machten weitere Untersuchungen des dahinterstehenden Mechanismus dringend erforderlich. Die Versuche, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, dienten folglich der Erforschung des Mechanismus hinter der genomweiten Assoziation des *GUCY1A3*-Genotyps mit der koronaren Herzkrankheit und dem Myokardinfarkt.

Um den Weg vom Genotyp, über die Genexpression bis hin zu funktionellen Auswirkungen auf die Thrombozytenfunktion zu analysieren, wurde eine Reihe von in-vitro-Versuchen an humanem Material durchgeführt. Patienten unter Therapie mit einem P2Y₁₂-Rezeptorantagonist wurden von der Analyse ausgeschlossen. Die beiden untersuchten Gruppen unterschieden sich nicht in der Therapie mit Acetylsalicylsäure.

In der optischen Lichttransmissionsaggregometrie zeigte sich eine geringere Thrombozytenaggregation nach Zugabe eines NO-Donors bei homozygoten Nicht-Risikoallel-Trägern im Vergleich zu homozygoten Risikoallel-Trägern. Dies ist auf eine stärkere Hemmung der Aggregation durch die Stickstoffmonoxid-abhängige Induktion der löslichen Guanylatzyklase (sGC) mit resultierendem Anstieg des cGMP-Spiegels zurückzuführen. Der Effekt konnte durch eine additive Zugabe des Phosphodiesterase 5 (PDE5)-Hemmers Sildenafil weiter verstärkt werden. PDE5 katalysiert den Abbau des Botenstoffs cGMP, weshalb eine zentrale Bedeutung von cGMP für den zugrundeliegenden Mechanismus naheliegend scheint (s. Abbildung 16). In der anschließenden Messung der Phosphorylierung von VASP an Serin₂₃₉ mittels Western Blot zeigten homozygote Nicht-Risikoallelträger unter NO- bzw. NO- und Sildenafil-Einfluss signifikant höhere Werte im Vergleich zu homozygoten Risikoallel-Trägern. Die Phosphorylierung von VASP wird cGMP-abhängig von der Proteinkinase G (PKG) katalysiert. Aufgrund des höheren Phosphorylierungsgrades von VASP sind erhöhte cGMP-Spiegel bei homozygoten Nicht-Risikoallel-Trägern wahrscheinlich.

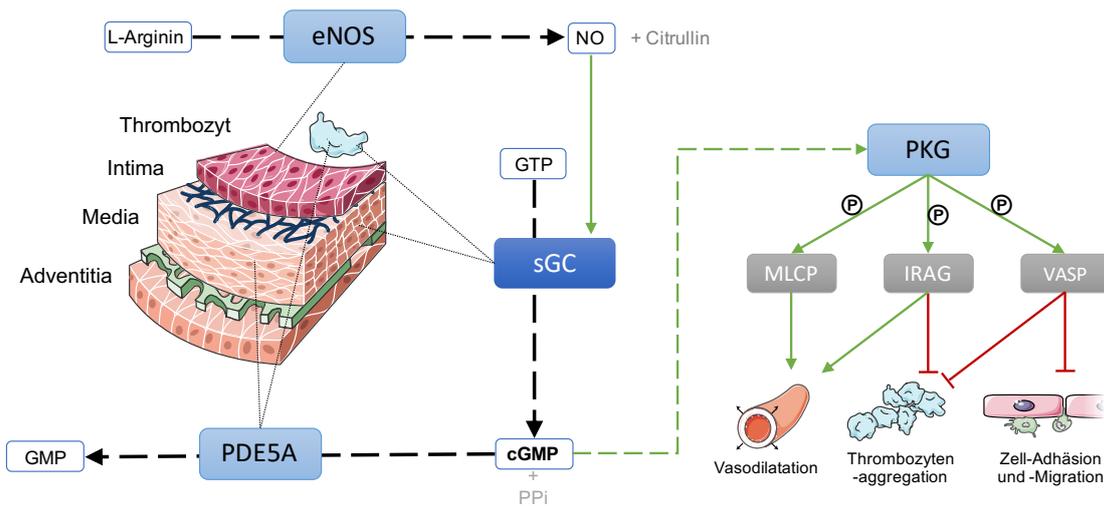


Abbildung 16: Der NO/cGMP Signalweg und seine funktionellen Auswirkungen, u.a. auf die Thrombozytenaggregation

In den Genen, welche für die Enzyme eNOS, sGC und PDE5A kodieren, wurde jeweils ein genomweit mit der KHK assoziierter Genlocus entdeckt. eNOS, Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase. sGC, lösliche Guanylylzyklase. PDE5A Phosphodiesterase 5A. GTP, Guanosintriphosphat. cGMP, cyclischen Guanosinmonophosphat. GMP, Guanosinmonophosphat. PKG, Proteinkinase G. MLCP, Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase. IRAG, IP3-Rezeptor assoziiertes cGMP-Kinase-Substrat. VASP, Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein. Modifiziert nach [92].

Um der Hypothese einer Genotyp-abhängigen Transkription des *GUCY1A3*-Gens nachzugehen, wurde nach RNA-Isolierung eine Genexpressionsanalyse durchgeführt. Diese zeigte eine verminderte *GUCY1A3*-Expression bei homozygoten Risikoallel-Trägern im Vergleich zu homozygoten Nicht-Risikoallel-Trägern ($p=0,001$). Dies legt folglich eine verminderte Proteinexpression in homozygoten Risikoallel-Trägern nahe. In einem Folgeprojekt unserer Arbeitsgruppe wurde die Genotyp-abhängige Expression der $\alpha 1$ -Untereinheit der löslichen Guanylatzyklase in Thrombozyten untersucht. Es zeigte sich eine signifikant verminderte Expression des Proteins bei homozygoten Risikoallel-Trägern im Vergleich zu den homozygoten Nicht-Risikoallel-Trägern (s. Abbildung 17) [89]. Dies bestätigt die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse sowie die Hypothese regulatorischer Auswirkungen der Variante auf die Gen- und Proteinexpression.

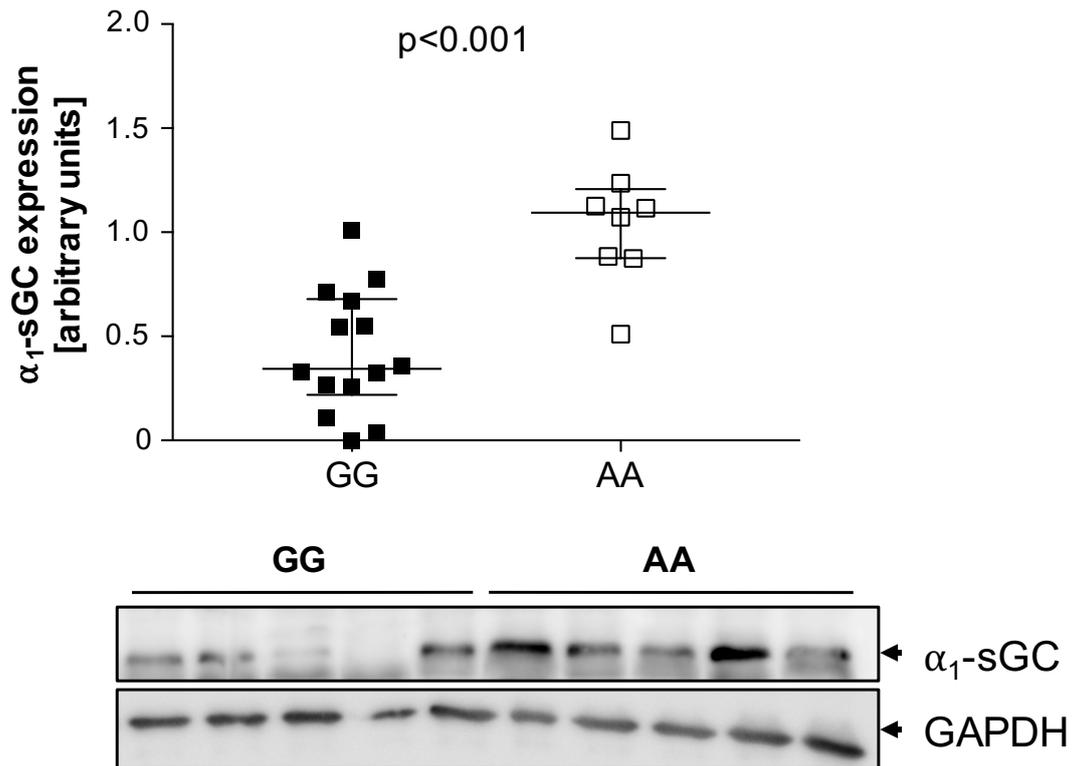


Abbildung 17: Genotyp-abhängige Expression der α_1 -sGC in Thrombozyten

Die Expression der α_1 -sGC war in homozygoten Nicht-Risikoallel-Trägern (n=8) signifikant höher als in homozygoten Risikoallel-Trägern (n=14; $p < 0,001$). Mann-Whitney-Test. Daten mit freundlichem Einverständnis [89]

Eine verminderte Expression der α_1 -Untereinheit der löslichen Guanylatzyklase hat unter NO-Stimulation einen verminderten cGMP-Spiegel und konsekutiv eine verminderte Thrombozytenhemmung zur Folge. Zur weiteren Aufklärung dieses Zusammenhangs wurden die Daten der Proteinexpressionsanalyse aus o.g. Folgeprojekt und die Messergebnisse der ADP induzierten und durch NO gehemmten Plättchenaggregation gegenübergestellt. Zunächst wurden die Werte der ADP-induzierten Plättchenaggregation auf die Baseline-Werte ohne Stickstoffmonoxidzugabe normalisiert. Anschließend wurden sie zusammen mit den Daten der Proteinexpressionsanalyse ausgewertet. Im Rahmen einer Regressionsanalyse zeigte sich eine negative lineare Korrelation. Eine stärkere Expression der α_1 -Untereinheit ist mit einer stärkeren NO-vermittelten Hemmung der Plättchenaggregation assoziiert ($p < 0,01$). Die Datenpunkte der homozygoten Nicht-Risikoallel-Träger befinden sich dabei im Gegensatz zu homozygoten Risikoallel-Trägern im Bereich stärkerer Hemmung der Thrombozytenaggregation durch NO und gleichzeitig im Bereich höherer Expression der α_1 -Untereinheit der löslichen Guanylatzyklase (s. Abbildung 18).

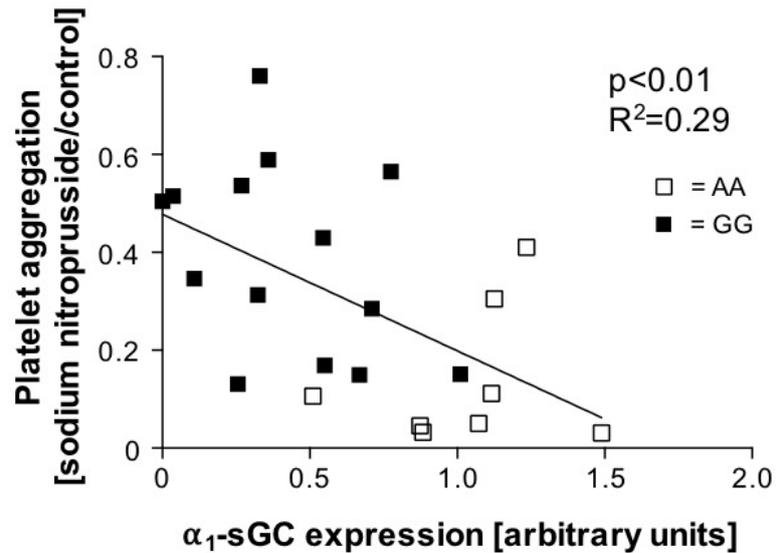


Abbildung 18: Eine stärkere Expression der α_1 -sGC ist signifikant mit einer stärkeren Hemmung der Thrombozytenaggregation durch den NO-Donor Nitroprussid-Natrium assoziiert

Hierbei zeigen homozygote Risikoallel-Träger eine geringere Expression der α_1 -sGC und eine geringere Hemmung der Thrombozytenaggregation durch NO im Vergleich zu homozygoten Nicht-Risikoallel-Trägern.

Zur Analyse der Genotyp-abhängigen Genregulation führte unsere Arbeitsgruppe *in silico* Analysen durch. Hierbei wurden mittels Alibaba2 [83] mögliche Transkriptionsfaktoren-Bindungsstellen für beide Allele des SNPs rs7692387 identifiziert. Es ergaben sich drei potentielle Allel-spezifische Transkriptionsfaktoren in der Region des Basenpaaraustauschs [89] (s. Abbildung 19).



Abbildung 19: Prognose von Transkriptionsfaktoren-Bindungsstellen mittels Alibaba2

Es konnten zwei Bindungsstellen für das Risikoallel G (C/EBP & ICSBP) und eine Bindungsstelle für das Nicht-Risikoallel A (MEB-1) gefunden werden. Analyse mittels Alibaba2 [89].

Alle drei Transkriptionsfaktoren werden nach der „Stockholm atherosclerosis gene expression (STAGE) study“ [93] in Vollblut, in der Arteria mammaria interna sowie in atherosklerotischer Arterienwand exprimiert (s. Tabelle 27).

Tabelle 27: Expression der Transkriptionsfaktoren

Alle untersuchten Transkriptionsfaktoren werden sowohl im Vollblut als auch in der Arteria mammaria interna und in der atherosklerotischen Arterienwand exprimiert [89].

Transkriptionsfaktor	Gewebe		
	Vollblut	Arteria mammaria interna	atherosklerotische Arterienwand
NF-1	+	+	+
Sp1	+	+	+
C/EBP	+	+	+
ICSBP (IRF8)	+	+	+
GAT	+	+	+
MEB-1 (ZEB1)	+	+	+

In einem Luciferase-Reportergen-Assay zeigte sich eine nahezu 50%-ige Reduktion der Luziferase-Aktivität für das Risikoallel im Vergleich zum Nicht-Risikoallel [89]. Die signifikante Assoziation des SNPs rs7692387 mit der koronaren Herzerkrankung scheint

also auf eine Genotyp-abhängige Expression des *GUCY1A3*-Gens zurückführbar zu sein, die auf Allel-spezifischer Bindung von Transkriptionsfaktoren beruht.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Genotyp-spezifische Expression von *GUCY1A3* zu einer geringeren Menge an α_1 -Untereinheit der sGC führt. Dies wiederum hat eine geringere enzymatische Aktivität bei homozygoten Risikoallel-Trägern zur Folge, was niedrigere intrathrombozytäre cGMP-Spiegel nach sich zieht. Durch die niedrigeren cGMP-Spiegel kommt es schließlich zu einer verminderten Phosphorylierung von Zielproteinen wie VASP durch die Proteinkinase G und somit zu einer verminderten Hemmung der Thrombozytenaggregation bei homozygoten Risikoallel-Trägern. Dies könnte im Rahmen einer Plaqueruptur zur beschleunigten Bildung eines gefäßverschießenden Thrombus und somit zum Myokardinfarkt führen.

Aufgrund des Zusammenhangs mit der koronaren Herzkrankheit und dem Myokardinfarkt stellt der NO/cGMP-Signalweg ein vielversprechendes Ziel neuer therapeutischer Ansätze für KHK-Patienten dar. Klinische Studien, die den Nutzen von organischen und anorganischen Nitraten als therapeutische Aktivatoren der löslichen Guanylatzyklase untersuchten, kamen zu widersprüchlichen Ergebnissen [94,95]. Möglicherweise liegt die Ursache im oxidativen Stress durch die Studienmedikation. Im Gegensatz zur Verabreichung von NO-Donoren könnte die direkte Stimulation der löslichen Guanylatzyklase ein wichtiger therapeutischer Ansatz sein. Tatsächlich sind bereits eine Reihe von sGC-Stimulatoren und -Aktivatoren [96] verfügbar und zum Beispiel für die Behandlung von pulmonaler Hypertonie zugelassen [97]. Zudem hat der NO-unabhängige Aktivator der sGC Cinaciguat bereits einen vorteilhaften Effekt in einem Ischämie-Reperfusion Injury Model gezeigt [98].

Als Limitierungen dieser Arbeit sind anzuführen, dass die Versuche in vitro an humanem Material durchgeführt wurden. Dabei entspricht insbesondere die Versuchsanordnung der Lichttransmissionsaggregometrie nicht den Verhältnissen im menschlichen Körper. Durch die Präparation von plättchenreichem Plasma wurden die meisten korpuskulären Blutbestandteile entfernt, die in vivo zusätzlich mit Thrombozyten interagieren und einen Einfluss auf die Aggregation haben könnten. In der klinischen Routinediagnostik der Thrombozytenfunktion gilt heutzutage die elektrische Impedanzaggregometrie mit Vollblut als Standard, jedoch fiel die Wahl des Aggregometrieverfahrens in dieser Arbeit bewusst auf die Lichttransmission. Da hierbei, wie oben beschrieben, zunächst korpuskuläre Blutbestandteile wie Erythrozyten und Leukozyten entfernt werden, können die Auswirkungen auf Thrombozyten isoliert analysiert werden, welche aufgrund des untersuchten Signalweges und ihrer Rolle bei der Atherosklerose und dem Myokardinfarkt im Mittelpunkt der Arbeit stehen.

Verfälschungen der Ergebnisse durch Interaktionen anderer Blutbestandteile mit Reagenzien oder Thrombozyten können hierbei weitestgehend ausgeschlossen werden. Ein Nachteil dieses Messverfahrens besteht im zeitlichen Fenster zwischen Blutentnahme und Messung. Dieser Zeitfaktor wurde nach Möglichkeit auf ein Minimum reduziert, konnte jedoch aufgrund der Versuchsanordnung nicht gänzlich vermieden werden. Fachspezifische Arbeiten für das Verfahren empfehlen eine Zeitspanne von maximal 3 Stunden zwischen Probenentnahme und Beendigung der Thrombozytenaggregometrie [99]. Um mögliche Nebeneffekte zu verhindern, wurde die limitierende Zeitspanne in dieser Arbeit stets strikt eingehalten.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit der Mechanismus untersucht, welcher für die Assoziation der häufigen Variante des *GUCY1A3*-Gens rs7692387 mit der koronaren Herzkrankheit und dem Myokardinfarkt verantwortlich ist. Hierbei konnten wir zeigen, dass der untersuchte Locus Einfluss auf die Expression der α_1 -Untereinheit der löslichen Guanylatzyklase hat. Homozygote Risikoallel-Träger zeigten dabei eine verminderte Genexpression, wodurch es letztendlich zu einer verminderten Hemmung der Thrombozytenaggregation durch das körpereigene Stickstoffmonoxid (NO) kam. Dieser Genotyp abhängige Risikofaktor für eine koronare Herzkrankheit bzw. einen Myokardinfarkt stellt einen interessanten Ansatzpunkt für individuelle Therapieoptionen für Risikoallel-Trägern dar. Hierfür käme beispielsweise eine Modulierung der Aktivität der löslichen Guanylatzyklase oder der Eingriff in resultierende Effekte im Zellstoffwechsel in Frage.

5.2 Einfluss der häufigen *GUCY1A3*-Genvariante auf die Thrombozytenreaktivität unter Aspirintherapie

Im zweiten Teil dieser Arbeit konnten wir einen signifikanten Einfluss der Variante rs7692387 im KHK-Risikogen *GUCY1A3* auf die Thrombozytenreaktivität unter Aspirintherapie zeigen. Bei homozygoten Risikoallel-Trägern fand sich hierbei eine signifikant höhere Thrombozytenreaktivität im Vergleich zu homozygoten Nicht-Risikoallel-Trägern. Zur Untersuchung des Genotyp-abhängigen klinischen Outcomes erfolgte zudem eine kombinierte Analyse zweier Studienpopulationen. Es wurden Individuen des ISAR-ASPI-Registers (n=1.678) und des Clopidogrel-Arms der PLATO-Studie (n=3.326) eingeschlossen, wodurch eine Patientenzahl von 5.004 erreicht wurde. Homozygote Risikoallel-Träger zeigten hierbei ein erhöhtes Risiko für den klinischen Endpunkt „Tod kardiovaskulärer Genese oder Stentthrombose“ im Vergleich zu Nicht-Risikoallel-Trägern (Hazard Ratio (HR) 1,65 [95 % CI 1,03-2,65], p=0,04; Abbildung 20).

Ähnliche Trends, jedoch ohne statistische Signifikanz, konnten für andere klinische Endpunkte festgestellt werden (Abbildung 21).

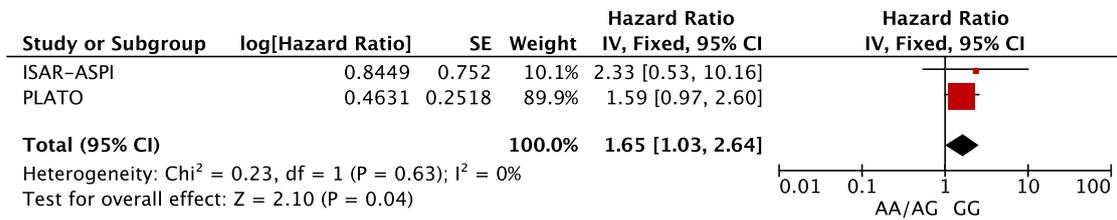


Abbildung 20: Assoziation des GUCY1A3-Genotyps und Tod kardiovaskulärer Genese oder Stentthrombose

Homozygote Risikoallel-Träger (GG) haben ein erhöhtes Risiko für den klinischen Endpunkt des Todes kardiovaskulärer Genese oder Stentthrombose im Vergleich zu Nicht-Risikoallel-Trägern (AA/AG). CI, Konfidenzintervall; SE, Standardfehler (standard error). [100]

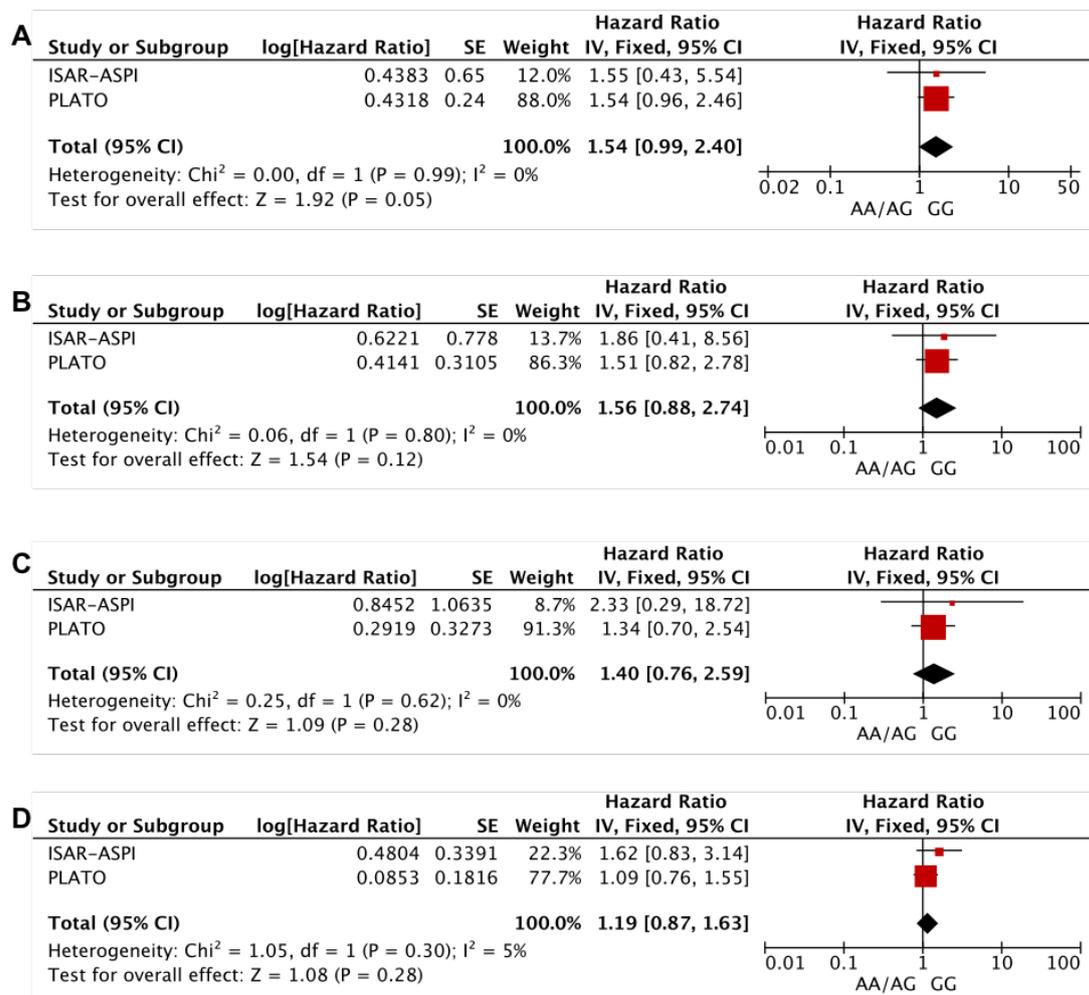


Abbildung 21: Assoziation des GUCY1A3-Genotyps mit anderen klinischen Endpunkten (innerhalb von 30 Tagen nach Koronarintervention)

Homozygote Risikoallel-Träger zeigten einen Trend zu einem erhöhten Risiko für „Tod jeglicher Ursache oder Stentthrombose“ (A), definitiver oder wahrscheinlicher Stentthrombose (B), Tod

jeglicher Genese (**C**) und Tod jeglicher Genese oder Myokardinfarkt (**D**). CI, Konfidenzintervall; SE, Standardfehler (standard error). [100]

GUCY1A3-Genotyp und das Blutungsrisiko nach PCI

Im Rahmen der kombinierten Analyse der klinischen Endpunkte wurde auch auf das Blutungsrisiko nach einer Koronarintervention eingegangen. Geringe sowie ausgeprägte Blutungen, welche nicht im Rahmen einer koronaren Bypass-Operation stattfanden, wurden als Endpunkt gewählt (nicht CABG-assoziierte Blutungen). Wir konnten weder einen Genotyp abhängigen Effekt auf die Gesamtheit der nicht CABG-assoziierten Blutungen innerhalb von 30 Tagen nach Koronarintervention (OR 0,92 [95% CI 0,71-1,19], $p=0,52$; Abbildung 22) noch auf ausgeprägte nicht CABG-assoziierten Blutungen (OR 0,99 [95% CI 0,69-1,43], $p=0,97$; Abbildung 23) feststellen.

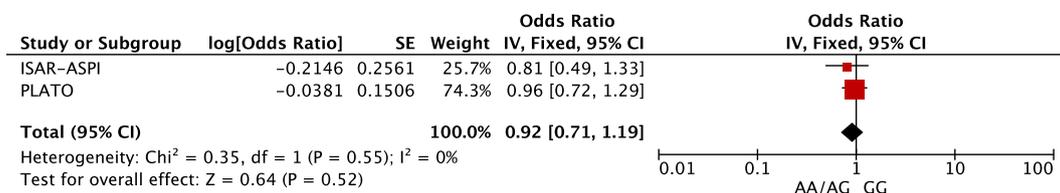


Abbildung 22: Assoziation des *GUCY1A3*-Genotps mit nicht-CABG-assoziierten-Blutungen

Der *GUCY1A3*-Genotyp war nicht mit einem erhöhten Blutungsrisiko innerhalb von 30 Tagen nach Koronarintervention assoziiert. CI, Konfidenzintervall; SE, Standardfehler (standard error). [100]

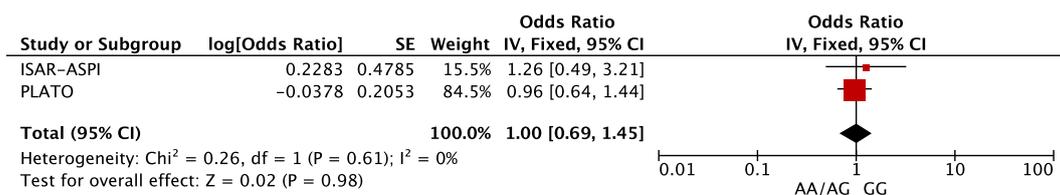


Abbildung 23: Assoziation des *GUCY1A3*-Genotps und ausgeprägten nicht-CABG-assoziierten-Blutungen

Der *GUCY1A3*-Genotyp war nicht mit einem erhöhten Risiko assoziiert, innerhalb von 30 Tagen nach Koronarintervention eine ausgeprägte nicht-CABG-assoziierte-Blutung zu erleiden. CI, Konfidenzintervall; SE, Standardfehler (standard error). [100]

In dieser Arbeit konnten wir zum ersten Mal eine signifikante Assoziation eines KHK-Risikogens mit der Thrombozytenreaktivität unter Aspirintherapie nachweisen. Zudem war der *GUCY1A3*-Genotyp auch mit einem schlechteren Outcome durch kardiovaskulär bedingten Tod oder Stentthrombose innerhalb von 30 Tagen nach Koronarintervention

assoziiert. Eine Assoziation mit einer erhöhten Blutungswahrscheinlichkeit ergab sich hierbei nicht.

Der NO/cGMP-Signalweg ist schon seit Langem für seine Auswirkungen auf die Thrombozytenaggregation bekannt. Die Aktivierung der intrathrombozytären sGC durch Nitroprussid-Natrium *in vitro* führt zu einer erheblichen Steigerung der intrathrombozytären cGMP Konzentration [101], was wiederum die cGMP-abhängige Proteinkinase G aktiviert. Diese phosphoryliert intrazelluläre Zielproteine wie IRAG und VASP, welche eine Rolle bei der cGMP-abhängigen Hemmung der Thrombozytenaggregation spielen [102,103]. Es wurde bereits gezeigt, dass ADP alleine keine Auswirkungen auf den intrazellulären cGMP-Spiegel hat [101]. Im Gegensatz hierzu konnte gezeigt werden, dass Arachidonsäure den cGMP-Spiegel in Thrombozyten Dosis-abhängig signifikant senkt. Dieser Effekt kann durch eine Indomethacin-induzierte Hemmung der Cyclooxygenase 1 und 2 aufgehoben werden [104]. In homozygoten *GUCY1A3*-Risikoallel-Trägern konnten nun geringere Spiegel der α_1 -Untereinheit der löslichen Guanylatzyklase nachgewiesen werden [89]. Als Folge könnte die Reduktion des intrathrombozytären cGMP-Spiegels als Reaktion auf eine Arachidonsäure-Exposition in homozygoten *GUCY1A3*-Risikoallel-Trägern stärker ausgeprägt sein. Dies stimmt mit den hier erhobenen Daten überein, welche eine Assoziation zwischen *GUCY1A3*-Genotyp und der Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregation unter Aspirintherapie, jedoch nicht mit der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation zeigen. Dieser Mechanismus ist in Abbildung 24 dargestellt und illustriert wie intrathrombozytäre cGMP-Spiegel sowie die VASP-Phosphorylierung von Arachidonsäure beeinflusst werden könnten.

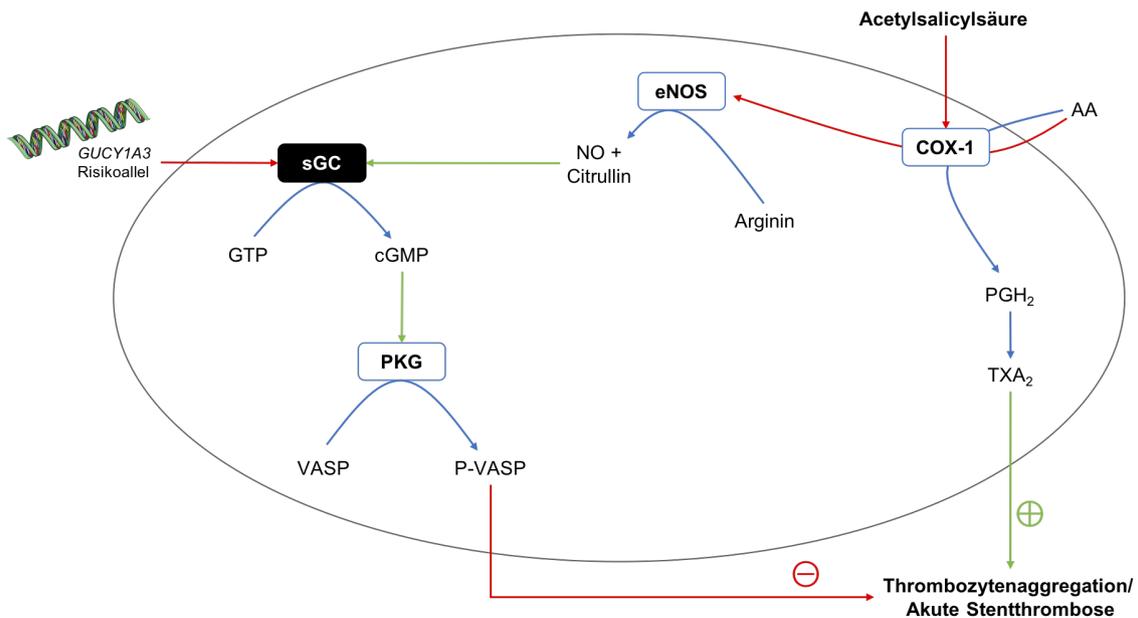


Abbildung 24: Hypothetische Interaktionen des Arachidonsäure-Metabolismus und des NO/cGMP-Signalweges in Thrombozyten

Es konnte bereits gezeigt werden, dass Arachidonsäure direkt die Stickstoffmonoxid-Bioverfügbarkeit in Thrombozyten reduziert, was durch die Inhibition der Cyclooxygenase 1 verhindert werden kann.

Ein weiterer möglicher Mechanismus involviert die cAMP-abhängige Phosphorylierung von VASP. Es wurde bereits gezeigt, dass cAMP zu einem gewissen Anteil analog zu cGMP die Thrombozytenaggregation über VASP hemmt [103]. In Thrombozyten wird Arachidonsäure durch die Cyclooxygenase 1 (COX 1) zu Prostaglandin H₂ (PGH₂) metabolisiert. Anschließend katalysiert die Thromboxan-Synthase die Bildung von Thromboxan A₂ (TXA₂) aus PGH₂, wodurch wiederum die Thrombozytenaggregation induziert wird [105]. Zusätzlich wird PGH₂ von der Prostaglandin E Synthase in Thrombozyten zu Prostaglandin E₂ (PGE₂) umgewandelt [106]. Aus Thrombozyten oder der Gefäßwand freigesetztes PGE₂, aktiviert den EP3-Rezeptor auf Thrombozyten und führt so zur Aggregation und Atherothrombose [107]. Die Aktivierung des EP2-Rezeptors führt über einen G_i-gekoppelten Rezeptor zu einer Reduktion des intrazellulären cAMP-Spiegels [108,109]. Schließlich führt die Phosphorylierung von VASP an Ser₁₅₇ durch die Inhibition des IIb/IIIa Rezeptors zu einer Hemmung der Plättchenaggregation [49]. Dieser hypothetische Mechanismus ist in Abbildung 25 dargestellt und stellt eine weitere Möglichkeit dar, wie intrathrombozytäre cGMP-Spiegel sowie die VASP-Phosphorylierung von Arachidonsäure beeinflusst werden können.

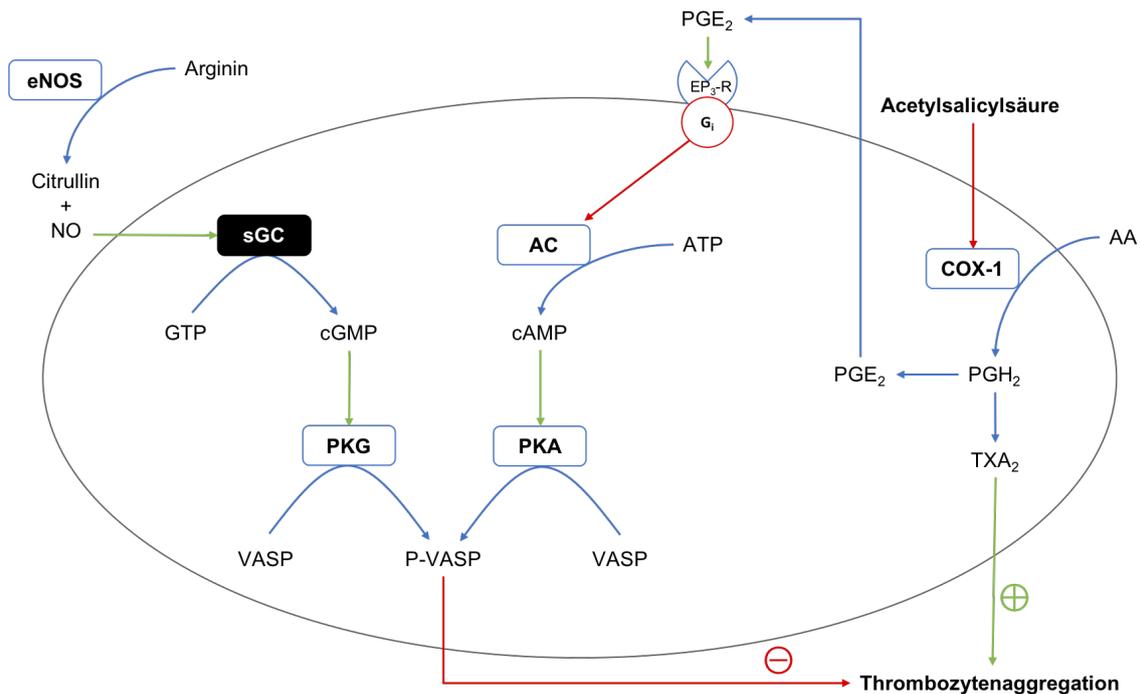


Abbildung 25: Hypothetische Interaktionen des Arachidonsäure-Metabolismus und des NO/cGMP-Signalweges in Thrombozyten

Der Einfluss von Metaboliten der Arachidonsäure auf den cGMP/cAMP-Signalweg. Die Verfügbarkeit und Aktivität der sGC wird durch den *GUCY1A3*-Genotyp beeinflusst.

Möglicherweise ist Aspirin in der Lage diesen Effekt zu einem gewissen Grad zu kompensieren. Im Falle einer reduzierten Verfügbarkeit oder Aktivität der sGC, wie beispielsweise bei homozygoten *GUCY1A3*-Risikoallel-Trägern [89], könnte dieser Aspirineffekt jedoch insuffizient sein.

Nach wie vor stellen ischämische Ereignisse in Folge einer Koronarintervention eine ernstzunehmende Komplikation dar. Eine hohe Thrombozytenreaktivität unter Aspirintherapie (High on-aspirin platelet reactivity – HAPR) konnte bereits als Biomarker für ischämische Ereignisse nach einer Koronarintervention identifiziert werden [16]. Die Daten dieser Arbeit legen nahe, dass die sogenannte „Aspirinresistenz“ oder HAPR nicht, wie zuvor angenommen, auf eine Non-Compliance bei der Medikamenteneinnahme zurückzuführen ist [110,111]. Im Rahmen der „Aspirinresistenz“ ist zudem die Optimierung der Aspirindosierung sowie der Dosierungsintervalle Teil der Diskussion [17]. In dieser Arbeit konnten wir erstmals zeigen, dass ein genetischer KHK-Risikofaktor, welcher nicht unmittelbar am Arachidonsäure-Metabolismus, sondern am NO/cGMP-Signalweg von Thrombozyten beteiligt ist, mit einer erhöhten Thrombozytenreaktivität unter Aspirintherapie sowie einem ungünstigen Outcome assoziiert ist.

In diesem Zusammenhang soll jedoch auch auf die Limitationen der angewandten Methodik eingegangen werden. So konnten die intrathrombozytären Konzentrationen von sGC oder cGMP nicht bestimmt werden, was eine sichere Aussage über die kausalen Zusammenhänge des *GUCY1A3*-Genotyps mit der Thrombozytenreaktivität unter Aspirintherapie nicht erlaubt. Die aus der umfangreichen Literatur stammenden Kenntnisse über die Signalkaskade lassen einen kausalen Zusammenhang jedoch als sehr wahrscheinlich erscheinen. Eine weitere Einschränkung stellt die Assoziation des *GUCY1A3*-Genotyps ausschließlich mit einem kombinierten Endpunkt (Tod kardiovaskulärer Genese oder Stentthrombose) dar. Leider waren die Daten für ischämische Endpunkte innerhalb von 30 Tagen spärlich und wir konnten keine weiteren Kohorten ausfindig machen, um die Probenanzahl und Power der Studie zu erhöhen. Daher war es nicht möglich, Assoziationen des *GUCY1A3*-Genotyps mit beispielsweise endgültigen Stentthrombosen zu finden. Als Einschränkung ist zudem aufzuführen, dass wir nur den Clopidogrel-Arm der PLATO-Studie untersuchen konnten. Da 95% der Individuen des ISAR-ASPI-Registers zusätzlich zu Aspirin auch Clopidogrel nahmen [16], sind wir nicht in der Lage unsere Ergebnisse auch auf die Kombination mit anderen ADP-Rezeptor-Antagonisten zu übertragen.

Zusammenfassend kann man aus den Ergebnissen schließen, dass die Kenntnis über den *GUCY1A3*-Genotyp hilfreich bei der Einschätzung des individuellen Risikos für ischämische Ereignisse nach einer Koronarintervention geben kann. Ob das Wissen über den *GUCY1A3*-Genotyp im klinischen Alltag dabei helfen kann, Hochrisiko-Patienten zu identifizieren oder maßgeschneiderte Therapiepläne zur Thrombozytenhemmung zu erstellen, ist Bestandteil aktueller Forschung.

VI Literaturverzeichnis

- 1 Timmis A, Townsend N, Gale C, Grobbee R, Maniadakis N, Flather M, Wilkins E, Wright L, Vos R, Bax J, Blum M, Pinto F, Vardas P, ESC Scientific Document Group. European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2017. *European heart journal* 2018; 39: 508–579
- 2 Townsend N, Nichols M, Scarborough P, Rayner M. Cardiovascular disease in Europe 2015: epidemiological update. *European heart journal* 2015; 36: 2673–2674
- 3 Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Blaha MJ, Dai S, Ford ES, Fox CS, Franco S, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Huffman MD, Judd SE, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Mackey RH, Magid DJ, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, McGuire DK, Mohler ER3, Moy CS, Mussolino ME, Neumar RW, Nichol G, Pandey DK, Paynter NP, Reeves MJ, Sorlie PD, Stein J, Towfighi A, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB, American Heart Association Statistics C, Stroke Statistics S. Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2014; 129: e28–e292
- 4 Gupta R, Joshi P, Mohan V, Reddy KS, Yusuf S. Epidemiology and causation of coronary heart disease and stroke in India. *Heart* 2008; 94: 16–26
- 5 Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation* 2005; 111: 3481–3488
- 6 Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 2011; 473: 317–325
- 7 Finn AV, Nakano M, Narula J, Kolodgie FD, Virmani R. Concept of vulnerable/unstable plaque. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2010; 30: 1282–1292
- 8 Davies MJ. Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture 1995. *Circulation* 1996; 94: 2013–2020
- 9 Ylä-Herttuala S, Bentzon JF, Daemen M, Falk E, Garcia-Garcia HM, Herrmann J, Hoefler I, Jukema JW, Krams R, Kwak BR, Marx N, Naruszewicz M, Newby A, Pasterkamp G, Serruys PWJC, Waltenberger J, Weber C, Tokgözoğlu L. Stabilisation of atherosclerotic plaques. Position paper of the European Society of Cardiology (ESC) Working Group on atherosclerosis and vascular biology. *Thrombosis and haemostasis* 2011; 106: 1–19
- 10 Aoki J, Lansky AJ, Mehran R, Moses J, Bertrand ME, McLaurin BT, Cox DA, Lincoff AM, Ohman EM, White HD, Parise H, Leon MB, Stone GW. Early stent thrombosis in patients with acute coronary syndromes treated with drug-eluting and bare metal stents: the Acute Catheterization and Urgent Intervention Triage Strategy trial. *Circulation* 2009; 119: 687–698
- 11 Bonello L, Tantry US, Marcucci R, Blindt R, Angiolillo DJ, Becker R, Bhatt DL, Cattaneo M, Collet JP, Cuisset T, Gachet C, Montalescot G, Jennings LK, Kereiakes D, Sibbing D, Trenk D, Van Werkum JW, Paganelli F, Price MJ, Waksman R, Gurbel PA, Working Group on High On-Treatment Platelet

- Reactivity. Consensus and future directions on the definition of high on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate. 2010: 919–933
- 12 Gurbel PA, Bliden KP, Hiatt BL, O'Connor CM. Clopidogrel for coronary stenting: response variability, drug resistance, and the effect of pretreatment platelet reactivity. *Circulation* 2003; 107: 2908–2913
- 13 Tantry US, Bonello L, Aradi D, Price MJ, Jeong Y-H, Angiolillo DJ, Stone GW, Curzen N, Geisler T, Berg Ten J, Kirtane A, Siller-Matula J, Mahla E, Becker RC, Bhatt DL, Waksman R, Rao SV, Alexopoulos D, Marcucci R, Reny J-L, Trenk D, Sibbing D, Gurbel PA, Working Group on On-Treatment Platelet Reactivity. Consensus and update on the definition of on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate associated with ischemia and bleeding. 2013: 2261–2273
- 14 Hulot J-S, Bura A, Villard E, Azizi M, Remones V, Goyenville C, Aiach M, Lechat P, Gaussem P. Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism is a major determinant of clopidogrel responsiveness in healthy subjects. *Blood* 2006; 108: 2244–2247
- 15 Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Hockett RD, Brandt JT, Walker JR, Antman EM, Macias W, Braunwald E, Sabatine MS. Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel. *The New England journal of medicine* 2009; 360: 354–362
- 16 Mayer K, Bernlochner I, Braun S, Schulz S, Orban M, Morath T, Cala L, Hoppmann P, Schunkert H, Laugwitz KL, Kastrati A, Sibbing D. Aspirin treatment and outcomes after percutaneous coronary intervention: results of the ISAR-ASPI registry. *Journal of the American College of Cardiology* 2014; 64: 863–871
- 17 Patrono C. The Multifaceted Clinical Readouts of Platelet Inhibition by Low-Dose Aspirin. *Journal of the American College of Cardiology* 2015; 66: 74–85
- 18 Kannel WB, DAWBER TR, KAGAN A, REVOTSKIE N, STOKES J. Factors of risk in the development of coronary heart disease--six year follow-up experience. The Framingham Study. *Ann Intern Med* 1961; 55: 33–50
- 19 Mayer B, Erdmann J, Schunkert H. Genetics and heritability of coronary artery disease and myocardial infarction. *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society* 2007; 96: 1–7
- 20 D'Agostino RBS, Vasan RS, Pencina MJ, Wolf PA, Cobain M, Massaro JM, Kannel WB. General cardiovascular risk profile for use in primary care: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2008; 117: 743–753
- 21 Nabel EG, Braunwald E. A tale of coronary artery disease and myocardial infarction. *The New England journal of medicine* 2012; 366: 54–63
- 22 Flesch M, Rosenkranz S, Erdmann E, Böhm M. Alcohol and the risk of myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 2001; 96: 128–135
- 23 Assmann G, Cullen P, Heinrich J, Schulte H. Hemostatic variables in the prediction of coronary risk: results of the 8 year follow-up of healthy men in the Münster Heart Study (PROCAM). *Prospective Cardiovascular Münster Study. Isr J Med Sci* 1996; 32: 364–370

- 24 Eckardstein von A, Schulte H, Cullen P, Assmann G. Lipoprotein(a) further increases the risk of coronary events in men with high global cardiovascular risk. *Journal of the American College of Cardiology* 2001; 37: 434–439
- 25 Gielen S, Schuler G, Hambrecht R. Exercise training in coronary artery disease and coronary vasomotion. *Circulation* 2001; 103: E1–E6
- 26 Grundy SM, Pasternak R, Greenland P, Smith SJ, Fuster V. Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology. *Circulation* 1999; 100: 1481–1492
- 27 van Guldener C, Stehouwer CD. Hyperhomocysteinemia, vascular pathology, and endothelial dysfunction. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26: 281–289
- 28 Haim M, Benderly M, Brunner D, Behar S, Graff E, Reicher-Reiss H, Goldbourt U. Elevated serum triglyceride levels and long-term mortality in patients with coronary heart disease: the Bezafibrate Infarction Prevention (BIP) Registry. *Circulation* 1999; 100: 475–482
- 29 Hansson L, Zanchetti A, Carruthers SG, Dahlöf B, Elmfeldt D, Julius S, Ménard J, Rahn KH, Wedel H, Westerling S. Effects of intensive blood-pressure lowering and low-dose aspirin in patients with hypertension: principal results of the Hypertension Optimal Treatment (HOT) randomised trial. HOT Study Group. *Lancet* 1998; 351: 1755–1762
- 30 Lakka TA, Lakka HM, Salonen R, Kaplan GA, Salonen JT. Abdominal obesity is associated with accelerated progression of carotid atherosclerosis in men. *Atherosclerosis* 2001; 154: 497–504
- 31 Petrović G. [Risk factors for development of cerebrovascular stroke]. *Med Pregl* 2000; 53: 207–214
- 32 Sowers JR, Epstein M, Frohlich ED. Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease: an update. *Hypertension* 2001; 37: 1053–1059
- 33 Sposito AC, Mansur AP, Maranhão RC, Martinez TR, Aldrighi JM, Ramires JA. Triglyceride and lipoprotein (a) are markers of coronary artery disease severity among postmenopausal women. *Maturitas* 2001; 39: 203–208
- 34 Marenberg ME, Risch N, Berkman LF, Floderus B, de Faire U. Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins. *The New England journal of medicine* 1994; 330: 1041–1046
- 35 Peden JF, Farrall M. Thirty-five common variants for coronary artery disease: the fruits of much collaborative labour. *Hum Mol Genet* 2011; 20: R198–R205
- 36 Kingsmore SF, Lindquist IE, Mudge J, Gessler DD, Beavis WD. Genome-wide association studies: progress and potential for drug discovery and development. *Nature reviews Drug discovery* 2008; 7: 221–230
- 37 Stein EA, Mellis S, Yancopoulos GD, Stahl N, Logan D, Smith WB, Lisbon E, Gutierrez M, Webb C, Wu R, Du Y, Kranz T, Gasparino E, Swergold GD. Effect of a monoclonal antibody to PCSK9 on LDL cholesterol. *The New England journal of medicine* 2012; 366: 1108–1118

- 38 Kessler T, Vilne B, Schunkert H. The impact of genome-wide association studies on the pathophysiology and therapy of cardiovascular disease. *EMBO Mol Med* 2016;
- 39 Khera AV, Kathiresan S. Genetics of coronary artery disease: discovery, biology and clinical translation. *Nat Rev Genet* 2017; 18: 331–344
- 40 Nelson CP, Goel A, Butterworth AS, Kanoni S, Webb TR, Marouli E, Zeng L, Ntalla I, Lai FY, Hopewell JC, Giannakopoulou O, Jiang T, Hamby SE, Di Angelantonio E, Assimes TL, Bottinger EP, Chambers JC, Clarke R, Palmer CNA, Cubbon RM, Ellinor P, Ermel R, Evangelou E, Franks PW, Grace C, Gu D, Hingorani AD, Howson JMM, Ingelsson E, Kastrati A, Kessler T, Kyriakou T, Lehtimäki T, Lu X, Lu Y, März W, McPherson R, Metspalu A, Pujades-Rodriguez M, Ruusalepp A, Schadt EE, Schmidt AF, Sweeting MJ, Zalloua PA, AlGhalayini K, Keavney BD, Kooner JS, Loos RJJ, Patel RS, Rutter MK, Tomaszewski M, Tzoulaki I, Zeggini E, Erdmann J, Dedoussis G, Björkegren JLM, Consortium E-C, CARDIoGRAMplusC4D, group TUBCCW, Schunkert H, Farrall M, Danesh J, Samani NJ, Watkins H, Deloukas P. Association analyses based on false discovery rate implicate new loci for coronary artery disease. *Nature genetics* 2017; advance online publication SP - EP -
- 41 Consortium CA, Deloukas P, Kanoni S, Willenborg C, Farrall M, Assimes TL, Thompson JR, Ingelsson E, Saleheen D, Erdmann J, Goldstein BA, Stirrups K, König IR, Cazier JB, Johansson A, Hall AS, Lee JY, Willer CJ, Chambers JC, Esko T, Folkersen L, Goel A, Grundberg E, Havulinna AS, Ho WK, Hopewell JC, Eriksson N, Kleber ME, Kristiansson K, Lundmark P, Lyytikäinen L. P., Rafelt S, Shungin D, Strawbridge RJ, Thorleifsson G, Tikkanen E, Van Zuydam N, Voight BF, Waite LL, Zhang W, Ziegler A, Absher D, Altshuler D, Balmforth AJ, Barroso I, Braund PS, Burgdorf C, Claudi-Boehm S, Cox D, Dimitriou M, Do R, Consortium D, Consortium C, Doney AS, Mokhtari EI, Eriksson P, Fischer K, Fontanillas P, Franco-Cereceda A, Gigante B, Groop L, Gustafsson S, Hager J, Hallmans G, Han BG, Hunt SE, Kang HM, Illig T, Kessler T, Knowles JW, Kolovou G, Kuusisto J, Langenberg C, Langford C, Leander K, Lokki ML, Lundmark A, McCarthy MI, Meisinger C, Melander O, Mihailov E, Maouche S, Morris AD, Müller-Nurasyid M, Mu TC, Nikus K, Peden JF, Rayner NW, Rasheed A, Rosinger S, Rubin D, Rumpf MP, Schafer A, Sivananthan M, Song C, Stewart AF, Tan ST, Thorgeirsson G, van der Schoot CE, Wagner PJ, Wellcome Trust Case Control C, Wells GA, Wild PS, Yang TP, Amouyel P, Arveiler D, Basart H, Boehnke M, Boerwinkle E, Brambilla P, Cambien F, Cupples AL, de Faire U, Dehghan A, Diemert P, Epstein SE, Evans A, Ferrario MM, Ferrières J, Gauguier D, Go AS, Goodall AH, Gudnason V, Hazen SL, Holm H, Iribarren C, Jang Y, Kahonen M, Kee F, Kim HS, Klopp N, Koenig W, Kratzer W, Kuulasmaa K, Laakso M, Laaksonen R, Lee JY, Lind L, Ouwehand WH, Parish S, Park JE, Pedersen NL, Peters A, Quertermous T, Rader DJ, Salomaa V, Schadt E, Shah SH, Sinisalo J, Stark K, Stefansson K, Tregouet DA, Virtamo J, Wallentin L, Wareham N, Zimmermann ME, Nieminen MS, Hengstenberg C, Sandhu MS, Pastinen T, Syvanen AC, Hovingh GK, Dedoussis G, Franks PW, Lehtimäki T, Metspalu A, Zalloua PA, Siegbahn A, Schreiber S, Ripatti S, Blankenberg SS, Perola M, Clarke R, Boehm BO, O'Donnell C, Reilly MP, März W, Collins R, Kathiresan S, Hamsten A, Kooner JS, Thorsteinsdóttir U, Danesh J, Palmer CN, Roberts R, Watkins H, Schunkert H, Samani NJ. Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease. *Nature genetics* 2013; 45: 25–33
- 42 Brewer DB. Max Schultze (1865), G. Bizzozero (1882) and the discovery of the platelet. *British journal of haematology* 2006; 133: 251–258

- 43 Deutzmann R, Rasso J. Duale Reihe Biochemie. Georg Thieme Verlag, 2016
- 44 Davi G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *The New England journal of medicine* 2007; 357: 2482–2494
- 45 Rasso J, Hauser K, Netzker R. Duale Reihe Biochemie. Rasso 2008;
- 46 Savage B, Saldívar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* 1996; 84: 289–297
- 47 Kuwahara M, Sugimoto M, Tsuji S, Matsui H, Mizuno T, Miyata S, Yoshioka A. Platelet shape changes and adhesion under high shear flow. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2002; 22: 329–334
- 48 Wu CC, Ko FN, Teng CM. Inhibition of platelet adhesion to collagen by cGMP-elevating agents. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 231: 412–416
- 49 Horstrup K, Jablonka B, Hönig-Liedl P, Just M, Kochsiek K, Walter U. Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition. *European journal of biochemistry / FEBS* 1994; 225: 21–27
- 50 Schwarz UR, Walter U, Eigenthaler M. Taming platelets with cyclic nucleotides. *Biochemical Pharmacology* 2001; 62: 1153–1161
- 51 Roberts WC. Relationship Between Coronary Thrombosis and Myocardial Infarction. *Mod Concepts Cardiovasc Dis* 1972; 41: 7–10
- 52 Virmani R, Burke AP, Farb A, Kolodgie FD. Pathology of the unstable plaque. *Prog Cardiovasc Dis* 2002; 44: 349–356
- 53 Toschi V, Gallo R, Lettino M, Fallon JT, Gertz SD, Fernández-Ortiz A, Chesebro JH, Badimon L, Nemerson Y, Fuster V, Badimon JJ. Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 1997; 95: 594–599
- 54 SMYTH SS, MCEVER RP, WEYRICH AS, MORRELL CN, HOFFMAN MR, AREPALLY GM, FRENCH PA, DAUERMAN HL, Becker RC, FOR THE 2009 PLATELET COLLOQUIUM PARTICIPANTS. Platelet functions beyond hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2009; 7: 1759–1766
- 55 Semple JW, Italiano JE, Freedman J. Platelets and the immune continuum. *Nature Reviews Immunology* 2011; 11: 264–274
- 56 Lievens D, Hundelshausen von P. Platelets in atherosclerosis. *Thrombosis and haemostasis* 2011; 106: 827–838
- 57 Totani L, Evangelista V. Platelet-leukocyte interactions in cardiovascular disease and beyond. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2010; 30: 2357–2361
- 58 Sarma J, Laan CA, Alam S, Jha A, Fox KAA, Dransfield I. Increased platelet binding to circulating monocytes in acute coronary syndromes. *Circulation* 2002; 105: 2166–2171

- 59 Drechsler M, Megens RTA, van Zandvoort M, Weber C, Soehnlein O. Hyperlipidemia-triggered neutrophilia promotes early atherosclerosis. *Circulation* 2010; 122: 1837–1845
- 60 Kornerup KN, Salmon GP, Pitchford SC, Liu WL, Page CP. Circulating platelet-neutrophil complexes are important for subsequent neutrophil activation and migration. *J Appl Physiol* 2010; 109: 758–767
- 61 Gawaz M, Stellos K, Langer HF. Platelets modulate atherogenesis and progression of atherosclerotic plaques via interaction with progenitor and dendritic cells. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 235–242
- 62 Duffau P, Seneschal J, Nicco C, Richez C, Lazaro E, Douchet I, Bordes C, Viallard J-F, Goulvestre C, Pellegrin J-L, Weil B, Moreau J-F, Batteux F, Blanco P. Platelet CD154 potentiates interferon-alpha secretion by plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* 2010; 2: 47ra63–47ra63
- 63 Gerdes N, Zhu L, Ersoy M, Hermansson A, Hjemdahl P, Hu H, Hansson GK, Li N. Platelets regulate CD4⁺ T-cell differentiation via multiple chemokines in humans. *Thrombosis and haemostasis* 2011; 106: 353–362
- 64 Siegel-Axel D, Daub K, Seizer P, Lindemann S, Gawaz M. Platelet lipoprotein interplay: trigger of foam cell formation and driver of atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 2008; 78: 8–17
- 65 Ferroni P, Basili S, Santilli F, Davì G. Low-density lipoprotein-lowering medication and platelet function. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2006; 35: 346–354
- 66 Cipollone F, Mezzetti A, Porreca E, Di Febbo C, Nutini M, Fazia M, Falco A, Cuccurullo F, Davì G. Association between enhanced soluble CD40L and prothrombotic state in hypercholesterolemia: effects of statin therapy. *Circulation* 2002; 106: 399–402
- 67 Erdmann J, Stark K, Esslinger UB, Rumpf PM, Koesling D, de Wit C, Kaiser FJ, Braunholz D, Medack A, Fischer M, Zimmermann ME, Tennstedt S, Graf E, Eck S, Aherrahrou Z, Nahrstaedt J, Willenborg C, Bruse P, Braenne I, Nothen MM, Hofmann P, Braund PS, Mergia E, Reinhard W, Burgdorf C, Schreiber S, Balmforth AJ, Hall AS, Bertram L, Steinhagen-Thiessen E, Li SC, Marz W, Reilly M, Kathiresan S, McPherson R, Walter U, CardioGram, Ott J, Samani NJ, Strom TM, Meitinger T, Hengstenberg C, Schunkert H. Dysfunctional nitric oxide signalling increases risk of myocardial infarction. *Nature* 2013; 504: 432–436
- 68 International Consortium for Blood Pressure Genome-Wide Association S, Ehret GB, Munroe PB, Rice KM, Bochud M, Johnson AD, Chasman DI, Smith AV, Tobin MD, Verwoert GC, Hwang SJ, Pihur V, Vollenweider P, O'Reilly PF, Amin N, Bragg-Gresham JL, Teumer A, Glazer NL, Launer L, Zhao JH, Aulchenko Y, Heath S, Sober S, Parsa A, Luan J, Arora P, Dehghan A, Zhang F, Lucas G, Hicks AA, Jackson AU, Peden JF, Tanaka T, Wild SH, Rudan I, Igl W, Milaneschi Y, Parker AN, Fava C, Chambers JC, Fox ER, Kumari M, Go MJ, van der Harst P, Kao WH, Sjogren M, Vinay DG, Alexander M, Tabara Y, Shaw-Hawkins S, Whincup PH, Liu Y, Shi G, Kuusisto J, Tayo B, Seielstad M, Sim X, Nguyen KD, Lehtimäki T, Matullo G, Wu Y, Gaunt TR, Onland-Moret NC, Cooper MN, Platou CG, Org E, Hardy R, Dahgam S, Palmen J, Vitart V, Braund PS, Kuznetsova T, Uiterwaal CS, Adeyemo A, Palmas W, Campbell H, Ludwig

- B, Tomaszewski M, Tzoulaki I, Palmer ND, consortium CA, Consortium CK, KidneyGen C, EchoGen C, consortium C-H, Aspelund T, Garcia M, Chang YP, O'Connell JR, Steinle NI, Grobbee DE, Arking DE, Kardina SL, Morrison AC, Hernandez D, Najjar S, McArdle WL, Hadley D, Brown MJ, Connell JM, Hingorani AD, Day IN, Lawlor DA, Beilby JP, Lawrence RW, Clarke R, Hopewell JC, Ongen H, Dreisbach AW, Li Y, Young JH, Bis JC, Kahonen M, Viikari J, Adair LS, Lee NR, Chen MH, Olden M, Pattaro C, Bolton JA, Kottgen A, Bergmann S, Mooser V, Chaturvedi N, Frayling TM, Islam M, Jafar TH, Erdmann J, Kulkarni SR, Bornstein SR, Grassler J, Groop L, Voight BF, Kettunen J, Howard P, Taylor A, Guarrera S, Ricceri F, Emilsson V, Plump A, Barroso I, Khaw KT, Weder AB, Hunt SC, Sun YV, Bergman RN, Collins FS, Bonnycastle LL, Scott LJ, Stringham HM, Peltonen L, Perola M, Vartiainen E, Brand SM, Staessen JA, Wang TJ, Burton PR, Soler Artigas M, Dong Y, Snieder H, Wang X, Zhu H, Lohman KK, Rudock ME, Heckbert SR, Smith NL, Wiggins KL, Doumatey A, Shriner D, Veldre G, Viigimaa M, Kinra S, Prabhakaran D, Tripathy V, Langefeld CD, Rosengren A, Thelle DS, Corsi AM, Singleton A, Forrester T, Hilton G, McKenzie CA, Salako T, Iwai N, Kita Y, Ogihara T, Ohkubo T, Okamura T, Ueshima H, Umemura S, Eyheramendy S, Meitinger T, Wichmann HE, Cho YS, Kim HL, Lee JY, Scott J, Sehmi JS, Zhang W, Hedblad B, Nilsson P, Smith GD, Wong A, Narisu N, Stancakova A, Raffel LJ, Yao J, Kathiresan S, O'Donnell CJ, Schwartz SM, Ikram MA, Longstreth WTJ, Mosley TH, Seshadri S, Shrine NR, Wain LV, Morken MA, Swift AJ, Laitinen J, Prokopenko I, Zitting P, Cooper JA, Humphries SE, Danesh J, Rasheed A, Goel A, Hamsten A, Watkins H, Bakker SJ, van Gilst WH, Janipalli CS, Mani KR, Yajnik CS, Hofman A, Mattace-Raso FU, Oostra BA, Demirkan A, Isaacs A, Rivadeneira F, Lakatta EG, Orru M, Scuteri A, Ala-Korpela M, Kangas AJ, Lytikainen L, P., Soininen P, Tukiainen T, Wurtz P, Ong RT, Dorr M, Kroemer HK, Volker U, Volzke H, Galan P, Hercberg S, Lathrop M, Zelenika D, Deloukas P, Mangino M, Spector TD, Zhai G, Meschia JF, Nalls MA, Sharma P, Terzic J, Kumar MV, Denniff M, Zukowska-Szczechowska E, Wagenknecht LE, Fowkes FG, Charchar FJ, Schwarz PE, Hayward C, Guo X, Rotimi C, Bots ML, Brand E, Samani NJ, Polasek O, Talmud PJ, Nyberg F, Kuh D, Laan M, Hveem K, Palmer LJ, van der Schouw YT, Casas JP, Mohlke KL, Vineis P, Raitakari O, Ganesh SK, Wong TY, Tai ES, Cooper RS, Laakso M, Rao DC, Harris TB, Morris RW, Dominiczak AF, Kivimaki M, Marmot MG, Miki T, Saleheen D, Chandak GR, Coresh J, Navis G, Salomaa V, Han BG, Zhu X, Kooner JS, Melander O, Ridker PM, Bandinelli S, Gyllenstein UB, Wright AF, Wilson JF, Ferrucci L, Farrall M, Tuomilehto J, Pramstaller PP, Elosua R, Soranzo N, Sijbrands EJ, Altshuler D, Loos RJ, Shuldiner AR, Gieger C, Meneton P, Uitterlinden AG, Wareham NJ, Gudnason V, Rotter JI, Rettig R, Uda M, Strachan DP, Witteman JC, Hartikainen AL, Beckmann JS, Boerwinkle E, Vasani RS, Boehnke M, Larson MG, Jarvelin MR, Psaty BM, Abecasis GR, Chakravarti A, Elliott P, van Duijn CM, Newton-Cheh C, Levy D, Caulfield MJ, Johnson T. Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk. *Nature* 2011; 478: 103–109
- 69 Garbers DL, Chrisman TD, Wiegand P, Katafuchi T, Albanesi JP, Bielinski V, Barylko B, Redfield MM, Burnett JCJ. Membrane guanylyl cyclase receptors: an update. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 2006; 17: 251–258
- 70 Friebe A, Koesling D. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circ Res* 2003; 93: 96–105
- 71 Brunton TL. On the use of nitrite of amyl in angina pectoris. *Lancet* 1867; 90: 97–98

- 72 Murell W. Nitro-glycerine as a remedy for angina pectoris. *Lancet* 1879; 113: 113–115
- 73 Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333: 664–666
- 74 Tsao PS, Lewis NP, Alpert S, Cooke JP. Exposure to shear stress alters endothelial adhesiveness. Role of nitric oxide. *Circulation* 1995; 92: 3513–3519
- 75 Derbyshire ER, Marletta MA. Structure and regulation of soluble guanylate cyclase. *Annual review of biochemistry* 2012; 81: 533–559
- 76 Warner TD, Mitchell JA, Sheng H, Murad F. Effects of cyclic GMP on smooth muscle relaxation. *Advances in pharmacology* 1994; 26: 171–194
- 77 Moro MA, Russel RJ, Celtek S, Lizasoain I, Su Y, Darley-Usmar VM, Radomski MW, Moncada S. cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996; 93: 1480–1485
- 78 Sanders KM, Ward SM, Thornbury KD, Dalziel HH, Westfall DP, Carl A. Nitric oxide as a non-adrenergic, non-cholinergic neurotransmitter in the gastrointestinal tract. *Japanese journal of pharmacology* 1992; 58 Suppl 2: 220P–225P
- 79 Schlossmann J, Ammendola A, Ashman K, Zong X, Huber A, Neubauer G, Wang GX, Allescher HD, Korth M, Wilm M, Hofmann F, Ruth P. Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I β . *Nature* 2000; 404: 197–201
- 80 Waldmann R, Nieberding M, Walter U. Vasodilator-stimulated protein phosphorylation in platelets is mediated by cAMP- and cGMP-dependent protein kinases. *European journal of biochemistry / FEBS* 1987; 167: 441–448
- 81 Halbrügge M, Friedrich C, Eigenthaler M, Schanzenbächer P, Walter U. Stoichiometric and reversible phosphorylation of a 46-kDa protein in human platelets in response to cGMP- and cAMP-elevating vasodilators. *The Journal of biological chemistry* 1990; 265: 3088–3093
- 82 Feil R, Kemp-Harper B. cGMP signalling: from bench to bedside. *Conference on cGMP generators, effectors and therapeutic implications*. 2006: 149–153
- 83 Grabe N. AliBaba2: context specific identification of transcription factor binding sites. *In Silico Biol (Gedruckt)* 2002; 2: S1–S15
- 84 Born GV, Cross MJ. The Aggregation of Blood Platelets. *The Journal of physiology* 1963; 168: 178–195
- 85 Levine GN, Bates ER, Bittl JA, Brindis RG, Fihn SD, Fleisher LA, Granger CB, Lange RA, Mack MJ, Mauri L, Mehran R, Mukherjee D, Newby LK, O'Gara PT, Sabatine MS, Smith PK, Smith SC. 2016 ACC/AHA Guideline Focused Update on Duration of Dual Antiplatelet Therapy in Patients With Coronary Artery Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines: An Update of the 2011 ACCF/AHA/SCAI Guideline for Percutaneous Coronary Intervention, 2011 ACCF/AHA Guideline for Coronary Artery Bypass Graft Surgery, 2012

- ACC/AHA/ACP/AATS/PCNA/SCAI/STS Guideline for the Diagnosis and Management of Patients With Stable Ischemic Heart Disease, 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of ST-Elevation Myocardial Infarction, 2014 AHA/ACC Guideline for the Management of Patients With Non-ST-Elevation Acute Coronary Syndromes, and 2014 ACC/AHA Guideline on Perioperative Cardiovascular Evaluation and Management of Patients Undergoing Noncardiac Surgery. *Circulation* 2016; 134: e123–e155
- 86 Steinhubl SR, Charnigo R. Clopidogrel treatment prior to percutaneous coronary intervention: when enough isn't enough. *Jama* 2006; 295: 1581–1582
- 87 Serebruany VL, Steinhubl SR, Berger PB, Malinin AI, Bhatt DL, Topol EJ. Variability in platelet responsiveness to clopidogrel among 544 individuals. *Journal of the American College of Cardiology* 2005; 45: 246–251
- 88 Sibbing D, Braun S, Jawansky S, Vogt W, Mehilli J, Schömig A, Kastrati A, Beckerath von N. Assessment of ADP-induced platelet aggregation with light transmission aggregometry and multiple electrode platelet aggregometry before and after clopidogrel treatment. *Thrombosis and haemostasis* 2008; 99: 121–126
- 89 Kessler T, Wobst J, Wolf B, Eckhold J, Vilne B, Hollstein R, Ameln von S, Dang TA, Sager HB, Moritz Rumpf P, Aherrahrou R, Kastrati A, Björkegren JLM, Erdmann J, Lusic AJ, Civelek M, Kaiser FJ, Schunkert H. Functional Characterization of the GUCY1A3 Coronary Artery Disease Risk Locus. *Circulation* 2017; 136: 476–489
- 90 Wobst J, Kessler T, Dang TA, Erdmann J, Schunkert H. Role of sGC-dependent NO signalling and myocardial infarction risk. *J Mol Med* 2015; 93: 383–394
- 91 Wobst J, Ameln von S, Wolf B, Wierer M, Dang TA, Sager HB, Tennstedt S, Hengstenberg C, Koesling D, Friebe A, Braun SL, Erdmann J, Schunkert H, Kessler T. Stimulators of the soluble guanylyl cyclase: promising functional insights from rare coding atherosclerosis-related GUCY1A3 variants. *Basic Res Cardiol* 2016; 111: 51
- 92 Wolf B, Kessler T, Schunkert H. Genetik der koronaren Herzkrankheit. *Aktuelle Kardiologie* 2018; 7: 197–203
- 93 Hägg S, Skogsberg J, Lundström J, Noori P, Nilsson R, Zhong H, Maleki S, Shang M-M, Brinne B, Bradshaw M, Bajic VB, Samnegård A, Silveira A, Kaplan LM, Gigante B, Leander K, de Faire U, Rosfors S, Lockowandt U, Liska J, Konrad P, Takolander R, Franco-Cereceda A, Schadt EE, Ivert T, Hamsten A, Tegnér J, Björkegren J. Multi-organ expression profiling uncovers a gene module in coronary artery disease involving transendothelial migration of leukocytes and LIM domain binding 2: the Stockholm Atherosclerosis Gene Expression (STAGE) study. *PLoS Genet* 2009; 5: e1000754
- 94 Jones DA, Pellaton C, Velmurugan S, Rathod KS, Andiapen M, Antoniou S, van Eijl S, Webb AJ, Westwood MA, Parmar MK, Mathur A, Ahluwalia A. Randomized phase 2 trial of intracoronary nitrite during acute myocardial infarction. *Circ Res* 2015; 116: 437–447
- 95 Siddiqi N, Neil C, Bruce M, MacLennan G, Cotton S, Papadopoulou S, Feelisch M, Bunce N, Lim PO, Hildick-Smith D, Horowitz J, Madhani M, Boon N, Dawson D, Kaski JC, Frenneaux M, NIAMI investigators. Intravenous sodium nitrite in

- acute ST-elevation myocardial infarction: a randomized controlled trial (NIAMI). *European heart journal* 2014; 35: 1255–1262
- 96 Stasch JP, Pacher P, Evgenov OV. Soluble guanylate cyclase as an emerging therapeutic target in cardiopulmonary disease. *Circulation* 2011; 123: 2263–2273
- 97 Ghofrani H-A, Galiè N, Grimminger F, Grünig E, Humbert M, Jing Z-C, Keogh AM, Langleben D, Kilama MO, Fritsch A, Neuser D, Rubin LJ, PATENT-1 Study Group. Riociguat for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *The New England journal of medicine* 2013; 369: 330–340
- 98 Korkmaz S, Radovits T, Barnucz E, Hirschberg K, Neugebauer P, Loganathan S, Veres G, Páli S, Seidel B, Zöllner S, Karck M, Szabó G. Pharmacological activation of soluble guanylate cyclase protects the heart against ischemic injury. *Circulation* 2009; 120: 677–686
- 99 Zhou L, Schmaier AH. Platelet aggregation testing in platelet-rich plasma: description of procedures with the aim to develop standards in the field. *American journal of clinical pathology* 2005; 123: 172–183
- 100 Kessler T, Wolf B, Eriksson N, Wobst J, Åkerblom A, Sager HB, Kaess BM, Nordio F, Stroth M, Koch W, Mayer K, Bernlochner I, Solakov L, Bopp R, Sibbing D, O'Donoghue M, James S, Katus HA, Storey R, Becker RC, Laugwitz K-L, Koenig W, Wallentin L, Kastrati A, Schunkert H. Association of the coronary artery disease risk gene *GUCY1A3* with on-aspirin platelet reactivity and ischemic events after coronary intervention.
- 101 Mellion BT, Ignarro LJ, Ohlstein EH, Pontecorvo EG, Hyman AL, Kadowitz PJ. Evidence for the inhibitory role of guanosine 3', 5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. *Blood* 1981; 57: 946–955
- 102 Antl M, Brühl von M-L, Eiglsperger C, Werner M, Konrad I, Kocher T, Wilm M, Hofmann F, Massberg S, Schlossmann J. IRAG mediates NO/cGMP-dependent inhibition of platelet aggregation and thrombus formation. *Blood* 2007; 109: 552–559
- 103 Aszódi A, Pfeifer A, Ahmad M, Glauner M, Zhou XH, Ny L, Andersson KE, Kehrel B, Offermanns S, Fassler R. The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function. *EMBO J* 1999; 18: 37–48
- 104 Signorello MG, Segantin A, Leoncini G. The arachidonic acid effect on platelet nitric oxide level. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1791: 1084–1092
- 105 Needleman P, Turk J, Jakschik BA, Morrison AR, Lefkowitz JB. Arachidonic acid metabolism. *Annual review of biochemistry* 1986; 55: 69–102
- 106 Smith JB, Willis AL. Formation and release of prostaglandins by platelets in response to thrombin. *Br J Pharmacol* 1970; 40: 545P–546P
- 107 Gross S, Tilly P, Hentsch D, Vonesch J-L, Fabre J-E. Vascular wall-produced prostaglandin E2 exacerbates arterial thrombosis and atherothrombosis through platelet EP3 receptors. *The Journal of experimental medicine* 2007; 204: 311–320

-
- 108 Sugimoto Y, Namba T, Honda A, Hayashi Y, Negishi M, Ichikawa A, Narumiya S. Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP3 subtype. *The Journal of biological chemistry* 1992; 267: 6463–6466
- 109 Yang J, Wu J, Jiang H, Mortensen R, Austin S, Manning DR, Woulfe D, Brass LF. Signaling through Gi family members in platelets. Redundancy and specificity in the regulation of adenylyl cyclase and other effectors. *The Journal of biological chemistry* 2002; 277: 46035–46042
- 110 Shantsila E, Lip GYH. „Aspirin resistance“ or treatment non-compliance: which is to blame for cardiovascular complications? *J Transl Med* 2008; 6: 47
- 111 Biondi-Zoccai GGL, Lotrionte M, Agostoni P, Abbate A, Fusaro M, Burzotta F, Testa L, Sheiban I, Sangiorgi G. A systematic review and meta-analysis on the hazards of discontinuing or not adhering to aspirin among 50,279 patients at risk for coronary artery disease. *European heart journal* 2006; 27: 2667–2674

Anhang

Veröffentlichungen

Publikationen

Wesentliche Teile dieser Arbeit sind als Bestandteile folgender Publikationen veröffentlicht worden oder zur Veröffentlichung eingereicht:

1. Thorsten Kessler*, Jana Wobst*, **Bernhard Wolf**, Juliane Eckhold, Baiba Vilne, Ronja Hollstein, Simon von Ameln, Tan An Dang, Hendrik B. Sager, Philipp Moritz Rumpf, Redouane Aherrahrou, Adnan Kastrati, Johan L M Bjoerkegren, Jeanette Erdmann, Aldons J Lulis, Mete Civelek, Frank J Kaiser, Heribert Schunkert (2017): Functional Characterization of the *GUCY1A3* Coronary Artery Disease Risk Locus. *Circulation* 136, 476–489. *geteilte Erst-/Letztautorschaft
2. Jana Wobst, Simon von Ameln, **Bernhard Wolf**, Michael Wierer, Tan An Dang, Hendrik B. Sager, Stephanie Tennstedt, Christian Hengstenberg, Doris Koesling, Andreas Friebe, Siegmund L. Braun, Jeanette Erdmann, Heribert Schunkert*, Thorsten Kessler* (2016): Stimulators of the soluble guanylyl cyclase: promising functional insights from rare coding atherosclerosis-related *GUCY1A3* variants. *Basic Res Cardiol* 111, 51. *geteilte Erst-/Letztautorschaft
3. Thorsten Kessler*, **Bernhard Wolf***, Niclas Eriksson, Jana Wobst, Axel Åkerblom, Hendrik B. Sager, Bernhard M. Kaess, Francesco Nordio, Marlène Stroth, Werner Koch, Katharina Mayer, Isabell Bernlochner, Linda Solakov, Roman Bopp, Dirk Sibbing, Michelle O'Donoghue, Stefan James, Hugo A. Katus, Rob Storey, Richard C. Becker, Karl-Ludwig Laugwitz, Wolfgang Koenig, Lars Wallentin, Adnan Kastrati, Heribert Schunkert (2018): Association of the coronary artery disease risk gene *GUCY1A3* with on-aspirin platelet reactivity and ischemic events after coronary intervention. *submitted*. *geteilte Erst-/Letztautorschaft

Vorträge

Bernhard Wolf. Association of the coronary artery disease risk gene *GUCY1A3* with on-aspirin platelet reactivity and ischemic events after coronary intervention. 4th Young DZHK Retreat, Rostock, 13.-14. September 2017

Posterbeiträge

1. **Bernhard Wolf***, Thorsten Kessler*, Niclas Eriksson, Jana Wobst, Axel Åkerblom, Hendrik B. Sager, Bernhard M. Kaess, Francesco Nordio, Marlène Stroth, Werner Koch, Katharina Mayer, Isabell Bernlochner, Linda Solakov, Roman Bopp, Dirk Sibbing, Michelle O'Donoghue, Stefan James, Hugo A. Katus, Rob Storey, Richard C. Becker, Karl-Ludwig Laugwitz, Wolfgang Koenig, Lars Wallentin, Adnan Kastrati, Heribert Schunkert (2017): Association of the coronary artery disease risk gene *GUCY1A3* with on-aspirin platelet reactivity and ischemic events after coronary intervention. 39th Annual Meeting of the German Society for Microcirculation and Vascular Biology (GfMVB), Grainau/Garmisch-Partenkirchen, 05.-07. Oktober 2017
*geteilte Erst-/Letztautorschaft
2. **Bernhard Wolf**, Thorsten Kessler, Jana Wobst, Philipp Moritz Rumpf, Christian Hengstenberg, Jeanette Erdmann, Heribert Schunkert. Influence of the Coronary Artery Disease Risk Allele *GUCY1A3* on Platelet Aggregation. 81. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK), Mannheim, 08.-11. April 2015

Finanzielle Unterstützung

Diese Arbeit wurde durch ein Doktorandenstipendium des Deutschen Zentrums für Herz- und Kreislaufforschung (DZHK) finanziell unterstützt.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, ganz herzlich bedanken.

Die vorliegende Arbeit entstand an der Klinik für Herz- und Kreislauferkrankungen am Deutschen Herzzentrum München unter der Leitung von Prof. Dr. med. Heribert Schunkert. Ihm möchte ich dafür danken, dass ich meine Dissertation an seinem Institut anfertigen durfte. Als Doktorvater und Erstgutachter stand er mir jederzeit mit seiner enormen wissenschaftlichen Erfahrung und seinem umfangreichen fachlichen Wissen zur Seite. In unseren Laborbesprechungen hat er in Diskussionen und konstruktiver Kritik stets den richtigen Ton gefunden und die Arbeit so positiv vorangetrieben. Durch sein eindrucksvolles wissenschaftliches Netzwerk konnten Kooperationen problemlos aufgebaut werden. Außerdem möchte ich ihm dafür danken nun als Assistenzarzt in seinem Institut, das weltweit zu den führenden kardiologischen Kliniken gezählt wird, tätig sein zu dürfen.

Mein besonderer Dank geht an Dr. med. Thorsten Kessler, der jederzeit ein herausragender Betreuer für meine Dissertation war und mir stets mit seiner wissenschaftlichen Expertise und einem offenen Ohr zur Seite stand. Er weckte in mir erfolgreich das Interesse für die Erforschung genetischer Risikofaktoren in der Kardiologie. Darüber hinaus möchte ich ihm dafür danken, dass er mir die Vorstellung meiner Forschungsergebnisse auf Kongressen ermöglichte und sich dazu bereit erklärte, meine Arbeit Korrektur zu lesen.

Ein weiterer besonderer Dank geht an Dr. rer. nat. Jana Wobst, die mich erfolgreich in die Techniken der Molekularbiologie einarbeitete. Hierbei stand sie mir mit Geduld und umfangreichem fachlichen Wissen beiseite. Bei Fragen rund um den Laboralltag konnte ich stets auf ihre Hilfe zählen.

Mein Dank gilt auch allen anderen Mitarbeitern der AG Schunkert, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen. Die Arbeitsatmosphäre im Labor war stets sehr angenehm und aus Kollegen sind Freunde geworden.

Und zu guter Letzt geht mein Dank an meine Eltern, meine Familie und meine Freunde, die mich nicht nur bei der Anfertigung der Dissertation, sondern auch im Rahmen aller Höhen und Tiefen des mittlerweile abgeschlossenen Medizinstudiums stets ohne zu zögern moralisch unterstützt haben. Ihr habt es mir durch eure Unterstützung erst ermöglicht, zu diesen Ehren zu gelangen. Danke für eure Geduld und euer Verständnis.