

# Funktionelle Auswirkungen von Acetylsalicylsäure auf die Thrombozytenfunktion von Trägern von genetischen Varianten im KHK-Risikogen *GUCY1A1*

Laura Patricia Lambrecht

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Medicine and Health der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Medizin (Dr. med.) genehmigten Dissertation.

Vorsitz: apl. Prof. Dr. Bernhard Haslinger

Prüfer\*innen der Dissertation:

1. Prof. Dr. Heribert Schunkert
2. Prof. Dr. Lars Mägdefessel

Die Dissertation wurde am 23.03.2023 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 15.08.2023 angenommen.

**Für meine Eltern**

# Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen wie Schlaganfall und Herzinfarkt gehören zu den häufigsten Todesursachen weltweit (Weltgesundheitsorganisation 2020). Grundlage für den Herzinfarkt ist die koronare Herzkrankheit (KHK). Diese entsteht, abhängig von diversen Risikofaktoren, durch Atherogenese, eine chronisch entzündliche Erkrankung der Arterienwand, die Plaquebildung nach sich zieht. Der Myokardinfarkt entsteht durch die Ruptur einer solchen Plaque und die darauffolgende Thrombusformation. Dies führt zu einer Verlegung des Koronarlumens und äußert sich infolge der Myokardischämie als Angina pectoris.

In genomweiten Assoziationsstudien wurde die signifikante Verbindung des *GUCY1A1* Gen mit der KHK festgestellt. Die häufige Variante rs7692387, deren KHK-Risikoallel bei ca. 60 % der Europäer homozygot vorliegt, führt zu einer verminderten Expression und Funktion der  $\alpha$ 1-Untereinheit der löslichen Guanylatzyklase (sGC). Infolgedessen kommt es zu einer verminderten Inhibition der Thrombozytenaggregation. Vorläuferstudien legen nahe, dass die Inhibition der Aggregation ein vielversprechender Therapieansatz der KHK sein kann. Als mögliches Konzept stellte sich in einem Vorläuferprojekt unserer Arbeitsgruppe die Therapie mit Acetylsalicylsäure (ASS) heraus.

192 konsekutive Patienten wurden nach Aufklärung und schriftlicher Einwilligung in die Studie eingeschlossen und für die Variante rs7692387 genotypisiert. Die durch Arachidonsäure induzierte Thrombozytenaggregation wurde mittels Lichttransmissions-Aggregometrie in Anwesenheit einer Trägerlösung oder des Stickstoffmonoxid- (NO-) Donors Nitroprussid-Natrium sowie mit oder ohne Präinkubation mit ASS untersucht. Die Thrombozyten wurden anschließend ferner isoliert und der Phosphorylierungsstatus (auf die Unterschiede an Serin<sub>157</sub> bzw. Serin<sub>239</sub>) des cGMP-abhängig phosphorylierten Effektorproteins VASP (Vasodilatator-Stimuliertes Phosphoprotein) mittels Western Blotting untersucht. Aus den Thrombozyten ausgeschüttete Zytokine wurden ferner mittels einem humanem Zytokinarray analysiert.

Insgesamt erfüllten 72 Probanden die präspezifizierten Einschlusscharakteristika. Es zeigte sich, dass 40 Individuen homozygot für das Risikoallel (GG-Genotyp) und 32 homo- bzw. heterozygot für das Nicht-Risikoallel waren (AA/AG-Genotyp). Die Aggregation der Genotypen unter Baselinebedingungen war vergleichbar. Die Anwesenheit von NO führte bei den homozygoten Risikoallelträgern zu einer reduzierten Inhibition der Thrombozytenaggregation im Vergleich zur den Nicht-Risikoallelträgern. Eine Präinkubation mit ASS konnte diesen Unterschied ausgleichen. Des Weiteren wurde bei homozygoten Risikoträgern eine vermehrte Ausschüttung des Makrophagen Migrations Inhibitions Faktors (MIF) festgestellt.

Diese Arbeit zeigt, dass die NO-induzierte Inhibierung der Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregation bei homozygoten Risikoallelträgern von *GUCY1A1* geringer ausfällt, jedoch möglicherweise durch die Einnahme von ASS *in vitro* ausgeglichen werden kann. Der Einfluss von ASS auf die Thrombozytenaggregation und Zytokinausschüttung stellt somit einen vielversprechenden Präventions- und Therapieansatz der KHK in Individuen, die den Risikogenotyp tragen, dar.

## Summary

Cardiovascular diseases such as stroke and myocardial infarction are among the leading causes of death in the world (World Health Organization 2020). The basis for myocardial infarction is coronary artery disease (CAD). It develops depending on various risk factors through atherogenesis, a chronic inflammatory disease of the arterial wall that results in plaque formation. Myocardial infarction results from rupture of such plaques and subsequent thrombus formation ultimately leading to obstruction of the coronary lumen and manifestation as angina because of myocardial ischemia.

Genome-wide association studies have established a significant association of the *GUCY1A1* gene with CAD. The common variant rs7692387, whose CAD risk allele is homozygous in approximately 60 % of Europeans, results in decreased expression of the  $\alpha$ 1-subunit of soluble guanylate cyclase (sGC). As a result, there is decreased endogenous inhibition of platelet aggregation. Preliminary studies suggest that inhibition of aggregation may be a promising therapeutic approach for CAD. In a previous project of our group, therapy with acetylsalicylic acid (ASA) emerged as a potential concept in primary prevention.

192 consecutive patients were, after obtaining written informed consent, included in this study and genotyped for the rs7692387 variant. Arachidonic acid induced platelet aggregation was analyzed using optical aggregometry in the presence of vehicle or the nitric oxide (NO) donor sodium nitroprusside with or without preincubation with ASA. Platelets were then analyzed by Western blot for differential phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) at serine157 or serine239. The cytokines released were analyzed by human cytokine arrays.

72 individuals fulfilled the prespecified inclusion criteria. 40 individuals were homozygous for the risk allele (GG genotype) and 32 carried at least one non-risk allele (AA/AG genotype). Baseline aggregation was comparable between the genotypes. The presence of NO resulted in reduced inhibition of platelet aggregation in the homozygous risk allele carriers. Preincubation with ASA was able to compensate for this difference. Furthermore, an increased release of macrophage migration inhibitory factor (MIF) was found in homozygous risk carriers as compared to non-risk allele carriers.

This study shows that NO-induced inhibition of platelet aggregation is reduced in homozygous risk allele carriers of *GUCY1A1*. Importantly, it can be compensated by ASA *in vitro*. The influence of ASA on platelet aggregation and cytokine release thus represents a promising therapeutic approach to prevent and treat CAD in individuals carrying the risk genotype.

# Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| ZUSAMMENFASSUNG .....   | III       |
| SUMMARY .....   | V         |
| INHALTSVERZEICHNIS .....  | VI        |
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....   | IX        |
| TABELLENVERZEICHNIS .....   | XIII      |
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....   | XIV       |
| <b>I. EINLEITUNG .....</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1 DIE KORONARE HERZERKRANKUNG (KHK) .....   | 1         |
| 1.1.1 Pathophysiologie der Koronaren Herzerkrankung .....   | 1         |
| 1.1.2 Risikofaktoren der KHK .....  | 3         |
| 1.1.3 Klinik und Therapie der KHK .....   | 4         |
| 1.2 THROMBOZYTEN .....  | 7         |
| 1.2.1 Aktivierung und Hemmung der Thrombozyten .....  | 8         |
| 1.2.2 Funktion in Myokardinfarkt und Atherosklerose .....   | 9         |
| 1.3 RISIKOGEN <i>GUCY1A1</i> .....  | 11        |
| 1.3.1 Mutationen in <i>GUCY1A1</i> .....  | 11        |
| 1.3.2 Häufige Varianten in <i>GUCY1A1</i> .....   | 11        |
| 1.4 DIE LÖSLICHE GUANYLATZYKLASE (sGC) .....  | 13        |
| 1.4.1 Der <i>NO-cGMP-Signalweg</i> .....  | 13        |
| 1.4.2 Effekt der <i>cGMP-anhängigen Proteinkinase in Thrombozyten und glatter Gefäßmuskulatur</i> ..... | 14        |
| 1.5 DER ARACHIDONSÄURE-METABOLISMUS .....   | 16        |
| 1.5.1 <i>Thromboxan-Synthase</i> .....  | 17        |
| 1.5.2 Der <i>PGE<sub>2</sub>/cAMP-Signalweg</i> .....   | 17        |
| 1.5.3 <i>cAMP-abhängige Phosphorylierung von VASP</i> .....   | 18        |
| 1.6 FRAGESTELLUNG .....   | 19        |
| <b>II. MATERIALIEN .....</b>  | <b>20</b> |
| 2.1 CHEMIKALIEN .....   | 20        |
| 2.2 PUFFER UND LÖSUNGEN .....   | 21        |
| 2.3 ANTIKÖRPER .....  | 24        |
| 2.4 VERBRAUCHSMATERIALIEN .....   | 24        |
| 2.5 ASSAYS UND KITS .....   | 25        |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.6 GERÄTE.....  | 25        |
| 2.7 SOFTWARE.....  | 26        |
| 2.8 STUDIENPOPULATION.....   | 27        |
| <b>III.     METHODEN .....</b>   | <b>1</b>  |
| 3.1 AUFKLÄRUNG, ANAMNESE UND KÖRPERLICHE UNTERSUCHUNG DER PROBANDEN.....                     | 1         |
| 3.2 PROBENENTNAHME UND -PROZESSIERUNG.....   | 2         |
| 3.3 LICHT-TRANSMISSIONS-AGGREGOMETRIE .....  | 3         |
| 3.3.1 Herstellen der Reagenzien .....  | 3         |
| 3.3.2 Herstellung von plättchenarmen (PPP) und plättchenreichem Plasma (PRP) .....           | 4         |
| 3.3.3 Vorbereiten der Messung .....  | 5         |
| 3.3.4 Durchführen der Messung .....  | 5         |
| 3.3.5 Auswertung .....   | 7         |
| 3.4 NUKLEINSÄUREEXTRAKTION .....   | 9         |
| 3.4.1 DNA-Extraktion.....  | 9         |
| 3.4.2 Bestimmung der Konzentration.....  | 10        |
| 3.4.3 Verdünnung von Nukleinsäuren .....   | 10        |
| 3.5 GENOTYPISIERUNG .....  | 11        |
| 3.6 WESTERN BLOT .....   | 12        |
| 3.6.1 Vorbereitung der Proben .....  | 12        |
| 3.6.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Blotting .....                                     | 13        |
| 3.6.3 Auswertung .....   | 15        |
| 3.7 HUMAN CYTOKINE ARRAY .....   | 16        |
| 3.7.1 Vorbereitung der Proben .....  | 16        |
| 3.7.2 Vorbereitung der Reagenzien .....  | 16        |
| 3.7.3 Durchführung des Arrays.....   | 16        |
| 3.7.4 Auswertung .....   | 18        |
| 3.8 STATISTISCHE ANALYSE.....  | 19        |
| <b>IV.     ERGEBNISSE.....</b>   | <b>20</b> |
| 4.1 EINFLUSS DER HÄUFIGEN GUCY1A1-VARIANTE AUF DIE THROMBOZYTEN .....                        | 20        |
| 4.1.1 Probanden und Genotypisierung .....  | 20        |
| 4.1.2 Assoziation des GUCY1A1-Genotyps auf die Inhibition der Thrombozytenaggregation.....   | 21        |
| 4.1.3 Auswirkung des GUCY1A1-Genotyps auf die cGMP-abhängige Phosphorylierung von VASP ..... | 22        |
| 4.1.4 Auswirkung des GUCY1A1-Genotyps auf die cAMP-anhängige Phosphorylierung von VASP.....  | 23        |
| 4.2. EINFLUSS DER GUCY1A1-VARIANTE AUF THROMBOZYTÄRE ZYTOKINE .....                          | 25        |
| 4.2.1 Zytokinausschüttung bei Thrombozytenaggregation.....                                   | 25        |
| <b>V.     DISKUSSION.....</b>  | <b>26</b> |

|  |            |
|--|------------|
| 5.1 EINFLUSS DER HÄUFIGEN <i>GUCY1A1</i> -VARIANTE AUF THROMBOZYTEN-AGGREGATION UNTER PRÄVENTIVER ASPIRIN-THERAPIE ..... | 26         |
| 5.2 EINFLUSS DER HÄUFIGEN <i>GUCY1A1</i> -VARIANTE AUF ZYTOKINAUSSCHÜTTUNG VON THROMBOZYTEN .....                        | 29         |
| 5.3 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK .....   | 30         |
| <b>VI. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>  | <b>31</b>  |
| <b>ANHANG .....</b>  | <b>XLI</b> |
| VERÖFFENTLICHUNGEN .....   | XLI        |
| DANKSAGUNG .....   | XLII       |



# Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis

|                  |   |
|------------------|---|
| $\alpha_1$ -sGC  | $\alpha_1$ -Untereinheit der löslichen Guanylatzyklase (soluble guanylyl cyclase) |
| AA               | Arachidonsäure (arachidonic acid)   |
| AA               | homozygoter Nicht-Risikoallelträger (SNP rs7692387 des <i>GUCY1A1</i> )           |
| ACE              | angiotensin converting enzyme   |
| ACS              | Akutes Koronarsyndrom   |
| ADP              | Adenosindiphosphat  |
| AG               | heterozygoter Nicht-Risikoallelträger (SNP rs7692387 des <i>GUCY1A1</i> )         |
| Ak               | Antikörper  |
| ANGPT1           | Angiopoetin-1   |
| AP               | Angina pectoris   |
| APS              | Ammoniumperoxodisulfat (ammonium persulfate)                                      |
| ASA              | acetylsalicylic acid/ Acetylsalicylsäure  |
| ASS              | Acetylsalicylsäure/ Aspirin   |
| ATP              | Adenosintriphosphat   |
| AU               | willkürliche Einheit (arbitrary unit)   |
| AUC              | Fläche unter der Kurve (area under the curve)                                     |
| BNP              | natriuretisches Peptid Typ B  |
| c                | Stoffmengenkonzentration  |
| cAMP             | zyklisches Adenosinmonophosphat   |
| Ca <sup>2+</sup> | Kalzium   |
| CaM              | Kalzium-Calmodulin-Komplex  |
| CCL5             | CC-Chemokin-5-Ligand  |
| CCS              | Chronisches Koronarsyndrom  |
| <i>CCT7</i>      | Gen, welches ein molekulares Chaperon kodiert                                     |
| CD154            | Membranprotein  |
| cGK              | cGMP-abhängige Proteinkinase G  |
| cGMP             | zyklisches Guanosinmonophosphat   |
| COX              | Cyclooxygenase  |
| CYP              | Cytochrom   |
| DMSO             | Dimethylsulfoxid  |
| DNA              | Desoxyribonukleinsäure  |
| EC               | Endothelzelle   |
| EDTA             | Ethylendiamintetraessigsäure (ethylene diamine tetraacadic acid)                  |
| EET              | Epoxyeicosatriensäure   |

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| eNOS                            | endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase                               |
| FA                              | finale Aggregation (final aggregation)                                |
| FAAH                            | Fettsäureamid-Hydrolase   |
| Fe <sup>II</sup>                | zweiwertiges Eisen (Bestandteil der Häm-Einheit)                      |
| GAPDH                           | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase                              |
| GC                              | Guanylatzyklase   |
| GG                              | homozygoter Risikoallelträger (SNP rs7692387 des <i>GUCY1A1</i> )     |
| G <sub>i</sub>                  | inhibitorisches G-Protein   |
| GMP                             | Guanosinmonophosphat  |
| GP IIb/IIIa                     | Glykoprotein IIb und IIIa   |
| G <sub>q</sub>                  | Phospholipase-C-gekoppeltes G-Protein                                 |
| GTP                             | Guanosin-Triphosphat  |
| <i>GUCY1A1</i>                  | Gen, welches die $\alpha$ 1-Untereinheit der sGC kodiert              |
| GWAS                            | Genomweite Assoziationsstudie   |
| HbA <sub>1c</sub>               | Langzeitzuckerwert (Blutzuckerniveau der letzten 8-12 Wochen im Blut) |
| HCl                             | Chlorwasserstoff  |
| HMG-CoA                         | Hydroxymethylglutaryl-Coenzym-A                                       |
| HPETE                           | Hydroxyperoxyarachidonsäure   |
| HRP                             | Meerrettichperoxidase   |
| HX                              | Hypoxine  |
| ICAM-1                          | intrazelluläres Adhäsionsmolekül 1                                    |
| IP                              | Prostazyklin I <sub>2</sub> Rezeptor                                  |
| IRAG                            | Inositoltriphosphat-Rezeptor-assoziiertes cGMP-Kinasesubstrat         |
| JAMC                            | junktionales Adhäsionsmolekül C (junctional adhesion molecule C)      |
| KHK                             | koronare Herzkrankheit  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | Kaliumhydrogenphosphat  |
| L-Arg                           | L-Arginin   |
| L-Cit                           | L-Zitrullin   |
| LDL                             | Lipoprotein mit niederer Dichte (low-density lipoprotein)             |
| Ldlr <sup>-/-</sup>             | Knockout des LDL-Rezeptors  |
| LOX                             | Lipoxygenase  |
| LT                              | Leukotriene   |
| LX                              | Lipoxine  |
| M                               | molar   |
| MA                              | maximale Aggregation (maximal aggregation)                            |
| meOH                            | Methanol  |
| MI                              | Myokardinfarkt  |

|                                  |  |
|----------------------------------|--|
| MIF                              | Makrophagen Migrations Inhibitions Faktor                    |
| MLCK                             | Myosin-Leichtketten-Kinase                                   |
| MLCP                             | Myosin-Leichtketten-Phosphatase                              |
| MMP                              | Matrixmetalloproteasen                                       |
| mRNA                             | messenger Ribonukleinsäure                                   |
| N                                | Normalität   |
| n                                | Anzahl   |
| NaCl                             | Natriumchlorid   |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | Dinatriumhydrogenphosphat                                    |
| NO                               | Stickstoffmonoxid  |
| NOS                              | Stickstoffmonoxid-Synthasen (nitric oxide synthases)         |
| N-STEMI                          | Nicht-ST-Hebungsinfarkt                                      |
| PAF                              | Plättchenaktivierender Faktor                                |
| PAR                              | Protease-aktivierter Rezeptor                                |
| PBS                              | Phosphatgepufferte Salzlösung                                |
| PBS-T                            | Phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween®                     |
| PCI                              | Perkutane Koronarintervention                                |
| PCR                              | Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)         |
| PDE                              | Phosphodiesterase  |
| PDGF                             | Thrombozytenwachstumsfaktor (platelet-derived growth factor) |
| PG                               | Prostaglandin  |
| pGC                              | membrangebundene Guanylatzyklase                             |
| PGE <sub>2</sub>                 | Prostaglandin E <sub>2</sub>                                 |
| PGH <sub>2</sub>                 | Prostaglandin H <sub>2</sub>                                 |
| PGI <sub>2</sub>                 | Prostazyklin/ Prostaglandin I <sub>2</sub>                   |
| PKA                              | cAMP abhängige Proteinkinase A                               |
| PKG                              | cGMP abhängige Proteinkinase G                               |
| PLA <sub>2</sub>                 | Phospholipase A <sub>2</sub>                                 |
| PLC                              | Phospholipase C  |
| PLD                              | Phospholipase D  |
| PP <sub>i</sub>                  | Pyrophosphat   |
| PPP                              | plättchenarmes Plasma (platelet poor plasma)                 |
| PRP                              | plättchenreiches Plasma (platelet rich plasma)               |
| p <sup>Ser157</sup> -VASP        | an Ser157 phosphoryliertes VASP                              |
| p <sup>Ser239</sup> -VASP        | an Ser239 phosphoryliertes VASP                              |
| P-VASP                           | phosphoryliertes VASP/ Phospho-VASP                          |
| PVDF                             | Polyvinylidenfluorid   |

|                        |   |
|------------------------|---|
| P2Y <sub>12</sub> -RA  | P2Y <sub>12</sub> -Rezeptorantagonist                           |
| RAAS                   | Renin-Angiotensin-Aldosteron-System                             |
| RBC                    | rote Blutkörperchen (red blood cell)                            |
| RCA                    | Rechte Koronararterie (Arteria coronaria dextra)                |
| RCX                    | Ramus circumflexus (der linken Koronararterie)                  |
| RIPA                   | Radioimmunoprecipitation Assay                                  |
| RIVA                   | Ramus interventricularis anterior (der linken Koronararterie)   |
| RNS                    | reaktive Sauerstoffspezies                                      |
| ROS                    | reaktive Sauerstoffspezies                                      |
| rpm                    | Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)                 |
| SDS                    | Natriumlaurylsulfat (sodium dodecyl sulphate)                   |
| s.e.m.                 | Standardfehler (standard error of the mean)                     |
| Ser <sub>157</sub>     | Serin157  |
| Ser <sub>239</sub>     | Serin239  |
| sGC                    | lösliche Guanylatzyklase (soluble guanylyl cyclase)             |
| SMC                    | glatte Muskelzelle (smooth muscle cell)                         |
| SNP                    | Einzelnukleotid-Polymorphismus (single nucleotide polymorphism) |
| STEMI                  | ST-Hebungsinfarkt   |
| TBE                    | TRIS-Borat-EDTA   |
| TEMED                  | Tetramethylethyldiamin  |
| T <sub>reg</sub> cells | regulatorische T-Zellen   |
| TRIS                   | Tris(hydroxyethyl)aminomethan                                   |
| TXA <sub>2</sub>       | Thromboxan A <sub>2</sub>                                       |
| UNG                    | Uracil-N-Glycosylase  |
| V                      | Volt  |
| VASP                   | Vasodilatator-stimulierendes Protein                            |
| VEGF                   | Endothelwachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor)    |
| VSMC                   | glatte Gefäßmuskelzelle (vascular smooth muscle cell)           |
| v/v                    | Volumenprozent  |
| vWF                    | von-Willebrand-Faktor   |
| w/v                    | Gewichtsprozent   |
| X                      | Stoffmengenanteil   |
| ZEB1                   | Zinc finger E-box-binding homeobox 1                            |

# Tabellenverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| <i>Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis</i> .....   | <i>IX</i> |
| <i>Tabelle 2: Medikamentöse Therapieoptionen der Koronaren Herzkrankheit.</i> .....                                   | <i>6</i>  |
| <i>Tabelle 3: Inhalt der verschiedenen Granula von Thrombozyten</i> .....   | <i>7</i>  |
| <i>Tabelle 4: Genotypfrequenz für den SNP rs7692387 des GUCY1A1-Gens in den verschiedenen Regionen weltweit</i> ..... | <i>12</i> |
| <i>Tabelle 5: Verwendete Chemikalien</i> .....  | <i>20</i> |
| <i>Tabelle 6: Verwendete Primärantikörper im Western Blot</i> .....   | <i>24</i> |
| <i>Tabelle 7: Verwendeter Sekundärantikörper im Westernblot (HRP-konjugiert)</i> .....                                | <i>24</i> |
| <i>Tabelle 8: Verwendete Verbrauchsmaterialien</i> .....  | <i>24</i> |
| <i>Tabelle 9: Verwendete Kits</i> .....   | <i>25</i> |
| <i>Tabelle 10: Verwendete Assays</i> .....  | <i>25</i> |
| <i>Tabelle 11: Verwendete Geräte</i> .....  | <i>25</i> |
| <i>Tabelle 12: Verwendete Software</i> .....  | <i>26</i> |
| <i>Tabelle 13: Vorbereiten der Küvetten mit PRP und PPP (pro Probe)</i> .....   | <i>5</i>  |
| <i>Tabelle 14: Schritt 1 - Inkubation mit ASS bzw. H<sub>2</sub>O für 5 min</i> .....                                 | <i>6</i>  |
| <i>Tabelle 15: Schritt 2 - Inkubation mit DMSO-H<sub>2</sub>O bzw. NO für 2 min</i> .....                             | <i>6</i>  |
| <i>Tabelle 16: Schritt 3 - Auslösen der Aggregation mit Arachidonsäure (AA)</i> .....                                 | <i>6</i>  |
| <i>Tabelle 17: Reagenzien zur Genotypisierung</i> .....   | <i>11</i> |
| <i>Tabelle 18: PCR-Bedingungen der Genotypisierung</i> .....  | <i>11</i> |
| <i>Tabelle 19: Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele</i> .....   | <i>13</i> |
| <i>Tabelle 20: Konzentrationen der Primärantikörper</i> .....   | <i>14</i> |
| <i>Tabelle 21: Proben und Reagenzien des Human Cytokine Array</i> .....   | <i>17</i> |
| <i>Tabelle 22: Genotyp-abhängige Charakteristika im Probandenkollektiv der Lichttransmissions-Aggregometrie</i> .21   |           |

# Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| <i>Abbildung 1: Abbildung und Text wie (Libby et al., 2011).</i> .....   | 3  |
| <i>Abbildung 2: Abbildung und Text wie (Semple, Italiano, &amp; Freedman, 2011).</i> .....                                     | 8  |
| <i>Abbildung 3: Abbildung und Text wie (Semple et al., 2011).</i> .....  | 10 |
| <i>Abbildung 4: Abbildung und Text wie (Wobst, Kessler, Dang, Erdmann, &amp; Schunkert, 2015).</i> .....                       | 12 |
| <i>Abbildung 5: Abbildung und Text wie (Derbyshire &amp; Marletta, 2012).</i> .....  | 14 |
| <i>Abbildung 6: Abbildung und Text wie (Feil &amp; Kemp-Harper, 2006).</i> .....   | 15 |
| <i>Abbildung 7: Abbildung und Text wie (Sonnweber, Pizzini, Nairz, Weiss, &amp; Tancevski, 2018).</i> .....                    | 16 |
| <i>Abbildung 8: Abbildung der Lichttransmissions-Aggregometrie.</i> .....  | 7  |
| <i>Abbildung 9: Quantifizierung der Aggregometrie.</i> .....   | 8  |
| <i>Abbildung 10: Genotyp-spezifische Thrombozytenreaktionen auf NO und ASS.</i> .....  | 22 |
| <i>Abbildung 11: Serin<sub>239</sub>-Phosphorylierung von VASP.</i> .....  | 23 |
| <i>Abbildung 12: Serin<sub>157</sub>-Phosphorylierung von VASP.</i> .....  | 24 |
| <i>Abbildung 13: Genotyp-abhängige Analyse des Human Cytokine Array Kit.</i> .....   | 25 |
| <i>Abbildung 14: Hypothetische Interaktion des Arachidonsäuremetabolismus mit dem NO-cGMP-Signalweg in Thrombozyten.</i> ..... | 27 |

# I. Einleitung

## 1.1 Die koronare Herzerkrankung (KHK)

Kardiovaskuläre Erkrankungen wie der Herzinfarkt oder der Schlaganfall sind die häufigsten Todesursachen weltweit (World Health Organization, 2020). In Europa verursachen kardiovaskuläre Erkrankungen mehr als 45 % der Todesfälle pro Jahr, was sich im Jahr 2016 auf vier Millionen Tote belief. Ca. 20 % dieser Tode werden durch die Koronare Herzerkrankung (KHK) verursacht (Townsend et al., 2016).

Die KHK wird durch Plaquebildung in der Arterienwand der Koronargefäße verursacht, was eine Einengung des Lumens bedingt. Diese so genannte Koronarstenose erzeugt einen reduzierten Blutfluss, der wiederum zu einer Minderversorgung (Ischämie) des Herzmuskels führt. Dies kann belastungsabhängig zu temporären pektanginösen Beschwerden des Patienten führen, welche durch ein Missverhältnis zwischen der Verfügbarkeit von Sauerstoff und dem aktuellen Bedarf des Herzens ausgelöst werden. Infolge einer Ruptur oder Erosion der Faserkappe der Plaques und dem daraus folgenden akuten thrombotischen Verschluss der Koronararterien kann es allerdings auch zu einem Herzinfarkt mit gegebenenfalls anschließendem Herzversagen kommen (H. Chen & Kassab, 2016; Klein & Gheorghiu, 2004; Lusus, 2000).

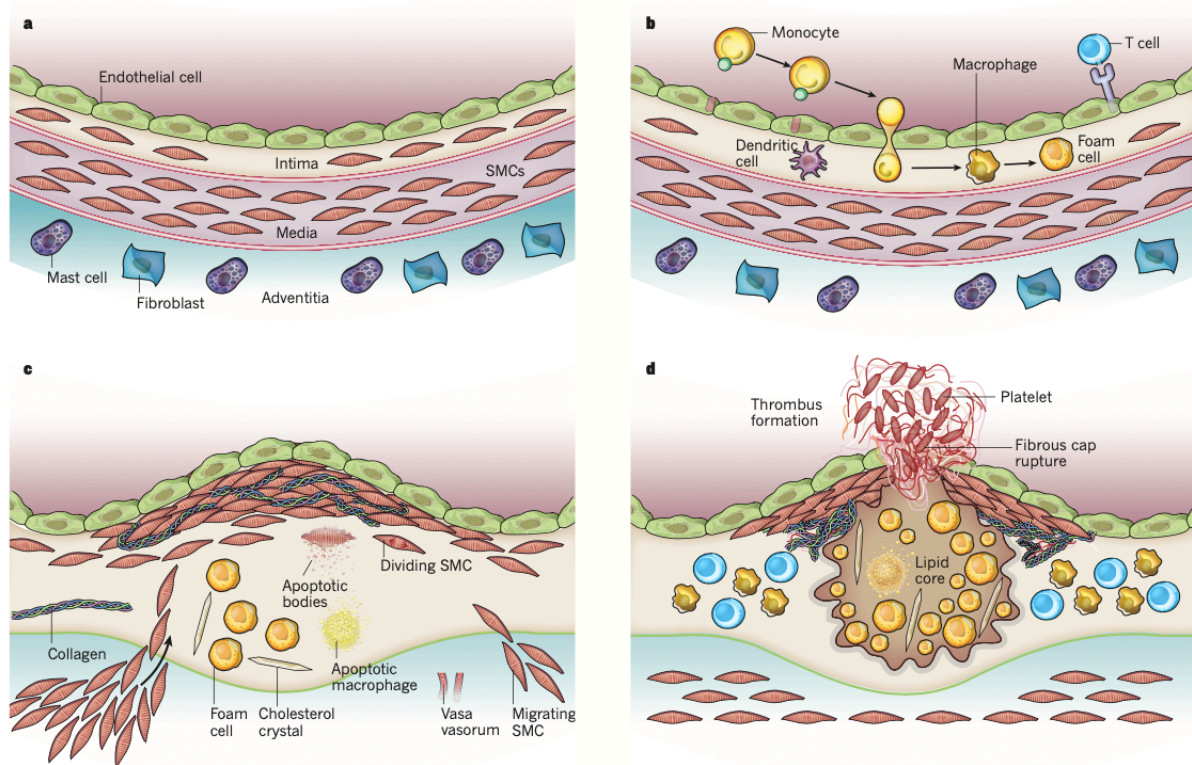
### 1.1.1 Pathophysiologie der Koronaren Herzerkrankung

Die Grundlage für die Entstehung einer koronaren Herzkrankheit ist die Atherosklerose. Die Entwicklung dieser chronischen Erkrankung der Arterienwand durchläuft verschiedene Stadien. Die physiologische Wand einer Arterie besteht aus drei Schichten: der Intima, der Media sowie der Adventitia (von innen nach außen) (H. Chen & Kassab, 2016; Rhodin, 1962) (vgl. Abbildung 1a). Die Adventitia (äußerste Schicht der Arterie) besteht typischerweise aus dichten Kollagenfasern, Elastinfasern, Fibroblasten sowie hydrophilen Makromolekülen (z.B. Proteoglykane, Glykoproteine usw.) und dient dazu, das Gefäß vor Überdehnung zu schützen und es in seiner Umgebung zu verankern (Clark & Glagov, 1985; Zoumi, Lu, Kassab, & Tromberg, 2004). Die Media (mittlere Schicht der Arterie) spielt unter physiologischen Bedingungen die größte mechanische Rolle in der Koronarwand (H. Chen & Kassab, 2016). Sie besteht aus konzentrisch angeordneten glatten Gefäßmuskelzellen (VSMCs, *vascular smooth muscle cells*), Elastinlamellen, Kollagenfasernbündeln sowie Elastinfibrillen (O'Connell

et al., 2008). Die Intima (innerste Schicht der Arterie) besteht aus Endothelzellen, der Basallamina, sowie einigen Kollagenfaserbündeln (Rhodin, 1962).

Im ersten Schritt des Entzündungsprozesses der Atherogenese werden die arteriellen Endothelzellen der Intima durch irritative Stimuli (z.B. Hypertension, Dyslipidämie usw.) aktiviert, Adhäsionsmoleküle zu exprimieren, wodurch Leukozyten, insbesondere Monozyten und T-Lymphozyten, an ihrer Oberfläche exprimiert werden. Verschiedene inflammatorische und immunmodulatorische Mediatoren, unter anderem Prostaglandine und Leukotriene, bestimmen die Kommunikation zwischen Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen. Beeinflusst durch Autakoide, wie Histamin, verändert sich parallel dazu die Permeabilität des Endothels, wodurch Leukozyten sowie Cholesterin-bindende Lipoproteine niedriger Dichte (LDL) in die Arterienwand eindringen können (Tabas, Williams, & Boren, 2007). Die Monozyten differenzieren sich in der Intima zu Gewebsmakrophagen und phagozytieren die Lipoproteinpartikel. Aufgrund ihrer mikroskopischen Erscheinung werden sie Schaumzellen (*foam cells*) genannt (vgl. Abbildung 1b). Als Folge verschiedener sezernierter Cytokine des beschädigten Endothels, wandern VSMC aus der Media in die Intima ein und proliferieren. Zudem produzieren sie extrazelluläre Matrix, wie z.B. Collagen- und Elastinfasern, welche dann die faserige Kappe bilden, die die Plaque bedeckt. Durch die ineffiziente Organisation der Plaque akkumuliert sich das nekrotische Zentrum der Plaque, die aus abgestorbenen Zellen und sezernierten Lipiden besteht (Libby, Ridker, & Hansson, 2011; Libby & Theroux, 2005) (vgl. Abbildung 1c). Im weiteren Verlauf kalzifiziert die Läsion, was unter anderem von oxidierten Lipiden moduliert wird (Demer, 2002). In diesem Zustand kann die Plaque über Jahre stabil bleiben. Die VSMC produzieren eine komplexe extrazelluläre Matrix. Zusammen mit den Endothelzellen und Monozyten sezernieren sie Matrixmetalloproteinasen (MMPs), welche eine Vielzahl an Vorgängen in der Gefäßzelle beeinflussen. Unter anderem destabilisieren sie die Plaque durch Degradierung der Faserkappe, was in einer Plaqueruptur mit Thrombusformation und einem Verschluss der Koronararterie resultieren kann (Finn, Nakano, Narula, Kolodgie, & Virmani, 2010; Libby & Theroux, 2005) (vgl. Abbildung 1d).





**Abbildung 1:** Abbildung und Text wie (Libby et al., 2011).

Stadien in der Atherogenese. **a**, Die normale Arterienwand besteht aus drei Schichten: der Intima, Media und Adventitia. **b**, Zu Beginn binden Leukozyten (meist Monozyten) an das aktivierte Endothel und migrieren in die Intima. Hier differenzieren sie sich zu Makrophagen und nehmen Lipide auf. Es entstehen Schaumzellen. **c**, Die weitere Ausbildung der Plaques erfolgt durch die Migration von SMCs aus der Media, deren Proliferation und die gesteigerte Synthese von extrazellulären Matrixmolekülen wie Kollagen, Elastin und Proteoglykane. Zudem entsteht durch die Apoptose einiger Zellen ein nekrotischer, lipidhaltiger Kern. Auch Cholesterinkristalle und Mikrogefäße können enthalten sein. **d**, Die größte Komplikation der Atherosklerose ist die Thrombose, welche oft durch die Ruptur der Faserkappe der Plaques entsteht. Hierdurch kommen prokoagulative Faktoren aus dem Blut in Kontakt mit den Gewebefaktoren was die Thrombusbildung auslöst und den Blutfluss im Gefäß verhindern kann.

### 1.1.2 Risikofaktoren der KHK

Die Pathogenese der KHK wird durch eine Vielzahl verschiedener Risikofaktoren bedingt. Zu den „beeinflussbaren“ Faktoren zählen beispielsweise arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Nikotinabusus, Übergewicht, Hypercholesterinämie oder auch psychosoziale Faktoren (Kannel, Dawber, Kagan, Revotskie, & Stokes, 1961; Kessler, Vilne, & Schunkert, 2016; Yusuf et al., 2004). All diese können durch therapeutische Interventionen oder eine Änderung des Lebensstils modifiziert werden. Auf der anderen Seite gibt es so genannte „nicht beeinflussbare“ Risikofaktoren für das Erkranken an einer KHK, wie z.B. das Alter, das männliche Geschlecht oder eine familiäre Prädisposition (D'Agostino et al., 2008; Marenberg, Risch, Berkman, Floderus, & de Faire, 1994; Mayer, Erdmann, & Schunkert, 2007). Zwillings- und Familienstudien zeigten, dass ein signifikanter Anteil von 40-50% der KHK auf Vererbung zurückzuführen ist (Marenberg et al., 1994; Peden & Farrall, 2011; Zdravkovic, Wienke,

Pedersen, & de Faire, 2007). Durch methodischen Fortschritt und internationale wissenschaftliche Kollaborationen ist es durch genomweite Assoziationsstudien (GWAS, *genome-wide association studies*) in den letzten Jahren möglich geworden, die genetischen Mechanismen und verantwortlichen Gene genauer zu analysieren. Die mittlerweile über 300 entdeckten genetischen Loci sind genomweit signifikant mit der KHK assoziiert (Aragam et al., 2022; Kessler & Schunkert, 2021). Dabei zeigt sich, dass es nur wenig Verbindungen zwischen den untersuchten Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs, *single nucleotide polymorphisms*) und traditionellen Risikofaktoren gibt; vielmehr wirken die SNPs vermutlich durch neue Signalwege (CARDIoGRAMplusC4D Consortium et al., 2013; Nikpay et al., 2015; Schunkert et al., 2011). Die hierbei entdeckten Risikoallele beeinflussen unter anderem den LDL-Cholesterin-Metabolismus (Musunuru et al., 2010; Samani et al., 2007), den Triglycerid-Metabolismus (Do et al., 2015), den Blutdruck (International Consortium for Blood Pressure Genome-Wide Association Studies et al., 2011; Levy et al., 2009; Newton-Cheh et al., 2009), den NO-cGMP-Signalweg (CARDIoGRAMplusC4D Consortium et al., 2013; Nikpay et al., 2015; Salvi et al., 2013), den Gefäßumbau (Coronary Artery Disease Genetics Consortium, 2011; Reilly et al., 2011; Schunkert et al., 2011) sowie Entzündungsprozesse (CARDIoGRAMplusC4D Consortium et al., 2013).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit einem Locus aus dem NO-cGMP-Signalweg (Signalkaskade mit Stickstoffmonoxid und zyklischem Guanosinmonophosphat, s. Kapitel 1.4.1). Der SNP rs7692387 befindet sich in einem Intron des Gens *GUCY1A1* auf Chromosom 4, welches für die  $\alpha_1$ -Untereinheit der löslichen Guanylatzyklase (sGC) kodiert (CARDIoGRAMplusC4D Consortium et al., 2013).

### 1.1.3 Klinik und Therapie der KHK

Die KHK bezeichnet Atherosklerose, die sich an den Koronararterien des Herzens manifestiert und durch Verhärtung, Elastizitätsverlust und Lumeneinengung zu einer Minderperfusion des Myokards führt. Diese geht mit einer Diskrepanz zwischen dem Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot einher. Hierbei unterscheidet man zwischen akuten (ACS) bzw. chronischen Koronarsyndromen (CCS) und einer asymptomatischen KHK. Je nachdem ob der Ramus interventricularis anterior (RIVA), der Ramus circumflexus (RCX) und/ oder die Arteria coronaria dextra (RCA) betroffen ist, unterscheidet man zudem zwischen einer Ein-, Zwei- oder Drei-Gefäß-Erkrankung.

Das Leitsymptom der Myokardischämie im Rahmen einer KHK ist die Angina pectoris, d.h. ein thorakales Druckgefühl bzw. retrosternale Schmerzen, die oft mit einer Ausstrahlung in den linken Arm, Hals, Unterkiefer, Oberbauch oder den Rücken einhergehen. Begleitet wird dies

oft von einer vegetativen Begleitsymptomatik, wie Unruhe und Angst. Man unterscheidet die stabile von der instabilen Angina pectoris. Die stabile Angina pectoris tritt oft im Rahmen psychischer oder physischer Belastung auf und ist durch das vollständige Abklingen der Beschwerden nach kurzer Zeit definiert. Hierbei handelt es sich um einen relativen Sauerstoffmangel, da das Myokard nur bei Belastung unterversorgt ist. Die instabile Angina pectoris hingegen kann auch in Ruhe bzw. bei geringer Belastung auftreten. Charakteristisch ist eine Progredienz der Symptomatik, eine Dauer länger als 20 min sowie ein fehlendes Ansprechen auf vasodilatative Medikamente (z.B. Nitrate). Eine instabile Angina pectoris kann Vorbote oder auch Symptom eines akuten Koronarsyndroms (ACS) sein und zeigt oft zusätzliche Beschwerden wie Übelkeit, Erbrechen, Atemnot oder Kaltschweißigkeit. Hierbei handelt es sich um einen absoluten Sauerstoffmangel des Herzens, welcher auch in Ruhe nicht kompensiert werden kann.

Die Behandlungsoptionen der KHK bestehen aus der medikamentösen und der interventionellen bzw. chirurgischen Therapie. Das Ziel dieser Maßnahmen ist die möglichst schnelle Revaskularisierung des verschlossenen Gefäßes. Interventionell geschieht dies mittels perkutaner Koronarintervention (PCI), bei der die Rekanalisation mithilfe eines Ballonkatheters und meistens einer zusätzlichen Stentimplantation erreicht wird. Die Operation am offenen, stillgelegten Herzen beinhaltet die Neuversorgung des Myokards über einen arteriellen Bypass oder einen aortokoronaren Venenbypass. Die medikamentöse Therapie versucht hingegen den Fortschritt der Atherosklerose aufzuhalten und bereits entstandene Myokardschäden und -umbauten zu verringern. Dabei haben Medikamente, die Thrombozyten hemmen oder den kardialen Sauerstoffverbrauch senken, einen wichtigen Anteil. Zudem gibt es Plaque-stabilisierende Medikamente, die zur Prävention erneuter Symptomatik verschrieben werden. Zu den thrombozytenhemmenden Medikamenten zählt Acetylsalicylsäure (ASS), die die Cyclooxygenase-1 (COX-1) in Thrombozyten irreversibel hemmt und somit die Aggregationsbereitschaft der Blutplättchen senkt. Eine weitere Gruppe sind P2Y<sub>12</sub>-Rezeptorantagonisten wie Clopidogrel, die an den P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor auf der Oberfläche der Thrombozyten binden. Auf diese Weise kann von Thrombozyten freigesetztes ADP über diesen Signalweg keine Aggregation mehr auslösen. Hierbei unterscheidet man zwischen irreversibler indirekter Hemmung und reversibler konzentrationsabhängiger Hemmung. Betablocker senken die Myokardkontraktilität und Herzfrequenz durch Rezeptorblockade der Betarezeptoren am Herzen, wodurch der Sauerstoffverbrauch und somit die -unterversorgung gesenkt wird. Über organische Nitrate kann dem Körper sonst physiologisch freigesetztes Stickstoffmonoxid (NO) zugeführt werden, was zu einer Hemmung der Thrombozytenaggregation und einer Relaxation der glatten Muskulatur führt und somit eine Gefäßdilatation verursacht. Kalziumantagonisten hingegen hemmen die L-Typ Kalziumkanäle in der glatten Muskulatur und senken den intrazellulären Kalziumspiegel. Dies

führt zu einer Gefäßdilataion und Senkung der Kontraktilität und Frequenz des Myokards und somit zu einer verbesserten Sauerstoffversorgung und einem verringerten Sauerstoffverbrauch.

Zur medikamentösen Prävention erneuter Beschwerden zählt die Stabilisation der atherosklerotischen Plaques. Hierbei gibt es zahlreiche Hinweise auf den positiven Effekt der Senkung des LDL-Spiegels durch HMG-CoA-Reduktasehemmer (Statine), Hemmung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (z.B. ACE-Hemmer) sowie oben bereits genannte Thrombozytenaggregationshemmer und Betablocker. Zudem zählen zu den präventiven Maßnahmen auch Lifestyle-Änderungen (z.B. Gewichtsreduktion, Verzicht auf Nikotin, moderates körperliches Ausdauertraining), die optimale Einstellung des Diabetes mellitus ( $HbA_{1c} < 6,5-7\%$ ) und der arteriellen Hypertonie (mittleres Risiko  $< 140/90$  mmHg, hohes Risiko  $< 130/80$  mmHg).

**Tabelle 2:** Medikamentöse Therapieoptionen der Koronaren Herzkrankheit.

| Medikament                              | Wirkansatz  |
|---|---|
| Acetylsalicylsäure                      | irreversible Hemmung COX in Thrombozyten; Aggregationshemmung   |
| P2Y <sub>12</sub> -Rezeptorantagonisten | Hemmung P2Y <sub>12</sub> -Rezeptor auf Thrombozyten; keine ADP-Wirkung; Aggregationshemmung                    |
| Betablocker                             | Senkung Myokardkontraktilität & Herzfrequenz; Senkung myokardialer Sauerstoffverbrauch                          |
| organische Nitrate                      | Hemmung Aggregation & Relaxation glatte Muskulatur (Gefäßdilataion)   |
| Kalziumantagonisten                     | Hemmung L-Typ Kalziumkanäle in glatter Muskulatur; Gefäßdilataion & Senkung Myokardkontraktilität und -Frequenz |
| HMG-CoA-Reduktasehemmer                 | Senkung LDL-Spiegel; Plaquestabilisation  |
| ACE-Hemmer                              | Hemmung RAAS-System; Senkung Blutdruck; Reduktion ventrikuläres Remodeling                                      |

Trotz großer Errungenschaften der modernen Kardiologie in den letzten Jahren bleiben sowohl die Rekanalisationsinterventionen als auch die medikamentösen Therapien sekundärprophylaktische Strategien als Reaktion auf eine bereits manifeste KHK.

## 1.2 Thrombozyten

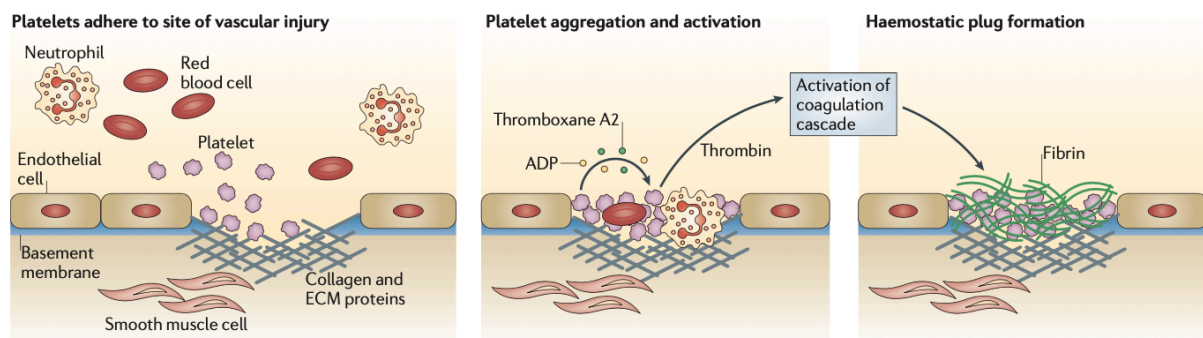
Thrombozyten (Blutplättchen, engl. *platelets*) sind mit den Gerinnungsfaktoren im Blutplasma für die Blutgerinnung verantwortlich. Mit einem Durchmesser von ca. 2-3  $\mu\text{m}$  sind sie die kleinsten Zellen bzw. Zellfragmente im Blutausschlag. Pro Mikroliter Blut hat jeder Mensch in etwa 150.000-400.000 Thrombozyten. Sie entstehen, stimuliert durch Thrombopoetin und Interleukin-11, durch Abschnürung aus Megakaryozyten im Knochenmark und haben eine Lebensdauer von ca. 5-12 Tagen, bevor sie im retikulären Bindegewebe der Milz abgebaut werden. Zudem sind etwa  $\frac{1}{3}$  aller Thrombozyten in der Milz zwischengespeichert. Im Ruhezustand haben Thrombozyten eine bikonvexe Form, welche nach Aktivierung durch Aktin-Remodeling Pseudopodien ausbildet. Diese bewirken die Adhäsion der aktivierten Thrombozyten an subendotheliales Bindegewebe sowie die Vernetzung der Thrombozyten untereinander (Aggregation). Obwohl Thrombozyten keinen Zellkern besitzen, sind sie begrenzt in der Lage, Proteinsynthese durch vorhandene mRNA im Zytoplasma durchzuführen. Ein Großteil der Proteine ist jedoch bereits von den Megakaryozyten vorproduziert und im Zytoplasma und den verschiedenen Granula gespeichert (s. Tabelle 3). Des Weiteren besitzen Thrombozyten Mitochondrien zur Energieversorgung, da die Verformung bei der Aktivierung Adenosintriphosphat (ATP) verbraucht, welches die Zellen durch Glykolyse, den Citratzyklus und oxidative Phosphorylierung herstellen. Zudem sezernieren Thrombozyten die plättchenaktivierenden Stoffe Thromboxan  $A_2$  ( $TXA_2$ ) und den Plättchen-aktivierenden Faktor (PAF).  $TXA_2$  bewirkt zudem eine Vasokonstriktion und wird von der COX-1 aus Arachidonsäure produziert.

**Tabelle 3:** Inhalt der verschiedenen Granula von Thrombozyten

| $\alpha$ -Granula             | $\delta$ -Granula | $\lambda$ -Granula |
|-------------------------------|-------------------|--------------------|
| Von-Willebrand-Faktor (vWF)   | ADP               | Saure Hydrolasen   |
| Fibrinogen (Faktor I)         | $Ca^{2+}$         |                    |
| Faktor V                      | Serotonin         |                    |
| Faktor VIII                   |                   |                    |
| Fibronectin                   |                   |                    |
| Wachstumsfaktoren: PDGF, VEGF |                   |                    |
| $\alpha_2$ -Antiplasmin       |                   |                    |

### 1.2.1 Aktivierung und Hemmung der Thrombozyten

Sobald in einem Blutgefäß eine Verletzung inklusive Endothelschaden auftritt, werden subendotheliale Bindegewebsproteine wie Kollagen freigelegt. Diese bewirken, dass frei zirkulierender von-Willebrand-Faktor (vWF) aus dem Blut an das Kollagen binden. Zudem bindet der vWF an den von-Willebrand-Rezeptor (Glykoprotein Ib) auf der Thrombozytenmembran und bewirkt eine Verbindung des Kollagens aus dem subendothelialen Bindegewebe mit den Thrombozyten (Adhäsion) und gleichzeitig deren Aktivierung. Die zuvor diskoiden Plättchen durchlaufen nun eine Formveränderung, bei der sie kugelförmig werden und Pseudopodien ausbilden, was ihre Oberfläche vergrößert. Diese wandadhärenten Thrombozyten sezernieren nun ADP aus ihren  $\delta$ -Granula, welches wiederum an den ADP-Rezeptor auf anderen Thrombozyten bindet. Dieser  $G_q$ -Protein-gekoppelte Rezeptor bewirkt über einen Signalweg die Ausbildung von Pseudopodien und die Stimulation der **Cyclooxygenase** zur verstärkten Produktion von Thromboxan  $A_2$ . Dadurch kommt es zu einer verstärkten Degranulation der Thrombozyten. Auf diese Weise erfolgt eine positive Rückkoppelung durch weitere aktivierte Thrombozyten. Die Thrombozytenaktivierung bewirkt zudem eine Konformationsänderung des Fibrinogen-Rezeptors, bestehend aus Glykoprotein IIb und IIIa (GP IIb/IIIa), auf der Oberfläche der Thrombozyten. Dieser bindet nun Fibrinogen aus dem Blutplasma, wobei ein Fibrinogenmolekül zwei Thrombozyten miteinander bzw. mit der defekten Endothelschicht verbindet. Auf diese Weise entsteht das dichte Netzwerk des „weißen Thrombus“ (vgl. Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Abbildung und Text wie (Semple, Italiano, & Freedman, 2011).

Thrombozytenfunktion in der Hämostase. Die defekte Endothelschicht exponiert Kollagen und Membranproteine, die das Anhaften der Thrombozyten ermöglichen. Diese aggregieren und sezernieren Mediatoren wie ADP und Thromboxan  $A_2$ . Dadurch entsteht eine verstärkte Degranulation und positive Rückkopplung durch immer mehr aktivierte Thrombozyten, welche durch die Bindung von Fibrinogen ein dichtes Netzwerk bilden.

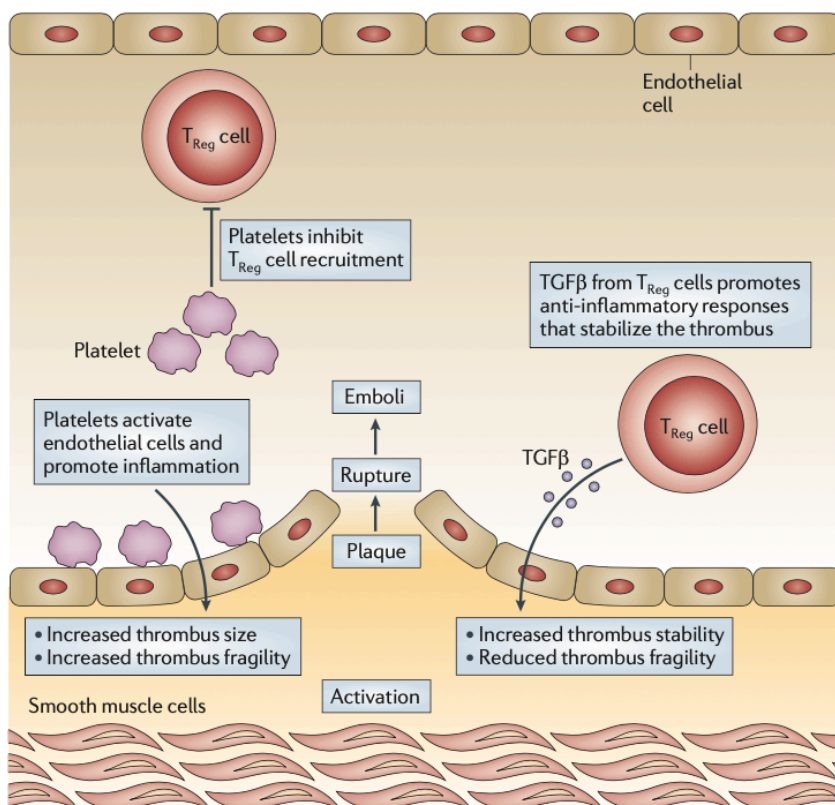
Dem kaskadenartigen Prozess der Blutgerinnung ist das gegenregulierende System der Gerinnungshemmung entgegengesetzt, um ein physiologisches Gleichgewicht herzustellen. Hierfür werden diverse Proteine wie Antithrombin, Thrombomodulin, Protein C und S, NO usw. von den Zellen des Blutplasmas sowie des Endothels freigesetzt. Diese Antagonisten hemmen auf unterschiedliche Weise die Aktivierung der Thrombozyten. Beispielsweise aktivieren sie über verschiedene Signalwege die Guanylatzyklase und Adenylylzyklase, was einen Anstieg der *second messenger* zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) sowie zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) bewirkt, welche wiederum entsprechende Signalkaskaden aktivieren. Beide Signalwege werden unter Punkt 1.4 und 1.5 weiterführend erläutert.

### 1.2.2 Funktion in Myokardinfarkt und Atherosklerose

Der häufigste Grund für einen Tod infolge eines Myokardinfarktes ist mit 73% die Ruptur der dünnen Fibrinkappe über einer atherosklerotischen Plaque in den Koronarien mit folgendem thromboembolischen Ereignis (Davies, 1992; Finn et al., 2010; Roberts, 1972). Hypercholesterinämie geht mit einer erhöhten Aktivität der Blutplättchen in der verletzen Arterienwand und somit erhöhtem Risiko für akute thromboembolische Ereignisse einher (Lacoste et al., 1995). Zudem stimuliert eine rupturierte Plaque auf unterschiedlichen Wegen die Thrombusbildung. Der lipidhaltige Kern der vulnerablen Plaques aktiviert die Thrombozyten bis zu sechsmal mehr als andere Läsionen inklusive Adventitia und kollagenreiche Matrix. Zudem bewirkt der von Monozyten und Schaumzellen sezernierte Gewebefaktor (TF, *tissue factor*) zusätzliche Gerinnungsaktivität (Fernandez-Ortiz et al., 1994; Toschi et al., 1997; Wilcox, Smith, Schwartz, & Gordon, 1989). Auf diese Weise kommt es zu einer positiven Rückkopplung und kaskadenartigen Aktivierung von weiteren Thrombozyten. Die durch die verletzte Gefäßwand ausgelöste Gerinnungskaskade endet in der Aktivierung von Thrombin aus Prothrombin. Dieses wiederum spaltet Fibrin aus Fibrinogen, was sich mit Thrombozyten, der Gefäßwand und untereinander quervernetzt und einen Thrombus bildet. Thrombin aktiviert zudem über Protease-aktivierte Rezeptoren (PARs) weitere Thrombozyten und regt VSMC zu Proliferations- und Migrationsprozessen an (Stouffer & Runge, 1998).

Obwohl sie eine zentrale Rolle in der Blutgerinnung spielen, beeinflussen Thrombozyten diverse Prozesse, die über Hämostase und Thrombinbildung hinaus gehen. Ähnlich wie Leukozyten üben sie einen großen Einfluss auf Entzündungsprozesse und Autoimmunreaktionen, die Integrität der Gefäße sowie Wundheilung aus (Semple et al., 2011; Smyth et al., 2009). Jüngere Studien legen nahe, dass sie multiple pro- und antiinflammatorische sowie angiogene Moleküle sezernieren. Sie spielen eine große Rolle in diversen Krankheitsbildern von Atherosklerose und Angiogenese, über Tumor- und Metastasenentwicklung bis hin zu Sepsis und Abstoßungsreaktionen bei Transplantationen

(Smyth et al., 2009). Die Erkenntnis, dass die Atherosklerose eine entzündliche Genese hat, führte auch zur Diskussion antiinflammatorischer Ansätze bei Thrombozyten (Ross, 1999). Entzündliche Prozesse verändern die gerinnungsfördernden und -hemmenden Eigenschaften des Endothels, was zu einer vermehrten Kommunikation zwischen den Leukozyten, Endothelzellen und Blutplättchen führt. Dies wird primär durch das von den Thrombozyten sezernierte P-Selektin vermittelt (Burger & Wagner, 2003). Außerdem setzen die aktivierten Blutplättchen, wenn sie adhären mit atherosklerotischem, inflammatorischem Endothel verbunden sind, weitere proinflammatorische Mediatoren, wie CD154, IL-1 $\beta$  und CCL5 frei (Lindemann et al., 2001). Des Weiteren bewirken Thrombozyten durch die Expression des junctionalen Adhäsionsmoleküls C (JAMC) die Adhäsion und Aktivierung von dendritischen Zellen, was den Fortschritt der Atherosklerose begünstigt (Langer et al., 2007). Durch die Sekretion von CD154 hemmen die Blutplättchen die Rekrutierung von regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$  cells), was die Entzündung und auch die Bildung von Atherosklerose in anfänglichen sowie fortgeschrittenen Stadien fördert (Lievens et al., 2010) (vgl. Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Abbildung und Text wie (Semple et al., 2011).

Die Sezernierung von CD154 aus Thrombozyten spielt eine wesentliche Rolle in der Plaquebildung. Dies entsteht beispielsweise durch die Hemmung von regulierenden T-Zellen und fördert somit ein inflammatorisches Milieu, welches den Thrombus destabilisiert.



## 1.3 Risikogen *GUCY1A1*

### 1.3.1 Mutationen in *GUCY1A1*

Seit vielen Jahren ist der Herzinfarkt die führende Todesursache in der westlichen Welt (Weltgesundheitsorganisation 2020). Die Bedeutung der genetischen Prädisposition für die KHK und den Herzinfarkt wird am besten durch den Vorhersagewert einer positiven Familienanamnese gezeigt (Lloyd-Jones et al., 2004). Durch die neu gewonnene Möglichkeit der Exom-Sequenzierung in Familien mit mehreren betroffenen Individuen wurde die Identifikation von Mutationen revolutioniert (Bamshad et al., 2011). Mit dieser Methode ist es unserer Arbeitsgruppe in einem vorherigen Projekt gelungen, zwei heterozygote Mutationen in zwei funktional verwandten Genen zu entdecken. *GUCY1A1* (nach einer früheren Nomenklatur *GUCY1A3*) kodiert für die  $\alpha_1$ -Untereinheit der löslichen Guanylatzyklase (sGC), *CCT7* kodiert für ein molekulares Chaperon, welches unter anderem die sGC stabilisiert (Erdmann et al., 2013; Leitner et al., 2012; Mergia, Friebe, Dangel, Russwurm, & Koesling, 2006). Durch Stimulation mit NO produziert die sGC zyklisches Guanosin-Monophosphat (cGMP), welches die Vasodilatation anregt und die Aggregation der Thrombozyten hemmt (Zabel, Weeger, La, & Schmidt, 1998). Durch Mutationen in *GUCY1A1* und *CCT7* wird die Aktivität der sGC durch eine Reduktion ihrer  $\alpha_1$ -Untereinheit beeinträchtigt. Betroffene Thrombozyten mit digener Mutation besitzen weniger sGC und können nach NO-Stimulierung weniger cGMP produzieren. Bei Mäusen, die die  $\alpha_1$ -Untereinheit nicht exprimieren, konnte eine beschleunigte Thrombusformation nach einer Endothelverletzung beobachtet werden, im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (Erdmann et al., 2013).

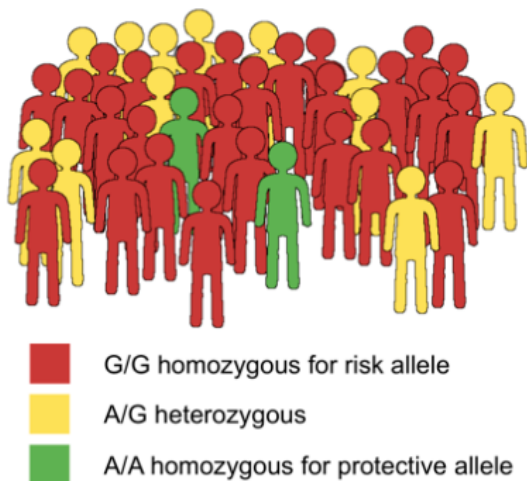
### 1.3.2 Häufige Varianten in *GUCY1A1*

Der SNP rs7692387 ist eine häufige Variante im *GUCY1A1*-Gen, die signifikant mit KHK und Herzinfarkt assoziiert ist (CARDIoGRAMplusC4D Consortium et al., 2013). Das Risikoallel G kommt in der Bevölkerung sehr häufig vor: ca. 63 % der europäischen Bevölkerung sind homozygote Risikoallelträger (GG), während nur ca. 4 % homozygote Nicht-Risikoallelträger (AA) sind (Ensembl, 2022) (vgl. Tabelle 4). Auch für die häufige Variante konnte gezeigt werden, dass das Risikoallel G die Expression von *GUCY1A1* und damit die Verfügbarkeit der sGC reduziert (Kessler et al., 2017).

**Tabelle 4:** Genotypfrequenz für den SNP rs7692387 des *GUCY1A1*-Gens in den verschiedenen Regionen weltweit.

Quelle: 1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies (Ensembl, 2022).

| Genotyp          |           | AA    | AG    | GG    |
|------------------|-----------|-------|-------|-------|
| Frequenz/ Region | Europa    | 0,036 | 0,338 | 0,626 |
|                  | Afrika    | 0,002 | 0,106 | 0,893 |
|                  | Amerika   | 0,043 | 0,331 | 0,625 |
|                  | Ost-Asien | 0,046 | 0,331 | 0,623 |
|                  | Süd-Asien | 0,035 | 0,294 | 0,671 |
|                  | Insgesamt | 0,030 | 0,266 | 0,704 |



**Abbildung 4:** Abbildung und Text wie (Wobst, Kessler, Dang, Erdmann, & Schunkert, 2015).

In der europäischen Bevölkerung sind 60% der Individuen homozygot für das Risikoallel und 40 % entweder heterozygot (36 %) oder homozygot für das Nicht-Risikoallel.

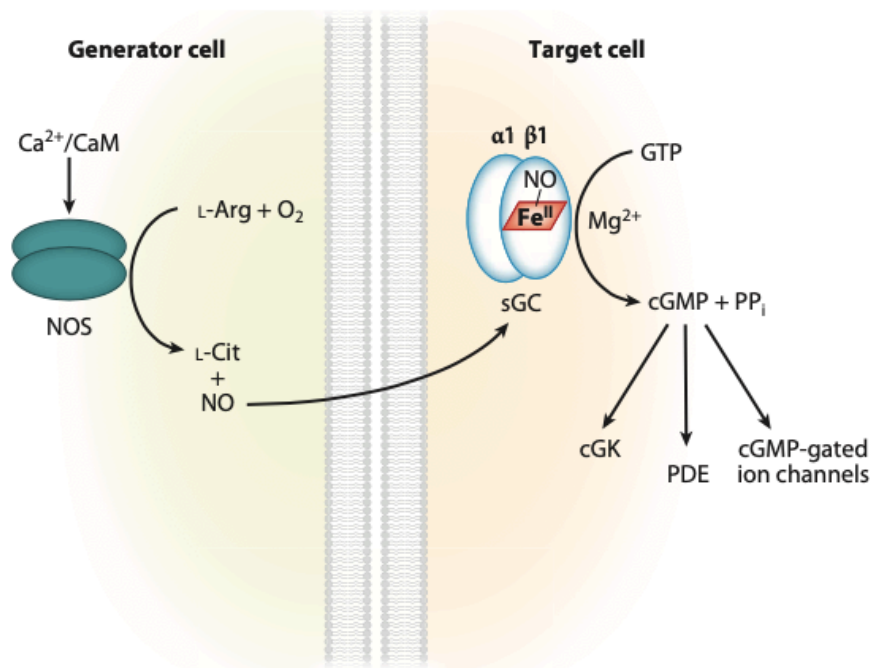
## 1.4 Die lösliche Guanylatzyklase (sGC)

Die Guanylatzyklase (GC) ist das Enzym, das die Konversion von Guanosin-Triphosphat (GTP) zu cGMP katalysiert. Sie existiert in einer membrangebundenen und einer löslichen, zytosolischen Form und kommt in den meisten Geweben von Säugetieren vor (Chrisman, Garbers, Parks, & Hardman, 1975; Kimura & Murad, 1974). Die membrangebundene, nicht-lösliche GC gehört zur Gruppe der rezeptorgebundenen Enzyme und wird von verschiedenen Peptidhormonen stimuliert. Während die membrangebundene GC als Homodimer oder komplexere Struktur vorliegt, ist die sGC ein heterodimeres Protein, das aus einer größeren  $\alpha$ - und einer kleineren  $\beta$ -Untereinheit besteht, welche beide für die katalytische Aktivität benötigt werden (Harteneck, Koesling, Soling, Schultz, & Bohme, 1990; Kamisaki et al., 1986). Es wurden im menschlichen Organismus vier verschiedene Untereinheiten identifiziert:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  und  $\beta_2$ . Neben der häufigsten Isoform  $\alpha_1/\beta_1$  bildet  $\beta_1$  auch mit  $\alpha_2$  ein funktionales Heterodimer. Beide Isoformen werden durch das inter- und intrazelluläre Signalmolekül NO stimuliert, welches an die prosthetische Häm-Gruppe der sGC bindet und somit durch eine Konformationsänderung eine mehr als 200fach gesteigerte katalytische Aktivität bewirkt (Humbert et al., 1990; Russwurm, Behrends, Harteneck, & Koesling, 1998; Stone & Marletta, 1996). Im Gegensatz dazu zeigt die  $\beta_2$ -Untereinheit mit keiner der beiden  $\alpha$ -Untereinheiten eine katalytische Aktivität, *ex vivo* kann  $\beta_2$  allerdings als Homodimer funktionieren (Koglin, Vehse, Budaeus, Scholz, & Behrends, 2001). Des Weiteren sind  $\alpha_1/\alpha_1$ - sowie  $\beta_1/\beta_1$ -Isoformen enzymatisch inaktiv (Zabel, Hausler, Weeger, & Schmidt, 1999). Während die  $\alpha_1$ - und  $\beta_1$ -Untereinheiten in fast allen humanen Zellen ubiquitär vorkommen, findet man die  $\alpha_2$ -Untereinheit vermehrt in Gehirn, Plazenta, Milz und Uterus exprimiert (Budworth, Meillerais, Charles, & Powell, 1999). Ein weiterer Unterschied ist die intrazelluläre Lokalisation der Isoformen: die  $\alpha_1/\beta_1$ -Isoform kommt im Zytosol der Zelle vor, während die  $\alpha_2/\beta_1$ -Isoform membrangebunden ist (Russwurm, Wittau, & Koesling, 2001).

### 1.4.1 Der NO-cGMP-Signalweg

Der *endothelium-derived relaxing factor* (NO) ist ein vom Endothel freigesetztes Molekül, welches bei mechanischer oder chemischer Stimulierung eine Dilatation der Blutgefäße herbeiführt (Furchgott & Zawadzki, 1980; Ignarro, Buga, Wood, Byrns, & Chaudhuri, 1987; Palmer, Ferrige, & Moncada, 1987). NO wird von der Enzymfamilie der NO-Synthasen (NOS) durch sequenzielle Oxidation der Aminosäure L-Arginin synthetisiert (Palmer, Rees, Ashton, & Moncada, 1988). Es gibt mindestens drei bekannte NOS-Isoformen, die neuronale NOS, die induzierbare NOS in Makrophagen sowie die endotheliale NOS (eNOS) (Lamas, Marsden, Li, Tempst, & Michel, 1992). Die eNOS spielt in der Regulation des Blutflusses die wichtigste

Rolle (Ursell & Mayes, 1993). Sie wird durch diverse Stimuli, wie Scherstress, Acetylcholin, Zytokine und von Plättchen ausgeschüttete Faktoren zur Produktion von NO aktiviert und benötigt die Anwesenheit eines Kalzium/Calmodulin-Komplexes (Busse & Fleming, 1995; Mattila & Thomas, 2014). NO bindet an die Häm-Einheit der sGC (s.o.) und aktiviert das Heterodimer zur Konversion von GTP zu dem intrazellulären *second messenger* cGMP und Pyrophosphat (PP<sub>i</sub>) (Waldman & Murad, 1987). Das synthetisierte cGMP aktiviert diverse Effektor Proteine wie die cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG), Phosphodiesterasen (PDE) und Ionenkanäle die unter anderem zur Inhibition der Thrombozytenaggregation, einer Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur und der Ausschüttung von Neurotransmittern führen (Dangel et al., 2010; Luo et al., 2012; Warner, Mitchell, Sheng, & Murad, 1994).



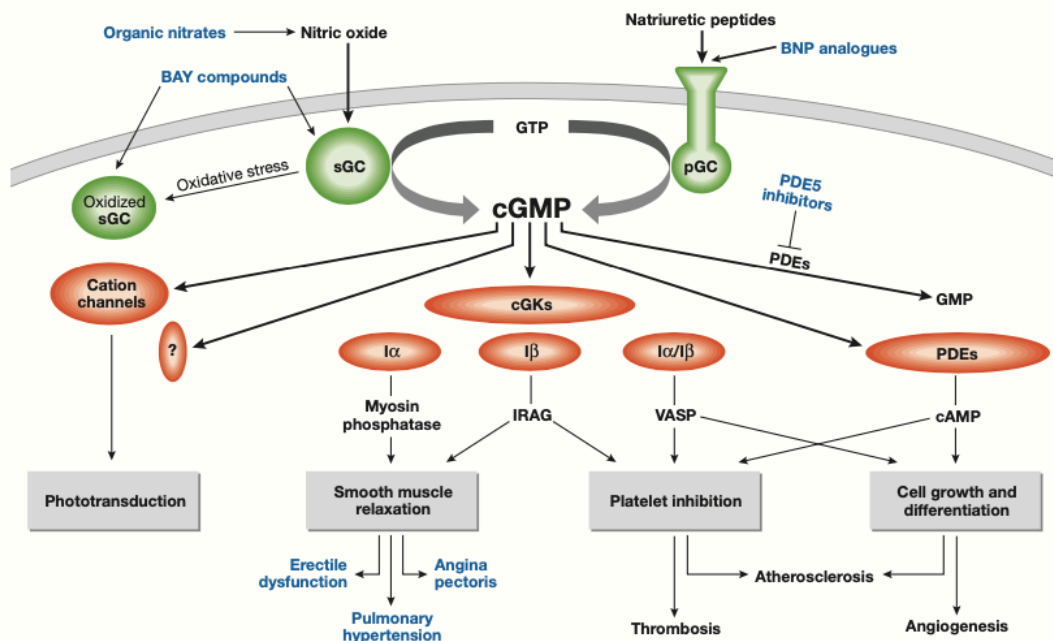
**Abbildung 5:** Abbildung und Text wie (Derbyshire & Marletta, 2012).

Der NO-cGMP-Signalweg. Ein Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin (CaM)-Komplex bindet an die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS), diese katalysiert die Oxidation von L-Arginin (L-Arg) zu L-Zitrullin (L-Cit) und NO. NO bindet an die Häm-Einheit (Fe<sup>II</sup>) der sGC. Diese Bindung führt zu einer signifikanten Erhöhung von cGMP und PP<sub>i</sub>. cGMP aktiviert cGMP-abhängige Proteinkinasen (cGK oder PKG), PDEs und Ionenkanäle.

#### 1.4.2 Effekt der cGMP-anhängigen Proteinkinase in Thrombozyten und glatter Gefäßmuskulatur

Die PKG ist das primäre Zielprotein von cGMP. Nach der Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase PKG vermittelt es den Hauptteil der cGMP-abhängigen Effekte. Zum einen phosphoryliert die  $\alpha$ -Isoform der PKG die Myosin-Leichtketten-Phosphatase (MLCP). Diese kommt in den glatten Muskelzellen vor und dephosphoryliert ihrerseits die regulatorischen

Myosin-Leichtketten, welche von der Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK) aktiviert wurden. Auf diese Weise unterbricht die MLCP die Quervernetzungen zwischen Aktin und Myosin, was zu einer Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur führt (Lincoln, 2007). Die I $\beta$ -Isoform der PKG phosphoryliert das Inositoltriphosphat-Rezeptor-assoziierte cGMP-Kinasesubstrat (IRAG) (Schlossmann et al., 2000). Durch die Aktivierung blockiert IRAG den Ca<sup>2+</sup>-Transport und senkt somit die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration. Dies führt zur Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur (Desch et al., 2010) sowie der Hemmung der Thrombozytenaggregation und *in vivo* Thrombose (Antl et al., 2007). Ein weiteres Substrat der Proteinkinase G sowie auch der Proteinkinase A (PKA) (Halbrugge, Friedrich, Eigenthaler, Schanzenbacher, & Walter, 1990) ist das Vasodilatator-stimulierende Phosphoprotein (VASP). Es kann von den beiden Proteinkinasen A und G an Serin<sub>157</sub>, Serin<sub>239</sub> und Threonin<sub>278</sub> phosphoryliert werden und wird dann als Phospho-VASP (P-VASP) bezeichnet (Butt et al., 1994; Halbrugge et al., 1990; Smolenski et al., 1998). P-VASP korreliert mit der Inhibition der Plättchenaggregation. Insbesondere inhibiert es hierbei die Bindung von Fibrinogen an den Glykoprotein-Rezeptor IIb/IIIa der Thrombozyten (Halbrugge et al., 1990; Horstrup et al., 1994).

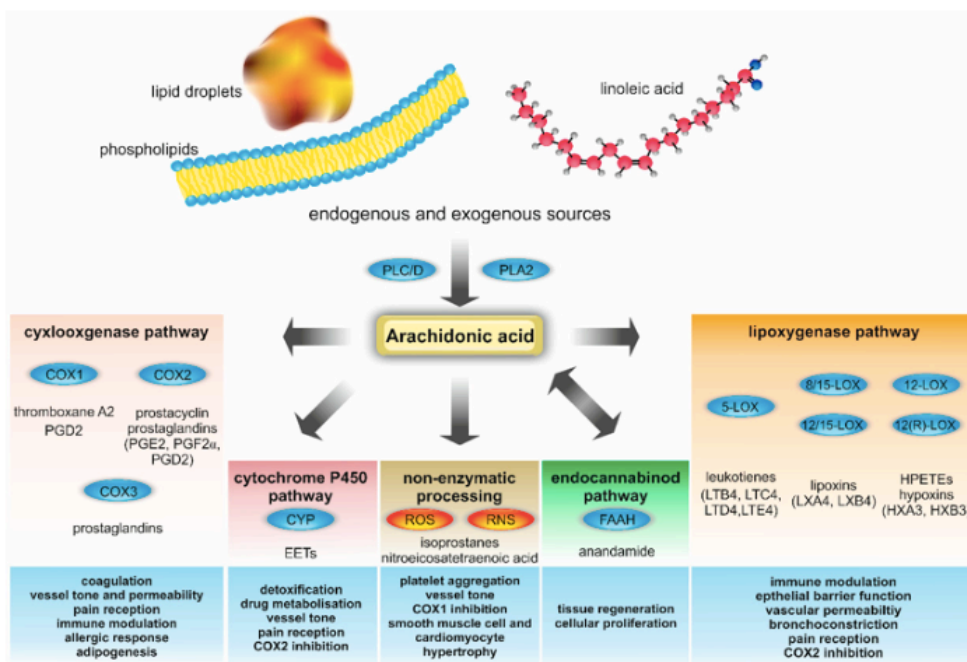


**Abbildung 6:** Abbildung und Text wie (Feil & Kemp-Harper, 2006).

**Konzept des cGMP Signalwegs.** Die Grafik zeigt cGMP-Generatoren (grün) und -Effektoren (rot) sowie weiterführende Signalwege und Zellfunktionen (graue Boxen), die eine Rolle für den Effekt von endogenem cGMP und/ oder cGMP-erhöhenden Medikamenten (blau) spielen. Der untere Teil zeigt aktuelle (blau) und potenzielle (schwarz) Indikationen für cGMP-modulierende Medikation. *BNP* (natriuretisches Peptid Typ B), *cGKs* (cGMP-abhängige Proteinkinasen), *IRAG* (*IP3* Rezeptor-assoziiertes cGKI $\beta$ -Substrat), *PDEs* (Phosphodiesterasen), *pGC* (membrangebundene Guanylatzyklase), *sGC* (lösliche Guanylatzyklase), *VASP* (Vasodilatator-stimulierendes Phosphoprotein).

## 1.5 Der Arachidonsäure-Metabolismus

Die vierfach ungesättigte C20-Fettsäure Arachidonsäure (AA) wird bei Bedarf von der Phospholipase A<sub>2</sub> aus der Zellmembran freigesetzt. Aus Arachidonsäure können nun durch zwei unterschiedliche Reaktionswege verschiedene Eicosanoide entstehen: Die Lipoxygenase katalysiert die Synthese von Leukotrien A<sub>4</sub> das unter anderem eine Bronchokonstriktion im Bronchialgewebe und eine erhöhte Kapillarpermeabilität im Gefäßsystem bewirkt. Die COX katalysiert den Einbau zweier Sauerstoffmoleküle, wodurch das zyklische Prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) entsteht. PGH<sub>2</sub> kann nun wiederum in verschiedene Prostaglandine (D, E, F und I) sowie TXA<sub>2</sub> umgewandelt werden. Während in den Thrombozyten aus Arachidonsäure hauptsächlich TXA<sub>2</sub> entsteht, was ein potenter Stimulator der Plättchenfunktion ist, produziert das Gefäßendothel aus Arachidonsäure primär Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>), was die Plättchenaggregation verhindert (Needleman, Turk, Jakschik, Morrison, & Lefkowitz, 1986; Thomas et al., 1998).



**Abbildung 7:** Abbildung und Text wie (Sonnweber, Pizzini, Nairz, Weiss, & Tancevski, 2018).

Metabolite und Enzyme des Arachidonsäure-(AA)Metabolismus und ihre biologische Funktion in metabolischen und kardiovaskulären Erkrankungen. Endogene AA stammt hauptsächlich aus Zellmembran-Phospholipiden, die von der Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>/PLA2), Phospholipase C (PLC) und Phospholipase D (PLD) verarbeitet werden. Freie AA dient als Vorgänger für eine Fülle von Metaboliten, inklusive Prostaglandine (PGs), Prostazykline, Thromboxane, Leukotriene (LT), Lipoxine (LX), Hypoxine (HX), Anandamide und Epoxyeicosatriensäuren (EETs). Zusätzlich zur enzymatischen Verarbeitung von AA gibt es auch nicht-enzymatische Metabolisierung, die für die Produktion von Isoprostanen und Nitroeicosatriensäure wichtig ist. Viele Metabolite der AA sind äußerst bioaktiv und an verschiedenen entscheidenden lebenswichtigen Prozessen beteiligt. Relevante biologische Funktionen in metabolischen und kardiovaskulären Krankheiten sind in den blauen Boxen zusammengefasst. COX (Cyclooxygenase), CYP (Cytochrom), ROS (Reaktive Sauerstoffspezies), RNS (Reaktive Stickstoffspezies), FAAH (Fettsäureamid-Hydrolase), LOX (Lipoxygenase).

### 1.5.1 Thromboxan-Synthase

Die Thromboxan-Synthase katalysiert die Isomerisierung von  $\text{PGH}_2$  in  $\text{TXA}_2$ . Dieses kommt hauptsächlich in den Thrombozyten vor und stimuliert dort G-Protein-gekoppelt die Vasokonstriktion, die Thrombozytenaggregation und die Entleerung thrombozytärer Granula (Fontana, Zufferey, Daali, & Reny, 2014; Nakahata, 2008).  $\text{TXA}_2$  gilt als ein potenter Stimulator der Thrombozytenfunktion, während Prostazyklin die Thrombozytenaggregation inhibiert und der Effekt von Prostaglandin  $\text{E}_2$  von der Konzentration abhängig ist (s.u.) (Fabre et al., 2001; Thomas et al., 1998).

### 1.5.2 Der $\text{PGE}_2$ /cAMP-Signalweg

Prostaglandine kommen in einer Vielzahl verschiedener Zelltypen vor, u.a. in Makrophagen, Endothelzellen, Niere, Belegzellen des Magens und dem Hypothalamus. Durch die Prostaglandin-E-Synthase wird in Thrombozyten Prostaglandin  $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$  aus  $\text{PGH}_2$  synthetisiert (Smith & Willis, 1970). Als Reaktion auf Entzündungsmediatoren wird von Makrophagen (Brock, McNish, & Peters-Golden, 1999; Matsumoto et al., 1997) und glatter Gefäßmuskulatur (Bishop-Bailey et al., 1997) überwiegend  $\text{PGE}_2$  sezerniert.  $\text{PGE}_2$  bindet an vier verschiedene Formen des G-Protein-gekoppelten  $\text{PGE}_2$ -Membranrezeptors vom Rhodopsintyp:  $\text{EP}_1$ ,  $\text{EP}_2$ ,  $\text{EP}_3$  und  $\text{EP}_4$  (Narumiya, Sugimoto, & Ushikubi, 1999). In den Thrombozyten von Mäusen wurde die mRNA für  $\text{EP}_2$ ,  $\text{EP}_3$  und  $\text{EP}_4$  gefunden, wobei die  $\text{EP}_3$ -Expression größtenteils überwiegt (Ma et al., 2001). Der Signalweg von  $\text{EP}_1$  resultiert in einer Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Irie, Segi, Sugimoto, Ichikawa, & Negishi, 1994).  $\text{EP}_3$  führt durch den gekoppelten  $\text{G}_i$ -Proteinrezeptor zu einer Hemmung der Adenylatzyklase (AC) und bewirkt einen Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Irie et al., 1994). Infolge der Hemmung der AC sinkt die intrazelluläre Konzentration ihres Substrates cAMP (zyklisches Adenosin-3',5'-Monophosphat). Somit verstärkt  $\text{PGE}_2$  über den  $\text{EP}_3$ -Rezeptor die Aggregation von Thrombozyten (Fabre et al., 2001). Der primäre Stimulus für eine Erhöhung des cAMP-Niveaus in Thrombozyten ist voraussichtlich die Aktivierung des Prostazyklin-Rezeptors (IP), was zu einer protektiven Inhibierung der Thrombozytenaggregation führt (Fabre et al., 2001).  $\text{PGE}_2$  wird vermehrt in chronisch entzündeten Gefäßen ausgeschüttet, weswegen die anschließende  $\text{EP}_3$ -Rezeptor-Aktivierung zu Thrombosen bei Vaskulitiden und Atherosklerose führen kann (Fabre et al., 2001).

### 1.5.3 cAMP-abhängige Phosphorylierung von VASP

Der Signalweg des intrazellulären *second messenger* zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) inhibiert die Thrombozytenaktivierung, -adhäsion, -aggregation und die Freisetzung von Granula (Smolenski, 2012). PKA besteht aus zwei katalytischen und zwei regulatorischen Untereinheiten (Smolenski, 2012). cAMP bindet an die regulatorische Untereinheit der PKA woraufhin die katalytische Untereinheit vom Komplex dissoziiert und ihre Substrate phosphoryliert, was zu einer Suppression der Thrombozytenaktivierung führt (Gambaryan et al., 2010; Smolenski, 2012). Ein wichtiges Substrat der PKA und PKG ist dabei das VASP, welches von der PKA an Ser<sub>157</sub> phosphoryliert wird (Butt et al., 1994; Gambaryan et al., 2010). Dies führt zu einer Inhibierung der Fibrinogenbindung am Glykoprotein-Rezeptor IIb/IIIa der Thrombozyten und somit zu einer verminderten Aggregation der Thrombozyten (Horstrup et al., 1994).



## 1.6 Fragestellung

Basierend auf den bereits in Vorarbeiten gewonnenen Erkenntnissen über die funktionellen Mechanismen der häufigen Variante rs7692387 des *GUCY1A1*-Gens im Zusammenhang der KHK und des Myokardinfarkts war es das Ziel dieser Arbeit, einen möglichen Therapieansatz mit ASS zu erproben und mittels Genotypisierung die Proben den verschiedenen Genotypen zugeordnet werden. Die Genotyp-abhängigen Unterschiede auf die Stickstoff-vermittelte Thrombozytenaggregationshemmung sowie der Einfluss von ASS auf ebendiese Hemmung funktioneller Effekte sollten in der mit Arachidonsäure induzierten Lichttransmissionsaggregation dargestellt werden. Durch das Untersuchen der aggregierten Thrombozytenisolate auf die Phosphorylierung des Protein VASP sollte die Beteiligung des NO-cGMP-Signalwegs und des PGE<sub>2</sub>/cAMP-Signalwegs dargestellt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte der Einfluss der Stimulation mit NO auf die Zytokinausschüttung der Thrombozyten im Überstand der Thrombozytenaggregate analysiert werden. Hierbei sollte der Fokus erneut auf die Genotyp-spezifischen Unterschiede in der Freisetzung der Mediatoren gelegt werden.

Zusammenfassend war es das Ziel im Rahmen dieser Arbeit einen möglichen Genotyp-spezifischen Therapieansatz für die Prävention der KHK und des Myokardinfarkts in der Gesellschaft zu untersuchen.

## II. Materialien

### 2.1 Chemikalien

**Tabelle 5:** Verwendete Chemikalien

| Hersteller                   | Chemikalie  | Artikelnummer   | Hauptsitz               |  |                |
|------------------------------|---|---|-------------------------|--|----------------|
| AppliChem                    | Magermilchpulver <i>BioChemica</i>                          | A0830   | Darmstadt, Deutschland  |  |                |
|                              | Methanol (meOH)   | 131091  |                         |  |                |
|                              | Tween® 20 <i>BioChemica</i>                                 | A1389   |                         |  |                |
| Bio Rad                      | 2X Laemmli  | 1610737   | Hercules, USA           |  |                |
|                              | 10X TRIS/glycine/SDS  | 161-0772  |                         |  |                |
| B. Braun                     | Aqua ad iniectabilia  | 01957094  | Melsungen, Deutschland  |  |                |
| Carl Roth                    | 2-propanol ROTI-PURAN®<br>≥99,8 %                           | 6752  | Karlsruhe, Deutschland  |  |                |
|                              | ethanol denaturated ≥96 %                                   | T171  |                         |  |                |
|                              | glycine PUFFERAN® ≥99 %                                     | 3908  |                         |  |                |
|                              | hydrochloric acid (HCl), 6 mol/l<br>– 6 N                   | 281   |                         |  |                |
|                              | Rotiphorese Gel 30, acrylamide<br>30 %, bisacrylamide 0,8 % | 3029.1  |                         |  |                |
|                              | sodium dodecyl sulphate (SDS)                               | 0183.3  |                         |  |                |
|                              | TRIS hydrochloride (TRIS-HCl)<br>PUFFERAN® ≥ 99 %           | 9090  |                         |  |                |
|                              | TRIS PUFFERAN® ≥ 99,9 %                                     | 4855  |                         |  |                |
|                              | Merck Millipore   | H <sub>2</sub> O dest. aus Milli-Q®<br>Reference Anlage |                         |  | Billerica, USA |
|                              |   |   |                         |  |                |
| möLab GmbH                   | Adenosin-5-diphosphat (ADP),<br>2 x 10 <sup>-6</sup> M      | 0203011   | Langenfeld, Deutschland |  |                |
|                              | Arachidonic Acid  | 0203018   |                         |  |                |
| New England<br>Biolabs       | 10X RIPA  | 9806  | Ipswich, USA            |  |                |
|                              | Quick-Load® 2-Log DNA ladder<br>(0.1-10.0 kb)               | N04695  |                         |  |                |
| Sigma-Aldrich                | ammonium persulfate (APS)                                   | A3678   | St. Louis, USA          |  |                |
|                              | Dimethylsulfoxid (DMSO),<br>Molecular biology upgrade       | D8418   |                         |  |                |
|                              | Sodium nitroferri-cyanide(III)<br>dehydrate                 | 431451  |                         |  |                |
|                              | β-Mercaptoethanol   | M3148   |                         |  |                |
| Thermo Fisher<br>Scientific™ | Acetylsalicylsäure, 99 %,<br>Thermo Scientific™             | 158185000   | Waltham, USA            |  |                |

|   |          |
|---|----------|
| Gibco™ PBS (10X), pH 7,4                                  | 70011044 |
| Invitrogen™ UltraPure™ DNase/RNase-free distilled Water   | 10977035 |
| Invitrogen™ UltraPure™ TRIS-borate-EDTA (TBE) buffer, 10X | 15581028 |
| Novex™ MagicMark™ XP Western protein standard             | LC5602   |
| N,N,N',N'-tetramethylethyldiamine (TEMED)                 | 17919    |
| SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate    | 34577    |
| Thermo Scientific™ BupH™ phosphate buffered saline packs  | 28372    |

## 2.2 Puffer und Lösungen

### *Puffer und Lösungen für den Western Blot*

#### 1X phosphate buffer saline (PBS)

Endkonzentration von 1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,16 M NaCl, 2,97 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,

pH 7,4 bei Raumtemperatur

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

ad 1000 ml Millipore® Wasser

Lagerung bei Raumtemperatur

#### 1X PBS-T

Endkonzentration von 1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,16 M NaCl, 2,97 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,

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

Lagerung bei Raumtemperatur

0,5 M Tris-HCL, pH 6,8

27,23 g TRIS-HCl PUFFERAN® (Carl Roth)

ad 80 ml Millipore® Wasser

pH Einstellung mit 6 N HCl (Carl Roth)

danach Auffüllung bis 150 ml mit Millipore® Wasser

Lagerung bei 5 °C

1,5 M Tris-HCL

6 g TRIS-HCl Pufferan® (Carl Roth)

ad 60 ml Millipore® Wasser

pH Einstellung mit 6 N HCl (Carl Roth)

danach Auffüllung bis 150 ml mit Millipore® Wasser

Lagerung bei 5 °C

10 % w/v ammonium persulfate (APS)

1 g APS (Carl Roth)

ad 10 ml Millipore® Wasser

Lagerung bei -20 °C

10 % w/v SDS

10 g SDS (Carl Roth)

ad 100 ml Millipore® Wasser

Lagerung bei Raumtemperatur

1X radioimmunoprecipitation assay (RIPA) Puffer

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  $\beta$ -Mercaptoethanol

50  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich)

950  $\mu$ l 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)

200 ml 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 (s.o.)

Lagerung bei 4 °C für maximal 2 d

2,5 % w/v Milch in PBS-T

2,5 g Magermilchpulver (AppliChem)

ad 100 ml 1X PBS-T (s.o.)

Lagerung bei 4 °C für maximal 2 d

## 2.3 Antikörper

### Primärantikörper

**Tabelle 6:** Verwendete Primärantikörper im Western Blot

| Hersteller                | Isotyp                    | Name  | Artikelnummer | Hauptsitz    |
|---------------------------|---------------------------|---|---------------|--------------|
| Cell Signaling Technology | Monoklonaler Kaninchen Ak | GAPDH (D12H11) XP® Rabbit mAb               | 5174          | Danvers, USA |
|                           | Polyklonaler Kaninchen AK | Phospho-VASP (Ser <sub>157</sub> ) Antibody | 3114          |              |
|                           |                           | Phospho-VASP (Ser <sub>239</sub> ) Antibody | 3111          |              |

### Sekundärantikörper

**Tabelle 7:** Verwendeter Sekundärantikörper im Westernblot (HRP-konjugiert)

| Hersteller                | Isotyp                             | Name                                 | Artikelnummer | Hauptsitz    |
|---------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|---------------|--------------|
| Cell Signaling Technology | Anti-Kaninchen IgG, HRP-konjugiert | Anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody | 7074          | Danvers, USA |

## 2.4 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 8:** Verwendete Verbrauchsmaterialien

| Hersteller      | Material                                   | Artikelnummer | Hauptsitz               |
|-----------------|--|---------------|-------------------------|
| Merck Millipore | Immobilon®-P PVDF Membran, 0,45 µm         | IPVH00010     | Billerica, USA          |
| möLab GmbH      | Plastikröhrchen für Patientenplasma        | 0303020       | Langenfeld, Deutschland |
|                 | Rührstäbe, mikro                           | 0403013       |                         |
|                 | Spezial-Pipettenspitzen, extra lang        |               |                         |
| Sarstedt        | Testtuben, mikro                           |               | Nümbrecht, Deutschland  |
|                 | S-Monovette® 2,7 ml K3E, K3 EDTA           | 04.1917       |                         |
|                 | S-Monovette® 5 ml 9NC, Citrat 3,2 % (1:10) | 05.1071       |                         |
|                 | S-Monovette® 7,5 ml LH, Lithium-Heparin    | 01.1604       |                         |

|                          |   |             |              |
|--------------------------|---|-------------|--------------|
| Thermo Fisher Scientific | S-Monovette® 9 ml K3E, K3 EDTA  | 02.1066.001 | Waltham, USA |
|                          | Applied Biosystems™ MicroAmp® fast optical 96 well reaction plate, 0,1 ml | 4346907     |              |
|                          | Applied Biosystems™ MicroAmp® optical adhesive film                       | 4311971     |              |
|                          | PVDF-Transfermembran, 0,45 µm, 26,5 cm x 3,75 m                           | 88518       |              |

## 2.5 Assays und Kits

### Verwendete Kits

**Tabelle 9:** Verwendete Kits

| Hersteller  | Kit                      | Artikelnummer | Hauptsitz        |
|-------------|--------------------------|---------------|------------------|
| R&D Systems | Human Cytokine Array Kit | ARY005        | Minneapolis, USA |

### Verwendete Assays

**Tabelle 10:** Verwendete Assays

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

## 2.6 Geräte

**Tabelle 11:** Verwendete Geräte

| Hersteller     | Gerät           | Bezeichnung          | Hauptsitz             |
|----------------|-----------------|----------------------|-----------------------|
| A. Hartenstein | Mikrozentrifuge | Mikrozentrifuge ZM16 | Würzburg, Deutschland |

|                             |                            |  |                       |
|-----------------------------|----------------------------|--|-----------------------|
| Bio/Data Corporation        | Thrombozyten-Aggregometer  | PAP-8E   | Horsham, USA          |
| ELMI SIA                    | Shaker                     | Shaker S4  | Riga, Lettland        |
| Eppendorf                   | Thermomixer                | Thermomixer comfort, 1,5ml                       | Hamburg, Deutschland  |
|                             | Zentrifuge                 | Centrifuge 5425<br>Centrifuge 5430               |                       |
| GE Healthcare Life Sciences | Biomolekularer Bildwandler | ImageQuant™ LAS 4000                             | Chicago, USA          |
| Hecht Assistent             | Rollenmischer              | Rollenmischer RM5                                | Sondheim, Deutschland |
| Marshall Scientific         | Feinwaage                  | Mettler AE 260 Deltarange                        | Hampton, USA          |
| Tecan Group                 | Microplate reader          | Infinite® M200 PRO                               | Männedorf, Schweiz    |
| Thermo Fisher Scientific    | Megafuge                   | Heraeus Megafuge 1.0 R                           | Waltham, USA          |
|                             |                            | Heraeus Megafuge 2.0 R                           |                       |
|                             | Real-Time PCR System       | Applied Biosystems™ ViiA™ 7 Real-Time PCR System |                       |
|                             | Zentrifuge                 | Heraeus Biofuge fresco                           |                       |

## 2.7 Software

**Tabelle 12:** Verwendete Software

| Hersteller                  | Software                  | Anwendung                                  | Hauptsitz          |
|-----------------------------|---------------------------|--|--------------------|
| Bio/Data Corporation        | PAP-8E Software           | Dokumentation der Thrombozyten-Aggregation | Horsham, USA       |
| GE Healthcare Life Sciences | ImageQuant™ TL            | Western blot quantification                | Chicago, USA       |
| Tecan Group                 | iControl                  | Messung DNA-Konzentration                  | Männedorf, Schweiz |
| Thermo Fisher Scientific    | TaqMan Genotyper Software | Analyse der Genotypisierung                | Waltham, USA       |
|                             | ViiA™ 7 software          | Messung Genotypisierung                    |                    |



## 2.8 Studienpopulation

In diese Studie wurden am Deutschen Herzzentrum München behandelte Patienten eingeschlossen. Die Probanden wurden für die Teilnahme an dieser Studie vor der Entnahme der Proben aufgeklärt und ihr schriftliches Einverständnis dokumentiert. Das Protokoll wurde von der Ethikkommission der Technischen Universität München genehmigt (387/17S). Die Rekrutierung der Testpersonen erfolgte im Rahmen der elektiven Krankenhausaufnahme im Deutschen Herzzentrum München.

## III. Methoden

### 3.1 Aufklärung, Anamnese und körperliche Untersuchung der Probanden

Zu Beginn wurden die Probanden über das Projekt aufgeklärt. Nach einem ausführlichen Gespräch und dem Beantworten sämtlicher Rückfragen wurde das schriftliche Einverständnis eingeholt. Daraufhin wurde jeder Patient im Rahmen der stationären Aufnahme ausführlich anamnestiziert und körperlich untersucht. Hierbei wurde besonders auf die aktuelle Medikation, kardiologische Vorerkrankungen sowie mögliche Koronarinterventionen in der Vorgeschichte eingegangen. Die Daten wurden im Anschluss anonymisiert, wobei den Proben für dieses Projekt folgende Parameter zugeordnet worden sind:

- Geschlecht: männlich, weiblich
- aktuelle Medikation: ASS, P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor-Antagonist, orale Antikoagulation, nichtsteroidales Antirheumatikum
- bestehende (Vor-) Erkrankungen: koronare Herzkrankheit, arterielle Verschlusskrankheit, vergangener Myokardinfarkt
- kardiale Eingriffe in der Vorgeschichte: perkutane koronare Intervention, Koronararterienbypass
- Symptomatik bei Aufnahme: akuter Myokardinfarkt, instabile Angina pectoris, stabile Angina pectoris
- körperliche Untersuchung: Blutdruck [mmHg] (systolisch und diastolisch)
- Laborwerte: Troponin T [ $\mu\text{g/l}$ ], Kreatinin [mg/dl], LDL-Cholesterin [mg/dl], Hämoglobin [g/dl], Thrombozyten [ $\times 1000/\mu\text{l}$ ]

### 3.2 Probenentnahme und -prozessierung

Nach der vollständigen Anamnese und Einverständniserklärung der Probanden wurde ihnen Blut abgenommen, wobei bei der peripheren Venenpunktion darauf geachtet wurde, die Scherkräfte in der Nadel durch eine langsame Aspiration möglichst gering zu halten. Auch der Transport der Proben ins Labor wurde zeitnah, möglichst erschütterungsarm und unter Raumtemperatur durchgeführt. Auf diese Weise wurde eine vorzeitige Aggregation der Thrombozyten verhindert. Des Weiteren wurde darauf geachtet, dass die Probengewinnung vor einer möglichen Akutmedikation mit z.B. ASS oder einem P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor-Antagonisten erfolgt ist, um mögliche Verfälschungen der späteren Messergebnisse zu verhindern.

Folgende Probenbehältnisse wurden bei der Blutentnahme befüllt:

- Für die Bestimmungen des Routinelabors (inklusive Blutbild, Retentionsparameter, Blutfette und Troponin T) im Rahmen der stationären Aufnahme: eine 2,7 ml EDTA-, eine 7,5 ml Heparin-, eine 5 ml Citrat-Monovette®
- Zur Isolierung genomischer DNA: eine 2,7 ml EDTA-Monovette®
- Zur Gewinnung von plättchenreichen (PRP) und plättchenarmen (PPP) Plasma: vier 5 ml Citrat-Monovetten®

Die vier Probenbehälter für das Routinelabor und die hausinterne Blut-Datenbank wurden direkt nach der Abnahme an die zuständigen Stellen der Klinik für die weitere Diagnostik übergeben. Die 2,7 ml EDTA-Monovette® wurde bis zur DNA-Isolierung bei 5 °C gelagert. Die vier 5 ml Citrat Monovetten® wurden maximal 1,5 h bei Raumtemperatur gelagert, ehe mit der Generierung von plättchenreichem (PRP) und plättchenarmen Plasma (PPP) begonnen wurde.

### 3.3 Licht-Transmissions-Aggregometrie

#### 3.3.1 Herstellen der Reagenzien

In dieser Arbeit wurde die Thrombozytenaggregation mittels Arachidonsäure (AA) induziert. Zur Hemmung der Aggregation wurde als NO-Donor Nitroprussid-Natrium eingesetzt, dies erfolgte sowohl allein als auch in Kombination mit ASS. Für spätere Analysen wurde zudem eine Probe ohne Hemmung der Aggregation mitgeführt. Diese diente als Grundlage für die Bestimmung der *Baseline*-Werte. Die nicht wasserlöslichen Chemikalien wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Dieses besitzt ebenfalls proaggregatives Potential, was in den Konzentrationen der verschiedenen Reagenzien, d.h. auch in den Kontrollen, berücksichtigt wurde (s.u.).

#### *H<sub>2</sub>O-Kontrolllösung*

Für das benötigte H<sub>2</sub>O wurde Aqua ad iniectionem verwendet.

#### *DMSO-Grundlösung*

Für die DMSO-Grundlösung wurde DMSO im Verhältnis 1:100 mit H<sub>2</sub>O verdünnt.

#### *DMSO-Kontrolllösung*

Die 1:100 DMSO-Grundlösung wurde im Verhältnis 1:20 mit H<sub>2</sub>O gemischt. So entstand die Kontrolllösung mit dem Verhältnis 1:2000, welche in der Aggregometrie verwendet wurde.

#### *Arachidonsäure*

Zur Herstellung von Arachidonsäure wurden 5 mg/ml Natriumarachidonat-Lysat (möLab) auf Raumtemperatur erwärmt und anschließend in 1 ml Aqua dest. (pH 6,8-7,2) gelöst. Die Endkonzentration betrug 16,42 mM.

#### *Nitroprussid-Natrium-Grundlösung*

Es wurden 30 mg Nitroprussid-Natrium mit der Feinwaage abgewogen und vollständig in 500 µl DMSO gelöst. Die daraus entstandene Ausgangslösung hatte eine Konzentration von 200

mM. Anschließend wurde sie mit H<sub>2</sub>O auf die Endkonzentration von 200 µM NO bei einer DMSO-Konzentration von 1:1000 verdünnt.

#### *Nitroprussid-Natrium-Arbeitslösung*

Im anschließenden Arbeitsschritt wurde die Nitroprussid-Natrium-Grundlösung im Verhältnis 1:2 mit H<sub>2</sub>O gemischt. Auf diese Weise erhielt man die für den Versuch benötigte Nitroprussid-Natrium-Konzentration von 100 µM, bei einer DMSO-Konzentration von 1:2000.

#### *Acetylsalicylsäure*

180 mg ASS wurde in 1 ml Aqua dest. gelöst. Dies entsprach 1 M. Anschließend wurde es im Verhältnis 1:100 mit Aqua dest. auf die gewünschte Endkonzentration von 10 mM verdünnt.

### 3.3.2 Herstellung von plättchenarmen (PPP) und plättchenreichem Plasma (PRP)

Zu Beginn wurde die Thrombozytenzahl des Probanden im Vollblut der EDTA-Monovette gemessen. Dies wurde vom Routinelabor der Klinik durchgeführt. Hierbei war die Thrombozytenzahl aller Probanden im Normbereich zwischen 150.000 und 450.000 /µl. Nach der Präparation des plättchenreichen Plasmas wurde der Thrombozytenwert erneut durch das Routinelabor bestimmt.

Die Herstellung des plättchenreichen und plättchenarmen Plasmas erfolgte über verschiedene Zentrifugationsschritte. Hierbei wurde berücksichtigt, dass die Thrombozyten empfindlich auf Umstände wie Scherkräfte, Erschütterungen oder Temperaturunterschiede reagieren. Um eine vorzeitige Aggregation, die bereits mit Aktivierungsvorgängen bei der Blutentnahme begonnen hat, zu verhindern, wurden die vier Citrat-Monovetten® 20 min bei Raumtemperatur senkrecht stehen gelassen. Mit der Herstellung von PRP wurde innerhalb von 1,5 h begonnen.

Die Fertigstellung des PRP begann mit dem ersten Zentrifugationsschritt der Citrat-Monovetten® bei 800 rpm und Raumtemperatur für 10 min ohne Bremse (Megafuge 1.0 R). Dieser Schritt diente der Auftrennung der Thrombozyten, welche im Plasma verblieben, von den restlichen korpuskularen Blutbestandteilen (Erythrozyten, Retikulozyten und Leukozyten), die bei der Zentrifugation absanken. Nun wurde das PRP mit einer Plastikpasteurpipette vorsichtig und unter erneuter Minimierung möglicher Scherkräfte entnommen und in einem Kunststoffröhrchen gesammelt.

Im zweiten Zentrifugationsschritt wurden die Citrat-Monovetten® erneut 10 min, diesmal bei 3000 rpm und mit Bremse zentrifugiert. Nach diesem Schritt sanken auch die verbliebenen Thrombozyten ab, weshalb sich kaum noch zelluläre Bestandteile im Plasma befanden. Dieses PPP wurde ebenfalls mit einer Plastikpasteurpipette in einem Kunststoffröhrchen gesammelt.

### 3.3.3 Vorbereiten der Messung

Zur Vorbereitung der Thrombozytenaggregation wurden speziellen Test-Küvetten (möLab) mit entsprechenden Magnetrührstäben (möLab) präpariert. Auf diese Weise wurde die gleichmäßige Durchmischung von Reagenzien und Thrombozyten sowie der ausreichende Kontakt der Thrombozyten untereinander im folgenden Versuch gewährleistet.

Im Anschluss daran wurden pro Probe je 4 Magnetbestückte Küvetten mit 198 µl PRP befüllt. Dies erfolgte sehr langsam mit langen Pipettenspitzen und unter erneuter Vermeidung von Scherkräften oder Luftbläschen. Eine fünfte Küvette (ohne Magnetrührer) wurde zur folgenden Leerwertbestimmung mit 250 µl PPP befüllt.

**Tabelle 13:** Vorbereiten der Küvetten mit PRP und PPP (pro Probe)

| Küvette 1      | Küvette 2      | Küvette 3      | Küvette 4      | Leerprobe    |
|----------------|----------------|----------------|----------------|--------------|
| + Magnetrührer | + Magnetrührer | + Magnetrührer | + Magnetrührer |              |
| + 198 µl PRP   | + 198 µl PRP   | + 198 µl PRP   | + 198 µl PRP   | + 250 µl PPP |

### 3.3.4 Durchführen der Messung

Die nun folgende Aggregometrie wurde an einem PAP-8E Lichttransmissions-Aggregometer durchgeführt.

Zunächst wurden die Küvetten mit dem PRP in die Inkubationsplätze gestellt und auf 37 °C erwärmt, um die Versuchsbedingungen den physiologischen Umständen im menschlichen Körper anzugleichen. Mit den Leerproben mit PPP wurde in jedem Messplatz der Leerwert bestimmt. Als ersten Schritt wurden nun in die inkubierenden Proben je 2 µl ASS beziehungsweise 2 µl H<sub>2</sub>O pipettiert. Dann wurde das PRP mit den Reagenzien für 5 min rührend inkubiert.

**Tabelle 14:** Schritt 1 - Inkubation mit ASS bzw. H<sub>2</sub>O für 5 min

| Küvette 1               | Küvette 2      | Küvette 3               | Küvette 4      |
|-------------------------|----------------|-------------------------|----------------|
| + Magnetrührer          | + Magnetrührer | + Magnetrührer          | + Magnetrührer |
| + 198 µl PRP            | + 198 µl PRP   | + 198 µl PRP            | + 198 µl PRP   |
| + 2 µl H <sub>2</sub> O | + 2 µl ASS     | + 2 µl H <sub>2</sub> O | + 2 µl ASS     |

Im Anschluss daran wurde in die Küvetten je 25 µl DMSO-H<sub>2</sub>O bzw. NO pipettiert und für weitere 2 min rührend inkubiert.

**Tabelle 15:** Schritt 2 - Inkubation mit DMSO-H<sub>2</sub>O bzw. NO für 2 min

| Küvette 1                     | Küvette 2                     | Küvette 3               | Küvette 4      |
|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------|----------------|
| + Magnetrührer                | + Magnetrührer                | + Magnetrührer          | + Magnetrührer |
| + 198 µl PRP                  | + 198 µl PRP                  | + 198 µl PRP            | + 198 µl PRP   |
| + 2 µl H <sub>2</sub> O       | + 2 µl ASS                    | + 2 µl H <sub>2</sub> O | + 2 µl ASS     |
| + 25 µl DMSO-H <sub>2</sub> O | + 25 µl DMSO-H <sub>2</sub> O | + 25 µl NO              | + 25 µl NO     |

Nach Ablauf der 2 min wurden die Proben-Küvetten in die Testplätze gestellt und die Messung wurde umgehend gestartet. Nach 10 s wurde die Thrombozytenaggregation mit der Zugabe von 25 µl Arachidonsäure ausgelöst, was wiederum am Gerät bestätigt wurde. Jetzt wurde die Aggregation der unterschiedlichen Proben für 6 min vom PAP-8E Lichttransmissions-Aggregometer gemessen und aufgezeichnet.

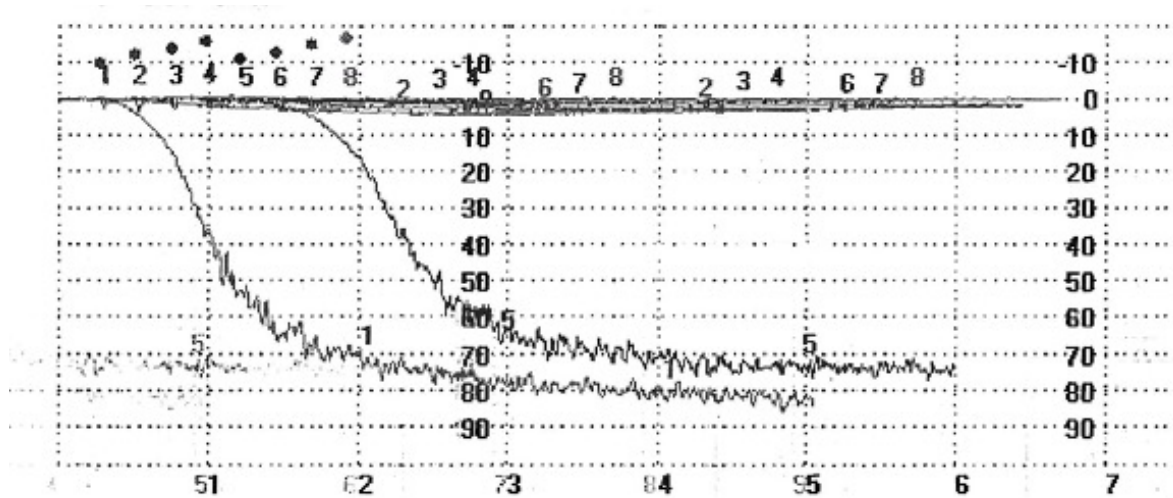
**Tabelle 16:** Schritt 3 - Auslösen der Aggregation mit Arachidonsäure (AA)

| Küvette 1                     | Küvette 2                     | Küvette 3               | Küvette 4      |
|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------|----------------|
| + Magnetrührer                | + Magnetrührer                | + Magnetrührer          | + Magnetrührer |
| + 198 µl PRP                  | + 198 µl PRP                  | + 198 µl PRP            | + 198 µl PRP   |
| + 2 µl H <sub>2</sub> O       | + 2 µl ASS                    | + 2 µl H <sub>2</sub> O | + 2 µl ASS     |
| + 25 µl DMSO-H <sub>2</sub> O | + 25 µl DMSO-H <sub>2</sub> O | + 25 µl NO              | + 25 µl NO     |
| + 25 µl AA                    | + 25 µl AA                    | + 25 µl AA              | + 25 µl AA     |

Im Anschluss daran wurden die Proben für die nachfolgenden Westernblot-Versuche vorbereitet und eingefroren (siehe 3.6.1).

### 3.3.5 Auswertung

Nach der Thrombozytenaggregometrie der Proben zeigte das PAP-8E Lichttransmissions-Aggregometer die über ca. 6 min gemessenen Graphen an. Dabei waren, wie in der unten gezeigten Abbildung, je 4 Graphen von 2 verschiedenen Probanden zu sehen. Die Ordinate zeigte hierbei den Grad der Lichttransmission in jeder Probe im Verhältnis zu der verstrichenen Zeit auf der Abszisse an. Alle Messungen wurden immer auf den zugehörigen Leerwert bezogen, bei dem die Lichtdurchlässigkeit als 100 % und die Plättchenaggregation gleichzeitig als 0 % definiert waren. Die verschiedenen Messwerte wurden vom Lichttransmissions-Aggregometer nach Abschließen der Messungen tabellarisch ausgegeben. Für dieses Projekt wurden die Werte der Fläche unter der Kurve (AUC) sowie die finale Aggregation (FA) und die maximale Aggregation (MA) genutzt.



**Abbildung 8:** Abbildung der Lichttransmissions-Aggregometrie.

Zu sehen sind 8 Aggregations-Kurven, je 4 pro Proband. 1 und 5: H<sub>2</sub>O + DMSO, 2 und 6: ASS + DMSO, 3 und 7: H<sub>2</sub>O + NO, 4 und 8: ASS + NO. Auf der Abszisse ist die gemessene Zeit in Minuten angegeben. Die Fläche unter (AU) der Aggregationskurve wurde in der Einheit AU·min extrahiert. Die Punkte über den Zahlen zeigen die Zugabe der Arachidonsäure und den zeitgleichen Start der Messung an.



| <u>Ch</u> | <u>Sample ID</u>                 | <u>PA</u> | <u>PS</u> | <u>SA</u> | <u>SS</u> | <u>AUC*</u> | <u>LP</u> | <u>DA</u> | <u>MA</u> | <u>FA</u> |
|-----------|----------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1         | <b>H2O</b> 01/2018<br>Temp:37,0C | 82        | 42        | 0         | 0         | 308         | 0         | 0         | 82        | 81        |
| 2         | <b>ASS</b> 01/2018<br>Temp:37,0C | 4         | 0         | 0         | 0         | 15          | 65        | 4         | 4         | 0         |
| 3         | <b>NO</b> /01/2018<br>Temp:37,0C | 2         | 0         | 0         | 0         | 5           | 0         | 0         | 2         | 0         |
| 4         | <b>ASS-NO</b> 2018<br>Temp:37,0C | 1         | 0         | 0         | 0         | 2           | 0         | 0         | 1         | 0         |
| 5         | <b>H2O</b> 01/2018<br>Temp:37,0C | 74        | 35        | 0         | 0         | 262         | 20        | 0         | 74        | 72        |
| 6         | <b>ASS</b> 01/2018<br>Temp:37,0C | 3         | 0         | 0         | 0         | 12          | 105       | 3         | 3         | 0         |
| 7         | <b>NO</b> /01/2018<br>Temp:37,0C | 3         | 0         | 0         | 0         | 9           | 0         | 0         | 3         | 0         |
| 8         | <b>ASS-NO</b> 2018<br>Temp:37,0C | 1         | 0         | 0         | 0         | 2           | 0         | 0         | 1         | 0         |

**Abbildung 9:** Quantifizierung der Aggregometrie.

*Links* ist die Nummerierung der Proben zu sehen (je 4 Proben pro Proband). Die Bezeichnungen entsprechen: **H<sub>2</sub>O**: H<sub>2</sub>O + DMSO, **ASS**: ASS + DMSO, **NO**: H<sub>2</sub>O + NO, **ASS-NO**: ASS + NO. *Rechts* findet sich die Quantifizierung der Aggregation. Die gesteigerte Aggregation der Thrombozyten erhöhte die Lichttransmission und somit den gemessenen Wert (AU x Minute). In dieser Arbeit wurde der Fokus auf den Bereich unter der Kurve (AUC), die maximale Aggregation (MA) sowie die finale Aggregation (FA) gelegt.

## 3.4 Nukleinsäureextraktion

### 3.4.1 DNA-Extraktion

Zur Extraktion der DNA wurde das *Genetric DNA from Blood* Kit verwendet (Marcherey-Nagel) und zur Optimierung von Ausbeute und Reinheit der DNA an die Laborbedingungen angepasst.

#### *Zell-Lyse*

Im ersten Schritt wurden 7 ml *RBC Lysis Solution* in ein Zentrifugenröhrchen vorgelegt, zu dem 2.7 ml EDTA-Blut des jeweiligen Probanden hinzugegeben wurden. In der darauffolgenden Inkubation für 20 min wurde das Röhrchen mehrfach geschwenkt. Daraufhin wurde es für 10 min bei 3100 rpm zentrifugiert (Megafuge 2.0 R). Der hierbei entstandene Überstand wurde verworfen und das durch die Zentrifugation entstandene Zellpellet wurde in der verbliebenen Zellflüssigkeit mittels eines Schüttlers resuspendiert. Dies wurde anschließend durch das Hinzugeben von 3 ml *Cell Lysis Solution* und weiteres Schütteln vervollständigt.

#### *Protein-Präzipitation*

Als zweiten Schritt wurde 1 ml *Protein Precipitation Solution* zum resuspendierten Zelllysate gegeben, welches einige Minuten geschwenkt wurde. Danach wurde es erneut für 10 min bei 3100 rpm (Megafuge 2.0 R) zentrifugiert.

#### *DNA-Präzipitation*

Im dritten Schritt wurden 3 ml Isopropanol in einem frischen Zentrifugenröhrchen vorgelegt und daraufhin der Überstand der Protein-Präzipitation aus dem vorherigen Schritt hinzugegeben. Nun wurde das Röhrchen etwas geschwenkt, woraufhin die DNA als fädiges Geflecht erkennbar war. Im Anschluss daran wurde die Probe ein drittes Mal für 10 min bei 3100 rpm (Megafuge 2.0 R) zentrifugiert und der Überstand danach verworfen.

#### *Waschen des DNA-Pellets*

Für den vierten Schritt wurde 1 ml Ethanol (70 %) zu dem verbliebenen DNA-Pellet hinzugegeben, woraufhin dieses mehrfach auf- und abpipettiert und am Ende in ein 1,5 ml

Eppendorf-Gefäß überführt wurde. Anschließend wurde es erneut für 10 min zentrifugiert, diesmal bei 8500 rpm (Biofuge fresco Tischzentrifuge). Danach wurde der Überstand über dem Pellet abpipettiert und Letzteres mit offenem Deckel ca. 10 min getrocknet.

#### *DNA-Hydratation*

Im fünften Schritt wurden 300 µl *Hydration Solution* zum getrockneten Pellet gegeben. Anschließend wurde die Probe für 1 h bei 65 °C inkubiert (Thermomixer comfort). Um die DNA-Ausbeute zu maximieren, wurde die Lösung abschließend für ca. drei bis fünf Tage bei Raumtemperatur inkubiert.

#### *DNA-Lagerung*

Die isolierte DNA wurde anschließend bei -20 °C gelagert.

### 3.4.2 Bestimmung der Konzentration

Für die Bestimmung der Konzentration der aufbereiteten DNA wurde der Tecan Infinite® F200 PRO genutzt, wobei die Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm in einem Spektralphotometer durchgeführt wurde.

### 3.4.3 Verdünnung von Nukleinsäuren

Für die Genotypisierung der DNA wurde eine Konzentration von 10 ng/µl benötigt. Die Verdünnung wurde entsprechend der Messwerte des Spektralphotometers mit destilliertem Wasser (Aqua dest.) durchgeführt.

### 3.5 Genotypisierung

Die Genotypisierung der DNA-Proben erfolgte mittels der *Fast*-Methode des ViiA™ 7 Real-Time PCR Systems. Die Proben wurden mit folgenden Reagenzien in je ein *Well* einer 96-*Well*-Platte pipettiert:

**Tabelle 17:** Reagenzien zur Genotypisierung

| <b>Reagenzien</b>                        | <b>Volumen</b> |
|--|----------------|
| TaqMan Universal Master Mix II, no UNG   | 5 µl           |
| TaqMan SNP assay 20X (for SNP rs7692387) | 0,5 µl         |
| DNase/RNase-freies H <sub>2</sub> O      | 3,5 µl         |
| DNA-Probe (c = 10 ng/µl)                 | 1 µl           |
| <b>Gesamt</b>                            | <b>10 µl</b>   |

Der weitere Versuchsablauf am Gerät wurde entsprechend der Herstellerempfehlungen durchgeführt. Die PCR-Bedingungen finden sich in Tabelle 18. Pro 96-*Well* Platte wurden drei H<sub>2</sub>O-Negativkontrollen mitgeführt.

**Tabelle 18:** PCR-Bedingungen der Genotypisierung

| <b>Schritt</b>                | <b>Temperatur</b> | <b>Dauer</b> |
|-------------------------------|-------------------|--------------|
| <b>Initiale Denaturierung</b> | 95 °C             | 10 min       |
| <b>40 Zyklen</b>              | 95 °C             | 15 s         |
|                               | 60 °C             | 1 min        |
| <b>Post-PCR read</b>          | 60 °C             | 30 s         |

## 3.6 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode, mit der Proteine mithilfe von Antikörper-Protein-Komplexen visualisiert werden können. Hierbei binden spezifische Antikörper an auf einer Membran immobilisierte Proteine, wodurch am Ende Protein-spezifische Banden entstehen.

Im Folgenden wurde die Aktivität der löslichen Guanylatzyklase untersucht. Hierfür wurde die cGMP-abhängige Phosphorylierung des VASP an zwei unterschiedlichen Phosphorylierungsstellen (Serin<sub>239</sub> durch die PKG und Serin<sub>157</sub> durch die PKA) untersucht. Dazu wurden zwei spezifische Antikörper eingesetzt: P-VASP<sub>S239</sub>-AK (ein Antikörper für an Serin<sub>239</sub> phosphoryliertes VASP) sowie P-VASP<sub>S157</sub>-AK (ein Antikörper für an Serin<sub>157</sub> phosphoryliertes VASP). Um die Ergebnisse mit der Protein-Gesamtmenge in den einzelnen Proben ins Verhältnis setzen zu können, wurde zudem ein Antikörper für das Housekeeping-Protein Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) genutzt. Der Westernblot wurde mit aus den aggregierten Thrombozytenisolaten isolierten Proteinen der Lichttransmissions-Aggregometrie durchgeführt.

### 3.6.1 Vorbereitung der Proben

Nach der Thrombozyten-Aggregometrie wurden die aggregierten Proben je in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Dies wurde im Anschluss für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abpipettiert und das Pellet abschließend in 25 µl 2X Laemmli-Puffer und 25 µl 1X RIPA-Puffer gelöst.

#### *Lagerung*

Die Proben wurden im Anschluss daran bei -80 °C gelagert.

#### *Denaturierung*

Vor Beginn des Western Blot wurden die Proben für 5 min bei 95 °C denaturiert und geschüttelt und anschließend auf Eis gelegt.

### 3.6.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Blotting

#### *Polyacrylamid-Gelelektrophorese*

Um die Proteine separieren zu können, wurde eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Für diesen Schritt wurden 5 µl des Proteinmarkers (Pre-stained-Ladder) und 15 µl jeder Probe in die Taschen eines Polyacrylamid-Gel (12 %) aufgetragen, welches in der Western Blot Kammer in 1X *Running Buffer* vorbereitet wurde. Für den Verlauf der Gelelektrophorese im Sammelgel (*Stacking Gel*, 4 %) wurde eine Spannung von 100 V angelegt. Sobald die Proben das Trenngel (*Resolving Gel*, 12 %) erreichten, wurde die Spannung auf 150 V erhöht.

#### *Zusammensetzung der Gele*

**Tabelle 19:** Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele

| <b><i>Stacking Gel 4 %</i></b> |               | <b><i>Resolving Gel 12 %</i></b> |               |
|--------------------------------|---------------|----------------------------------|---------------|
| <b>Reagenz</b>                 | <b>Anteil</b> | <b>Reagenz</b>                   | <b>Anteil</b> |
| 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 %         |

#### *Protein-Transfer auf die Membran*

Nach dem Durchführen der Gelelektrophorese wurde das Protein mithilfe des Elektrotransfer-Prinzips auf eine mit Methanol aktivierte Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) übertragen. Bei diesem so genannten *Blotting* wurde senkrecht zu Membran und Gel für 90 min ein elektrisches Feld mit 100 V angelegt. Gel und Membran befanden sich dabei in der Western Blot Kammer in 1X *Transfer Buffer*.

#### *Blocken der unspezifischen Bindungsstellen*

Da Western Blot-Membranen eine sehr hohe Affinität gegenüber Proteinen besitzen, ist es nach dem Protein-Transfer wichtig, die restliche, noch freie Oberfläche der Membran zu blockieren. So ist eine spätere unspezifische Antikörper-Bindung auf der Membran verhindert

worden. Für diesen Schritt wurde die Membran nach dem *Blotten* für 3 min in 1X PBS und anschließend für 1 h in einer 5 %-igen 1X PBS-Milchpulver-Lösung schüttelnd inkubiert (30 rpm).

#### *Primär- und Sekundärantikörper*

Die Blots wurden anschließend über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper in 2,5 %-iger 1X PBS-T-Milchpulver-Lösung rollend inkubiert. Die verwendeten Antikörper stammten alle vom Kaninchen.

Folgende Antikörperkonzentrationen wurden genutzt:

**Tabelle 20:** Konzentrationen der Primärantikörper

| <b>Antikörpername</b> | <b>Konzentration</b> |
|-----------------------|----------------------|
| P-VASP S157           | 1:10.000             |
| P-VASP S239           | 1:10.000             |
| GAPDH                 | 1:100.000            |

Am Folgetag wurden die Membranen nach fünf Waschschritten mit 1X PBS-T für je 5 min (bei 30 rpm und Raumtemperatur) mit dem Sekundärantikörper in 2,5 %-iger 1X PBS-T-Milchpulver-Lösung (bei 30 rpm auf dem Schüttler und Raumtemperatur) für mindestens 1 h inkubiert. Hierfür wurde der *anti-rabbit* Meerrettichperoxidase-Antikörper (HRP, *horseradish peroxidase-conjugated antibody*) in der Konzentration 1:100.000 verwendet. Danach wurde die Membran erneut fünf Mal je fünf Minuten mit 1X PBS-T gewaschen.

#### *Peroxidase-Reaktion und Detektion der Protein-Banden*

Abschließend wurden die Protein-Banden mit Hilfe der *SuperSignal™ West Pico PLUS Chemilumineszenz Substrate* (Thermo Fisher Scientific) visualisiert, wobei HRP die Oxidation von Luminor in Lumineszenz katalysierte, was wiederum detektiert wurde. Diese Detektion erfolgte mit dem ImageQuant™ LAS 4000-System, wobei die Belichtungszeit an die Intensität der Banden angepasst wurde. Abschließend wurde zur Dokumentation des *Pre-Stained Ladder* ein Digitalbild gemacht.

### 3.6.3 Auswertung

Die Auswertung des Blots erfolgte mit der ImageQuant™ TL Software (GE Healthcare Life Sciences), wobei die unterschiedliche Intensität der P-VASP Banden quantifiziert und mit der jeweiligen Bande des *Housekeeping* Enzyms GAPDH ins Verhältnis gesetzt wurde. Der Hintergrund wurde anschließend mathematisch herausgerechnet. Im Folgenden finden sich beispielhafte Ergebnisse der Western Blot-Banden bei homozygoten und heterozygoten Risikoallelträgern. Für die Probanden gab es je einen Ansatz mit Antikörpern gegen Serin<sub>157</sub> und GAPDH sowie mit Antikörpern gegen Serin<sub>239</sub> und GAPDH. Es wurden Proben ohne Thrombozytenaggregation und mit Arachidonsäure-induzierter Aggregation unter Einsatz von H<sub>2</sub>O, ASS, NO und ASS in Kombination mit NO genutzt. Für die Analyse wurde die Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit dem NO-Donor bzw. nach Stimulation mit ASS und dem NO-Donor auf den Wert unter Kontrollbedingungen normalisiert und innerhalb der Genotypen mittels eines one-sample t-test sowie zwischen den Genotypen mit einem Student's t-test verglichen.



## 3.7 Human Cytokine Array

### 3.7.1 Vorbereitung der Proben

Nach der durchgeführten Lichttransmissions-Aggregometrie wurden die aggregierten Proben je in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Dies wurde im Anschluss für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß abpipettiert. Dieser Überstand wurde bei -80 °C gelagert. Für das Cytokine Array wurden die Proben auf Eis liegend aufgetaut.

### 3.7.2 Vorbereitung der Reagenzien

Zu Beginn wurden alle Reagenzien des Human Cytokine Array Kit (R&D Systems) inklusiver der *Human Cytokine Array Panel A*-Membran auf Raumtemperatur gebracht.

#### *Detection Antibody Cocktail*

Der *Detection Antibody Cocktail* wurde anschließend in 100 µl Aqua dest. vollständig gelöst.

#### *Wash Buffer*

Anschließend wurde der 25X *Wash Buffer* im Verhältnis 1:25 mit Aqua dest. gemischt um 1000 ml 1X *Wash Buffer* zu erhalten.

#### *Chemi Reagent 1 & 2*

Zudem wurden das *Chemi Reagent 1* (Hydrogen-Peroxidase) und das *Chemi Reagent 2* (Luminol) im Verhältnis 1:1 gemischt. Dabei war zu beachten, dass diese Reagenzien nur 15 min haltbar waren und man pro Membran 1 ml benötigte.

### 3.7.3 Durchführung des Arrays

#### *Blocken der Membran*

Zu Beginn wurden 2 ml des *Array Buffer 4* auf die *Human Cytokine Panel*-Membran getropft, welche für eine Stunde in der zugehörigen rechteckigen *4-Well Multi-Dish* auf einem Wippschüttler inkubiert wurde. Dabei wurde beachtet, dass sich die Membran gut bewegen

konnte und komplett mit Puffer 4 benetzt war. Das *Human Cytokine Array Panel A* enthielt insgesamt 36 verschiedene, spezifische Antikörper gegen menschliche Zytokine, welche beim Blocken an ihren spezifischen Plätzen blieben.

#### *Vorbereiten der Proben & Inkubation*

Währenddessen wurden die Proben in einem 2 ml Eppendorf-Gefäß mit den weiteren Reagenzien vorbereitet. Diese wurden anschließend für 1 h bei Raumtemperatur gemischt.

**Tabelle 21:** Proben und Reagenzien des Human Cytokine Array

| <b>Name</b>                 | <b>Menge</b> |
|-----------------------------|--------------|
| Array Buffer 4              | 500 µl       |
| Array Buffer 5              | 900 µl       |
| Detection Antibody Cocktail | 15 µl        |
| Überstand der Aggregometrie | 100 µl       |

Anschließend wurde der Puffer 4 von der Membran abpipettiert und das Gemisch aus Probe und Reagenzien auf die Membran gegeben. Dies wurde über Nacht bei 2-8 °C auf einem Wippschüttler inkubiert.

#### *Antikörper-Inkubation*

Am Folgetag wurde die Membran vorsichtig aus der 4-Kammer-Platte entfernt und mit 20 ml des 1X *Wash Buffer* insgesamt drei Mal für 10 min gewaschen. Zudem wurde die 4-Kammer-Platte mit Aqua dest. gespült und getrocknet. Währenddessen wurde die Streptavidin-HRP mit dem *Array Buffer 5* im Verhältnis 1:2000 verdünnt. Nach dem Waschschrift wurden 2 ml der Reagenzien auf die Membran in der 4-Kammer-Platte gegeben. Daraufhin wurde die Membran für 30 min bei Raumtemperatur auf dem Wippschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut drei Mal je 10 min mit 20 ml des 1X Waschpuffer gewaschen. In dieser Zeit wurden die *Chemi Reagent 1 & 2* vermischt (s.o.).

### *Peroxidase-Reaktion und Detektion*

Nach dem erneuten Waschen wurde die Membran auf eine Folie gelegt und gleichmäßig mit 1 ml des kombinierten *Chemi Reagent 1 & 2* bedeckt. Daraufhin wurde die Oberseite der transparenten Folie auf die Membran gelegt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass das Reagenz gleichmäßig auf der gesamten Membran verteilt war und Luftblasen vermieden wurden. Anschließend wurde die Membran für 1 min inkubiert. Nachdem dem Abtupfen des überflüssigen Reagenzes wurde die Membran mit dem ImageQuant™ LAS 4000 in einminütigen Sequenzen für insgesamt 25 min entwickelt.

#### 3.7.4 Auswertung

Zur Auswertung des Panels wurde das mitgelieferte *Transparency Overlay Template* zur Qualifizierung sowie die ImageQuant™ TL Software (GE Healthcare Life Sciences) zur Quantifizierung der Ergebnisse genutzt.

### 3.8 Statistische Analyse

Zur statistischen Analyse im Rahmen der Auswertung wurde das Programm GraphPad Prism Version 7.0a für Mac OS X verwendet. Normalverteilte Daten wurden mittels Student's oder Welch's t-test bzw. one-sample t-test, nicht normalverteilte Daten mittels Mann-Whitney-Test analysiert. Kategorische Daten wurden mittels Chi-Quadrat-Test analysiert. P-Werte  $< 0,05$  wurden als signifikant bewertet.

## IV. Ergebnisse

### 4.1 Einfluss der häufigen *GUCY1A1*-Variante auf die Thrombozyten

#### 4.1.1 Probanden und Genotypisierung

Für dieses Projekt wurden 192 Probanden im Rahmen einer elektiven Krankenhausaufnahme im Deutschen Herzzentrum München gescreent und aufgeklärt. Anschließend erklärten sich alle Teilnehmer schriftlich über die darauffolgende Blutentnahme und die weitere Verarbeitung der Proben und ausgewählter Daten einverstanden. Über die Anamnese, klinische Untersuchung sowie die Laborparameter konnten untenstehende Charakteristika erhoben werden.

Aus dem Vollblut der Probanden wurde die DNA isoliert, aus der anschließend die Genotypisierung erfolgte. Dafür wurde das ViiA™ 7 Real-Time PCR System mit dem TaqMan Assay für die häufige Variante des SNP rs7692387 von *GUCY1A1* verwendet. Zum Einschluss in die Analyse wurden folgende Kriterien präspezifiziert: keine bestehende Dauertherapie mit ASS, Nicht-steroidalen Antirheumatika, P2Y<sub>12</sub>-Rezeptorantagonisten oder Antikoagulantien sowie Thrombozytenzahlen im Normbereich zwischen 150-400 x10<sup>3</sup>/µl. Für die weiteren Experimente wurden die geeigneten Probanden in zwei Gruppen eingeteilt. Hierbei wurde zwischen der ersten Gruppe aus 40 homozygoten Risikoallelträgern und der zweiten Gruppe aus 32 homozygoten und heterozygoten Nicht-Risikoallelträgern unterschieden. Letztere setzten sich aus vier homozygoten und 28 heterozygoten Nicht-Risikoallelträgern zusammen. Wie in Tabelle 22 abgebildet, gab es bezüglich des Geschlechts und des Alters in beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Auch bezüglich einer bereits bestehenden koronaren Herzerkrankung wurden zwischen den zwei Gruppen keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Bei dem Routine-Laborwert der Thrombozytenzahl hat es ebenfalls keinen signifikanten Unterschied gegeben, ebenso hat es sich mit der Thrombozytenzahl nach der Gewinnung des plättchenreichen Plasmas verhalten.

**Tabelle 22:** Genotyp-abhängige Charakteristika im Probandenkollektiv der Lichttransmissions-Aggregometrie.

Homozygote Risikoallelträger (n= 40) und homozygote, sowie heterozygote Nicht-Risikoallelträger unterscheiden sich nicht in Bezug auf das Geschlecht, das Alter, die Vorerkrankung an einer koronaren Herzkrankheit bzw. die Anzahl der Thrombozyten im Vollblut oder plättchenreichem Plasma (PRP). Alter und Thrombozytenzahlen sind als Mittelwert (mean) mit Standardabweichung (s.e.m.) angegeben. Chi-Quadrat bzw. Student's t-test.

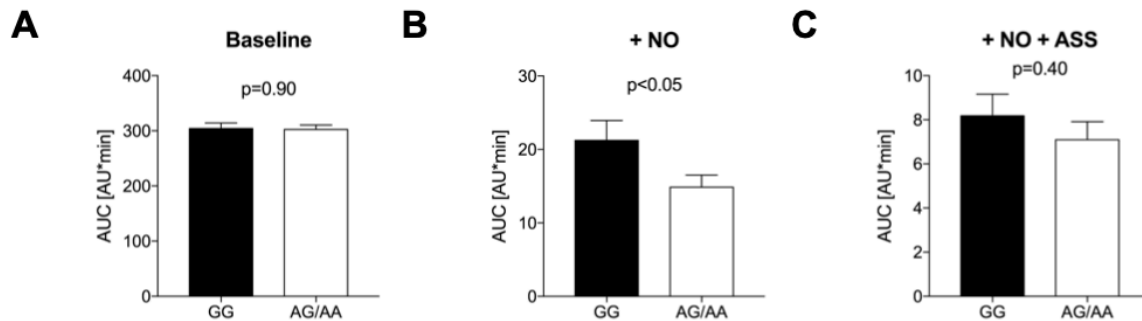
|  | <b>GG</b><br>(n= 40) | <b>AG/AA</b><br>(n= 32) | <b>p-Wert</b> |
|--|----------------------|-------------------------|---------------|
| <b>Männliches Geschlecht, n (%)</b>  | 17 (43)              | 15 (47)                 | 0.99          |
| <b>Alter, in Jahren <math>\pm</math> s.e.m.</b>  | 37.6 $\pm$ 3.4       | 40.5 $\pm$ 3.8          | 0.56          |
| <b>an einer KHK erkrankt, n (%)</b>  | 4 (10)               | 6 (19)                  | 0.32          |
| <b>Vollblut Thrombozytenzahl, <math>10^3</math> /<math>\mu</math>l <math>\pm</math> s.e.m.</b> | 253.3 $\pm$ 9.8      | 262.6 $\pm$ 10.3        | 0.52          |
| <b>PRP Thrombozytenzahl <math>10^3</math> /<math>\mu</math>l <math>\pm</math> s.e.m.</b>       | 343 $\pm$ 15.9       | 373.5 $\pm$ 13.8        | 0.16          |

#### 4.1.2 Assoziation des *GUCY1A1*-Genotyps auf die Inhibition der Thrombozytenaggregation

In früheren Arbeiten dieser Arbeitsgruppe wurde bereits gezeigt, dass das *GUCY1A1* mRNA-Level der homozygoten Risikoallelträger im Vollblut signifikant niedriger ist als bei homozygoten Nicht-Risikoallelträgern, was zu einer reduzierten  $\alpha_1$ -sGC-Expression und somit zu einer reduzierten Inhibition der Thrombozytenaggregation führt (Kessler et al., 2017). Die Anwesenheit von NO steigert die Aktivität der sGC und führt somit zu einer vermehrten Katalysierung von cGMP, welches wiederum die Phosphorylierung von VASP durch die Proteinkinase G bewirkt. Auf der anderen Seite hemmt ASS die Cyclooxygenase 1, welche sonst über die Reduktion des intrazellulären cAMP-Spiegels die Phosphorylierung von VASP durch die Proteinkinase A hemmt. Wir haben eine Thrombozytenaggregometrie durchgeführt, bei der wir die Proben mit ASS inkubiert und anschließend die sGC mit NO aktiviert haben. Daraufhin ist die Thrombozytenaggregation mit Arachidonsäure induziert worden. Die Ergebnisse der homozygoten Risikoallelträger (n= 32) und homo- bzw. heterozygoten Nicht-Risikoallelträger (n= 40) wurde in der Licht-Transmissions-Aggregometrie gemessen.

In der Analyse der *Baseline*-Aggregation (ohne ASS, ohne NO) zeigten sich genotypspezifisch keine signifikanten Unterschiede ( $p= 0,90$ ) hinsichtlich der AUC (*Area under the curve* = Fläche unter der Kurve). Nach der Zugabe des NO-Donors Nitroprussid-Natrium zeigte sich bei den homozygoten Risikoallelträgern eine signifikant schwächere Inhibition der Thrombozytenaggregation im Gegensatz zu Gruppe der homo- und heterozygoten Nicht-Risikoallelträgern ( $p < 0,05$ ). Die AUC lag in der Gruppe homozygoter Risikoallelträger mit  $21 \pm 3$  (mean  $\pm$  s.e.m.) höher, verglichen mit  $15 \pm 2$  in der Gruppe der Nicht-Risikoallelträger. Um

den Effekt sowie einen möglichen Kompensationsmechanismus über den *cAMP-Pathway* zu beurteilen, wurden einige Proben zudem mit ASS präinkubiert. Bei der zugehörigen Auswertung zeigte sich, dass die vorherige Reduktion der Inhibition der Thrombozytenaggregation durch die Präinkubation mit ASS ausgeglichen wurde. Nun wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen beobachtet ( $p = 0,40$ ).

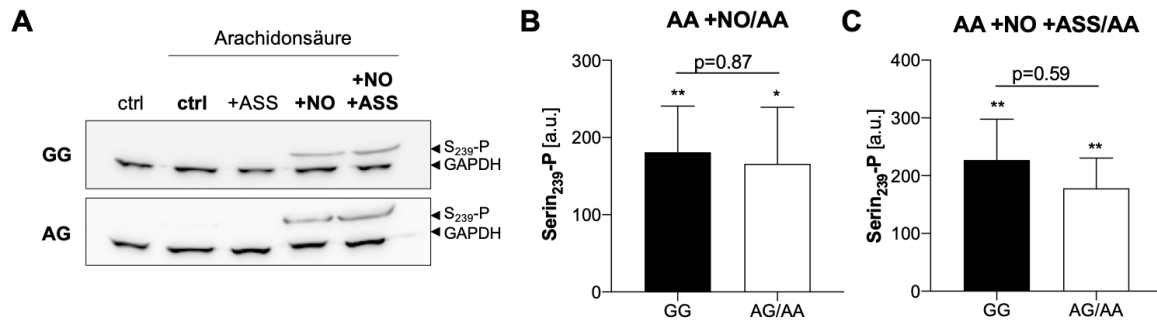


**Abbildung 10:** Genotyp-spezifische Thrombozytenreaktionen auf NO und ASS.

**A.** Die Baseline Arachidonsäure (AA)-induzierte Thrombozytenaggregation unterscheidet sich nicht zwischen den zwei Genotyp-Gruppen (GG  $n = 40$ , AA/AG  $n = 32$ ), AUC [mean  $\pm$  s.e.m.] GG  $304 \pm 10$  vs. AA/AG  $303 \pm 8$ . **B, C.** Die Zugabe des NO-Donors Nitroprussid Natrium führt zu einer signifikant schwächeren Hemmung der AA-induzierten Plättchenaggregation bei den homozygoten Risikoallelträgern ( $n = 40$ ) im Vergleich zu den homo- und heterozygoten Nicht-Risikoallelträgern ( $n = 32$ ), AUC [mean  $\pm$  s.e.m.] GG  $21 \pm 3$  vs. AA/AG  $15 \pm 2$ ,  $p < 0,05$  (**B**). Diese wurde durch die Präinkubation mit ASS wieder ausgeglichen, AUC [mean  $\pm$  s.e.m.] GG  $8 \pm 1$  vs. AA/AG  $7 \pm 1$  (**C**). Mittelwert und Standardabweichung, Welch's t-test.

#### 4.1.3 Auswirkung des *GUCY1A1*-Genotyps auf die cGMP-abhängige Phosphorylierung von VASP

Durch die Zugabe von NO wird die sGC 200-fach verstärkt aktiviert (Humbert et al., 1990). Diese wiederum katalysiert die Reaktion von GTP zu cGMP. cGMP steigert die Aktivität der PKG, welche VASP an Serin<sub>239</sub> zu P-VASP phosphoryliert. P-VASP indes hemmt die Aggregation der Thrombozyten. Um dies zu quantifizieren, wurden die Thrombozyten nach der Lichttransmissions-Aggregometrie in einem Western Blot untersucht. Es wurde ein Antikörper gegen das an Serin<sub>239</sub> phosphorylierte P-VASP genutzt. Um mögliche Schwankungen der Proteinmenge in den Thrombozyten zu korrigieren, wurde zudem ein Antikörper gegen das *Housekeeping*-Enzym GAPDH genutzt. Die Analyse des Western Blots erfolgte mit dem ImageQuant™ LAS 4000 und der entsprechenden Software (ImageQuant™ TL Software). Hierbei zeigte sich, dass sowohl bei Nicht-Risikoallelträgern als auch bei Risikoallelträgern eine Zunahme der Serin<sub>239</sub>-Phosphorylierung zu beobachten ist. Es fand sich jedoch kein Unterschied zwischen den Genotypen (**Abb. 11**).

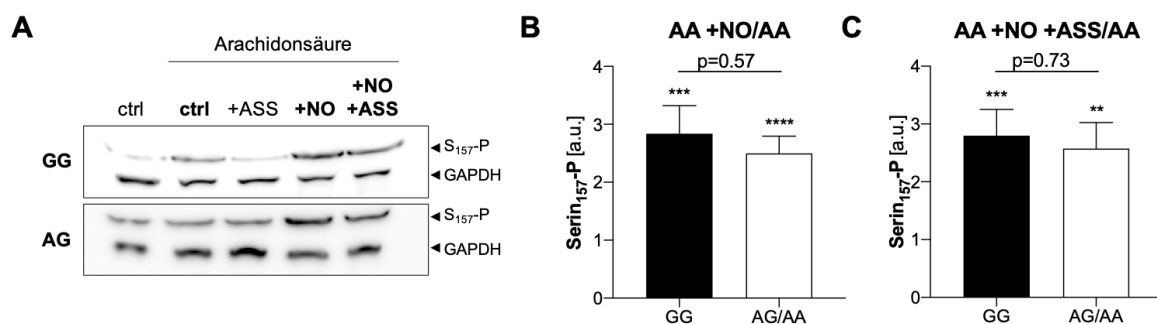


**Abbildung 11:** Serin<sub>239</sub>-Phosphorylierung von VASP.

A. Repräsentativer Western Blot eines Nicht-Risikoalleleträgers (AA/AG) und eines Risikoalleleträgers (GG). Für die Quantifizierung wurde die Serin<sub>239</sub>-Phosphorylierung nach Stimulation mit Arachidonsäure und dem NO-Donor (AA + NO; B) bzw. Arachidonsäure, NO-Donor und ASS (AA + NO + ASS; C) zur Stimulation mit Arachidonsäure alleine ins Verhältnis gesetzt. Ein Wert von "1" würde eine ausbleibende Zunahme der Phosphorylierung darstellen. Mittelwert und Standardfehler. One-sample t-test innerhalb der Genotypen und Student's t-test im Vergleich der Genotypen.

#### 4.1.4 Auswirkung des *GUCY1A1*-Genotyps auf die cAMP-anhängige Phosphorylierung von VASP

Gleichwohl kann P-VASP auch durch die cAMP-aktivierte Proteinkinase A an Serin<sub>157</sub> phosphoryliert werden (Aszodi et al., 1999). Dabei senkt die Anwesenheit von Arachidonsäure indirekt die intrazelluläre Konzentration von cAMP und führt so indirekt zu einer verstärkten Thrombozytenaggregation. Dieser Vorgang wurde nun durch die irreversible Hemmung der Cyclooxygenase-1 (COX-1) mit ASS inhibiert. Auch hierfür wurden die Thrombozyten nach der Lichttransmissions-Aggregometrie im Western Blot weiterführend untersucht. Es wurden der spezifische Antikörper gegen das an Serin<sub>157</sub> phosphorylierte P-VASP, sowie zudem der Antikörper gegen das Housekeeping-Enzym GAPDH (s.o.) genutzt. Die Analyse des Western Blots erfolgte erneut mit dem ImageQuant™ LAS 4000 und der entsprechenden Software (ImageQuant™ TL Software). Hierbei ließ sich feststellen, dass sowohl bei Nicht-Risikoalleleträgern als auch bei Risikoalleleträgern eine Zunahme der Serin<sub>157</sub>-Phosphorylierung zu beobachten ist. Es fand sich jedoch kein Unterschied zwischen den Genotypen (**Abb. 12**).





**Abbildung 12:** Serin<sub>157</sub>-Phosphorylierung von VASP.

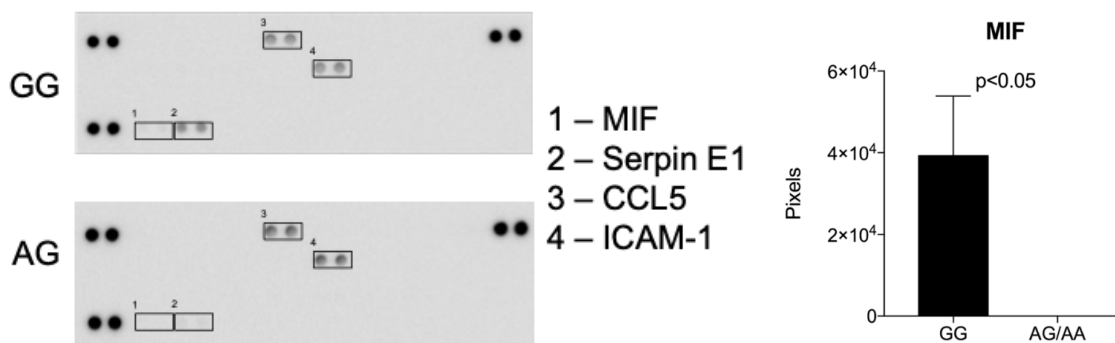
A. Repräsentativer Western Blot eines Nicht-Risikoalleleträgers (AA/AG) und eines Risikoalleleträgers (GG). Für die Quantifizierung wurde die Serin<sub>157</sub>-Phosphorylierung nach Stimulation mit Arachidonsäure und dem NO-Donor (AA + NO; B) bzw. Arachidonsäure, NO-Donor und ASS (AA + NO + ASS; C) zur Stimulation mit Arachidonsäure alleine ins Verhältnis gesetzt. Ein Wert von "1" würde eine ausbleibende Zunahme der Phosphorylierung darstellen. Mittelwert und Standardfehler. One-sample t-test innerhalb der Genotypen und Student's t-test im Vergleich der Genotypen.

## 4.2. Einfluss der *GUCY1A1*-Variante auf thrombozytäre Zytokine

Eine Mutation des SNP rs7692387 des Gens *GUCY1A1* bewirkt ein erhöhtes Risiko für eine koronare Herzkrankheit und ein Herzinfarkt (CARDIoGRAMplusC4D Consortium et al., 2013). Um die pathophysiologischen Einzelschritte der Arteriosklerosebildung zu untersuchen, wurde darüber hinaus der Überstand der Thrombozyten aus der Lichttransmissions-Aggregometrie mit dem Human Cytokine Array Kit (R&D Systems) untersucht.

### 4.2.1 Zytokinausschüttung bei Thrombozytenaggregation

Der Fokus der Untersuchung wurde auf die Genotyp-abhängige Zytokinausschüttung der Thrombozyten in Anwesenheit des NO-Donors Nitroprussid-Natrium während der Aggregation gelegt. Bei der Auswertung des Human Cytokine Array Kits zeigte sich bei den homozygoten Risikoallelträgern eine signifikant erhöhte Ausschüttung des Makrophagen Migrations Inhibitions Faktors (MIF), mit einem P-Wert  $< 0,05$ . Für die weiteren detektierten Zytokine Serpin E1, CCL5 und ICAM-1 zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Genotypen.



**Abbildung 13:** Genotyp-abhängige Analyse des Human Cytokine Array Kit.

Analyse der verschiedenen Zytokine, die von den Thrombozyten in der Licht-Transmissions-Aggregometrie in Anwesenheit des NO-Donors Nitroprussid Natrium in den Überstand ausgeschüttet worden sind. Hierbei zeigt sich für den Makrophagen Migrations Inhibitions Faktor (MIF) bei den homozygoten Risikoallelträgern eine signifikant höhere Ausschüttung als bei den homo- und heterozygoten Nicht-Risikoallelträgern. Für die weiteren ausgeschütteten Zytokine Serpin E1, CCL5 und ICAM-1 zeigte sich zwischen den beiden verschiedenen Genotyp-Gruppen kein signifikanter Unterschied.

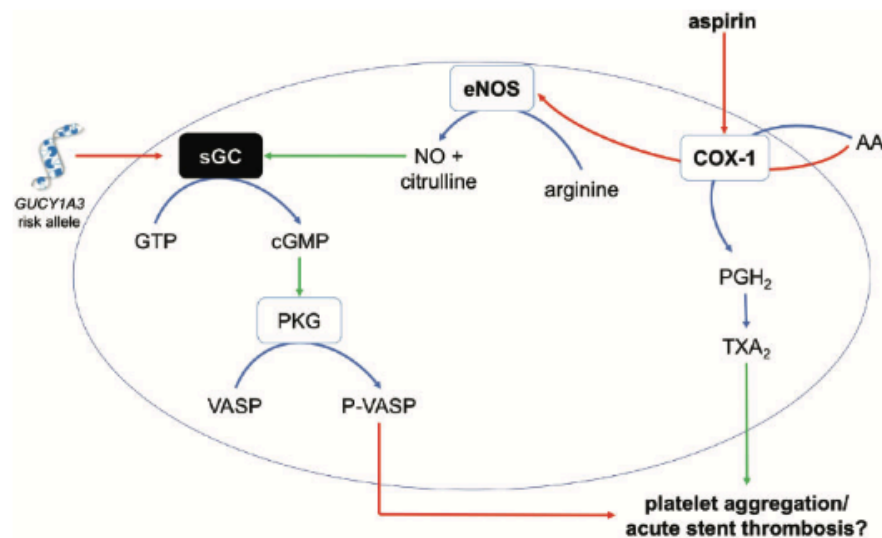
## V. Diskussion

### 5.1 Einfluss der häufigen *GUCY1A1*-Variante auf Thrombozyten-Aggregation unter präventiver Aspirin-Therapie

Der häufige SNP rs7692387 im *GUCY1A1*-Gen beeinflusst die Expression der  $\alpha_1$ -Untereinheit der sGC in Thrombozyten. Diese ist ein Schlüsselenzym im NO-cGMP-Signalweg, da sie über die Bildung von cGMP die Aktivierung der Proteinkinase G stimuliert, welche wiederum über die Phosphorylierung von VASP die Thrombozytenaggregation hemmt (Wobst, Rumpf, et al., 2015).

2013 wurde in einer GWAS herausgefunden, dass rs7692387 mit der koronaren Herzkrankheit assoziiert ist (CARDIoGRAMplusC4D Consortium et al., 2013). Hierbei sind etwa 60 % der europäischen Bevölkerung homozygot für das Risikoallel, während nur 4 % homozygot bzw. 36 % heterozygot das Nicht-Risikoallel tragen (Wobst, Kessler, et al., 2015). Der SNP ist in einer *Enhancer*-Region des *GUCY1A1*-Gens gelegen und beeinflusst die Promotoraktivität, was bei homozygoten Risikoallelträgern eine verminderte Expression der  $\alpha_1$ -Untereinheit der sGC und nach NO-Stimulation eine reduzierte Hemmung der Thrombozytenaggregation zur Folge hat (Kessler et al., 2017).

Arachidonsäure stimuliert dosisabhängig die inhibitorische Phosphorylierung der eNOS, wodurch es zu erniedrigten Spiegeln von NO und demnach cGMP und P-VASP kommt (Signorello, Segantini, & Leoncini, 2009). Dies führt zu einer erhöhten Aggregationsbereitschaft der Thrombozyten (Abb. 10). Ein Zusammenhang zwischen rs7692387 bzw. der sGC und dem Nutzen von ASS wurde bereits in zwei Projekten unserer Arbeitsgruppe gezeigt. 1. Homozygote Risikoallel-Träger des *GUCY1A1*-Genotyps, die weniger sGC in Thrombozyten exprimieren, weisen ein geringeres Ansprechen auf ASS nach PCI auf und haben ein erhöhtes Risiko für ischämische Ereignisse (Kessler et al., 2019). 2. Homozygote Risikoallelträger profitieren im Gegensatz zu Nicht-Risikoallelträgern von der Gabe von Aspirin in der Primärprävention (Hall et al., 2019). In der vorliegenden Arbeit sollte daher überprüft werden, ob 1. auch unter Arachidonsäure eine reduzierte NO-vermittelte Inhibition der Thrombozytenaggregation in homozygoten Risikoallelträgern nachweisbar ist und 2. dieser Unterschied durch die Gabe von ASS reduziert werden kann.



**Abbildung 14:** Hypothetische Interaktion des Arachidonsäuremetabolismus mit dem NO-cGMP-Signalweg in Thrombozyten.

Arachidonsäure reduziert die Bioverfügbarkeit von NO, was durch die Inhibition der Cyclooxygenase-1 aufgehoben werden kann. Nach (Kessler et al., 2019).

In der mit Arachidonsäure induzierten optischen Lichttransmissions-Aggregometrie zeigte sich unter Baseline-Bedingungen kein Unterschied zwischen den Genotypen. Nach Zugabe des NO-Donors war in den homozygoten Risikoallelträgern im Vergleich zu den Nicht-Risikoallelträgern eine signifikant schwächere Inhibition der Thrombozytenaggregation nachweisbar. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit früheren Daten unserer Arbeitsgruppe zur Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit Adenosindiphosphat (ADP) (Kessler et al., 2017). Die Daten zeigen jedoch, dass der Einfluss des Genotyps auf die NO-vermittelte Inhibition der Aggregation nicht auf ADP begrenzt ist. ASS stellt einen weit verbreiteten Inhibitor der Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregation dar (Schorr, 1997). Während ein Nutzen von ASS in der Sekundärprävention kardiovaskulärer Erkrankungen unbestritten ist, konnten Studien in der Primärprävention bisher keinen positiven Einfluss auf die Vermeidung vaskulärer Ereignisse, der das Risiko von Blutungen übersteigt, nachweisen (zum Überblick siehe (Patrono, 2015)). Unsere Arbeitsgruppe stellte sich daher die Frage, ob ein positiver Effekt möglicherweise Genotyp-spezifisch bei homozygoten Trägern des *GUCY1A1*-Risikoallels nachweisbar ist. Aus diesem Zweck erfolgte eine Genotyp-spezifische Analyse der Women's Health Study (Ridker et al., 2005) sowie der Physician's Health Study (Steering Committee of the Physicians' Health Study Research, 1989), in denen der Einfluss von Aspirin bei gesunden Frauen bzw. Männern untersucht wurde. Tatsächlich profitierten die homozygoten Risikoallelträger\*innen von Aspirin in der Primärprävention, was im Gegensatz zu den Befunden der Allgemeinbevölkerung steht (Hall et al., 2019). In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob die zusätzliche Inkubation mit Aspirin die unterschiedliche NO-

vermittelte Inhibition der Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregation zwischen den Genotypen ausgleichen kann. In der Tat war nach Präinkubation mit ASS kein Unterschied zwischen den Genotypen nachweisbar. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass ASS Genotyp-abhängige Defizite in der NO-vermittelten Thrombozytenaggregationshemmung ausgleichen und so Genotyp-spezifisch einen Nutzen von ASS in der Primärprävention erklären kann. Aufgrund des Zusammenhangs des *GUCY1A1*-Gens mit der koronaren Herzkrankheit sowie dem Myokardinfarkt und der Häufigkeit der homozygoten Risikoallelträgern des Einzelnukleotid-Polymorphismus rs7692387 von 60 % in der europäischen Bevölkerung ist die Genotyp-spezifische Behandlung mit ASS ein vielversprechender Präventionsansatz für betroffene Risikopatienten.

Als Limitation ist aufzuführen, dass die Versuche an humanem Material *in vitro* durchgeführt wurden. Demnach entsprechen die Verhältnisse der Lichttransmissions-Aggregometrie der Thrombozyten nicht denen im menschlichen Körper. Zudem stellt die vorherige Präparation von plättchenreichem Plasma eine Umgebung dar, in der sämtliche korpuskularen Bestandteile des Blutes wie z.B. Leukozyten oder Erythrozyten entfernt wurden und somit nicht mit den Thrombozyten interagieren können. Obwohl dieser Schritt die Arbeit weiter von den realen Bedingungen entfernt, wurde der Versuchsaufbau absichtlich so gewählt, um die Thrombozyten und ihre Signalwege isoliert betrachten zu können. Ein weiterer Nachteil des Messverfahrens besteht in dem prozessbedingten Zeitfenster zwischen der Blutentnahme und der eigentlichen Aggregationsinduktion. Hierbei wurde die Unterbrechung strikt unter 3 Stunden gehalten, um mögliche Auswirkungen zu verhindern.

Um weitere Einblicke in die molekularen Prozesse zu erlangen, analysierten wir in dieser Arbeit auch die cAMP- und cGMP-abhängige Phosphorylierung von VASP. Während wir für beide Genotypgruppen beobachteten, dass die Präinkubation mit dem NO-Donor zu einer signifikanten Zunahme beider Phosphorylierungen führte, war kein Unterschied zwischen den Genotypen nachweisbar. Entsprechend konnte auch kein Einfluss von ASS auf den VASP-Phosphorylierungsstatus nachgewiesen werden. In dieser Arbeit kann nicht abschließend ausgeschlossen werden, dass die Gabe von ASS den VASP-Phosphorylierungsstatus beeinflusst.

In Zusammenschau der Genotyp-spezifischen Analyse der Women's Health Study und der Physician's Health Study (Hall et al., 2019) und der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erscheint die Behandlung mit Aspirin bei homozygoten Risikoallelträgern des *GUCY1A1*-SNP 7692387 als vielversprechender Präventionsansatz. In Zukunft sollte insbesondere der Wirkmechanismus weiter untersucht werden, so dass sich daraus ein weiterer Schritt in Richtung einer individualisierten, Genotyp-spezifischen Prävention von atherosklerotischer Plaquebildung und -progression ableiten lassen kann.

## 5.2 Einfluss der häufigen *GUCY1A1*-Variante auf Zytokinausschüttung von Thrombozyten

Thrombozyten spielen eine entscheidende Rolle sowohl in der Entstehung von Atherosklerose als auch bei der Atherothrombose nach Plaqueruptur (Kessler, Schunkert, & von Hundelshausen, 2020). Während in der vorliegenden Arbeit zunächst die Aggregation der Thrombozyten in Abhängigkeit von Genotyp und Exposition mit NO-Donoren sowie ASS untersucht wurde, sezernieren Thrombozyten ferner Zytokine, die die Plaquebildung und -progression beeinflussen können. Um erste Einblicke in Genotyp-abhängige Unterschiede zu erlangen, wurde daher die Zytokinausschüttung im Rahmen der Thrombozytenaggregation untersucht.

Hierzu wurde der Überstand der Proben nach Durchführung der Aggregationsexperimente mit einem humanen Zytokinarray weiter untersucht. Der Fokus der Analyse wurde hierbei auf die Thrombozytenaggregation in Anwesenheit von NO gelegt. In den verschiedenen Ansätzen mit dem Überstand homozygoter Risikoallelträger sowie heterozygoter Risikoallelträger ließen sich die Zytokine MIF, Serpin E1, CCL5 und ICAM-1 nachweisen. Hierbei war auffallend, dass die Ausschüttung des Makrophagen Migrations Inhibitions Faktor (MIF) bei den homozygoten Risikoallelträgern signifikant erhöht war. Für die restlichen Zytokine, Serpin E1, CCL5 und ICAM-1 ließ sich zwischen den Genotyp-Gruppen kein signifikanter Unterschied in der Zytokinausschüttung nachweisen.

MIF (*macrophage migration inhibitory factor*) ist ein inflammatorisches Cytokin mit ähnlichen Eigenschaften wie ein Chemokin, was es zu einem Mitglied der Familie der atypischen Chemokine macht (Bernhagen et al., 2007). Aufbauend auf dem Konzept vieler Studien ist Atherosklerose eine chronisch entzündliche Erkrankung der Arterienwand, welche durch zelluläre und molekulare Mechanismen entsteht (Libby, Ridker, & Maseri, 2002). Es zeigte sich, dass Chemokine die entscheidenden Regulatoren der Rekrutierung von Monozyten und T-Zellen in atherosklerotischen Läsionen sind (Weber, Schober, & Zerneck, 2004). Da MIF in menschlichen atherosklerotischen Läsionen von zahlreichen Zelltypen im Überfluss produziert wird, könnte es ein wichtiger Regler in der Entwicklung früher Plaques sowie auch fortgeschrittener Läsionen sein (Burger-Kentischer et al., 2002). Der Nachweis von MIF in vaskulären Entzündungsbereichen und dem Blutkreislauf kann als Indikator für die Schwere der Erkrankung dienen (Zerneck, Bernhagen, & Weber, 2008).

MIF hat im Kontext der Atherogenese zahlreiche Interaktionen. Dazu gehört die Rekrutierung von Monozyten und T-Zellen, sowie die Konversion von Makrophagen in Schaumzellen und die Regulation der Migration oder Proliferation der SMCs (Schober et al., 2004). In der Folge tritt ein vermehrtes Remodeling und eine Destabilisierung der Plaques auf (Z. Chen et al.,

2004). Somit ist MIF sowohl an der primären Atherogenese und Plaque-Progression, als auch an einem Signalweg für das Entstehen instabiler Läsionen nach Gefäßverletzung beteiligt (Zernecke et al., 2008).

Aufgrund der hervorgehobenen Stellung von MIF als Regulator von Gefäßerkrankungen besteht ein großes Interesse an möglichen Therapieoptionen die MIF individuell blockieren. Weitere Schritte in diese Richtung sind Bestandteile der aktuellen Forschung in diesem Gebiet (Sinitski et al., 2019; Zernecke et al., 2008). Auch hier sind weitere Untersuchungen hinsichtlich einer genotypspezifischen individuellen Therapie sinnvoll, da die aggregierenden Thrombozyten homozygoter Risikoallelträger mehr MIF aus ihren Granula freisetzen. Dies kann ein weiterer Ansatz zum Verständnis des erhöhten Risikoprofils dieser Gruppe für kardiovaskuläre Erkrankungen sein.

### 5.3 Zusammenfassung und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass die reduzierte NO-vermittelte Inhibition der Thrombozytenaggregation in homozygoten Risikoallelträgern für den Einzelnukleotid-Polymorphismus rs7692387 auch unter Arachidonsäure nachweisbar ist. Zudem ließen sich die Unterschiede *in vitro* durch die Gabe von ASS reduzieren.

Des Weiteren konnte unter Präinkubation mit einem NO-Donor auf molekularer Ebene für beide Genotypen eine gesteigerte Phosphorylierung von VASP nachgewiesen werden. Dieser unterschied sich jedoch nicht zwischen den Genotypen, so dass der Einfluss von ASS auf diese Phosphorylierung nicht analysiert werden konnte. Ein fehlender Einfluss auf den VASP-Phosphorylierungsstatus konnte in dieser Arbeit jedoch nicht abschließend ausgeschlossen werden.

Es wurde weiterhin gezeigt, dass auch die Ausschüttung des Zytokin MIF bei homozygoten Risikoallelträgern während der Thrombozytenaggregation in Anwesenheit von NO signifikant erhöht war.

Zukünftig wäre interessant, ob sich die Ergebnisse dieser Arbeit *in vivo* reproduzieren lassen. Dies und ein verbessertes Verständnis der Wirkmechanismen ermöglicht einen weiteren Schritt in Richtung der individualisierten, Genotyp-spezifischen Prävention atherosklerotischer Erkrankungen.

## VI. Literaturverzeichnis

- Antl, M., von Bruhl, M. L., Eiglsperger, C., Werner, M., Konrad, I., Kocher, T., . . . Schlossmann, J. (2007). IRAG mediates NO/cGMP-dependent inhibition of platelet aggregation and thrombus formation. *Blood*, *109*(2), 552-559. doi:10.1182/blood-2005-10-026294
- Aragam, K. G., Jiang, T., Goel, A., Kanoni, S., Wolorf, B. N., Atri, D. S., . . . Consortium, C. A. D. (2022). Discovery and systematic characterization of risk variants and genes for coronary artery disease in over a million participants. *Nat Genet*, *54*(12), 1803-1815. doi:10.1038/s41588-022-01233-6
- Aszodi, A., Pfeifer, A., Ahmad, M., Glauner, M., Zhou, X. H., Ny, L., . . . Fassler, R. (1999). 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*, *18*(1), 37-48. doi:10.1093/emboj/18.1.37
- Bamshad, M. J., Ng, S. B., Bigham, A. W., Tabor, H. K., Emond, M. J., Nickerson, D. A., & Shendure, J. (2011). Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat Rev Genet*, *12*(11), 745-755. doi:10.1038/nrg3031
- Bernhagen, J., Krohn, R., Lue, H., Gregory, J. L., Zerneck, A., Koenen, R. R., . . . Weber, C. (2007). MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat Med*, *13*(5), 587-596. doi:10.1038/nm1567
- Bishop-Bailey, D., Pepper, J. R., Haddad, E. B., Newton, R., Larkin, S. W., & Mitchell, J. A. (1997). Induction of cyclooxygenase-2 in human saphenous vein and internal mammary artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *17*(9), 1644-1648. doi:10.1161/01.atv.17.9.1644
- Brock, T. G., McNish, R. W., & Peters-Golden, M. (1999). Arachidonic acid is preferentially metabolized by cyclooxygenase-2 to prostacyclin and prostaglandin E2. *J Biol Chem*, *274*(17), 11660-11666. doi:10.1074/jbc.274.17.11660
- Budworth, J., Meillerais, S., Charles, I., & Powell, K. (1999). Tissue distribution of the human soluble guanylate cyclases. *Biochem Biophys Res Commun*, *263*(3), 696-701. doi:10.1006/bbrc.1999.1444
- Burger, P. C., & Wagner, D. D. (2003). Platelet P-selectin facilitates atherosclerotic lesion development. *Blood*, *101*(7), 2661-2666. doi:10.1182/blood-2002-07-2209
- Burger-Kentischer, A., Goebel, H., Seiler, R., Fraedrich, G., Schaefer, H. E., Dimmeler, S., . . . Ihling, C. (2002). Expression of macrophage migration inhibitory factor in different stages of human atherosclerosis. *Circulation*, *105*(13), 1561-1566. doi:10.1161/01.cir.0000012942.49244.82
- Busse, R., & Fleming, I. (1995). Regulation and functional consequences of endothelial nitric oxide formation. *Ann Med*, *27*(3), 331-340. doi:10.3109/07853899509002586
- Butt, E., Abel, K., Krieger, M., Palm, D., Hoppe, V., Hoppe, J., & Walter, U. (1994). cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets. *J Biol Chem*, *269*(20), 14509-14517. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8182057>



- CARDIoGRAMplusC4D Consortium, Deloukas, P., Kanoni, S., Willenborg, C., Farrall, M., Assimes, T. L., . . . Samani, N. J. (2013). Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease. *Nat Genet*, *45*(1), 25-33. doi:10.1038/ng.2480
- Chen, H., & Kassab, G. S. (2016). Microstructure-based biomechanics of coronary arteries in health and disease. *J Biomech*, *49*(12), 2548-2559. doi:10.1016/j.jbiomech.2016.03.023
- Chen, Z., Sakuma, M., Zago, A. C., Zhang, X., Shi, C., Leng, L., . . . Simon, D. (2004). Evidence for a role of macrophage migration inhibitory factor in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *24*(4), 709-714. doi:10.1161/01.ATV.0000119356.35748.9e
- Chrisman, T. D., Garbers, D. L., Parks, M. A., & Hardman, J. G. (1975). Characterization of particulate and soluble guanylate cyclases from rat lung. *J Biol Chem*, *250*(2), 374-381. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/234425>
- Clark, J. M., & Glagov, S. (1985). Transmural organization of the arterial media. The lamellar unit revisited. *Arteriosclerosis*, *5*(1), 19-34. doi:10.1161/01.atv.5.1.19
- Coronary Artery Disease Genetics Consortium. (2011). A genome-wide association study in Europeans and South Asians identifies five new loci for coronary artery disease. *Nat Genet*, *43*(4), 339-344. doi:10.1038/ng.782
- D'Agostino, R. B., Sr., Vasan, R. S., Pencina, M. J., Wolf, P. A., Cobain, M., Massaro, J. M., & Kannel, W. B. (2008). General cardiovascular risk profile for use in primary care: the Framingham Heart Study. *Circulation*, *117*(6), 743-753. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.699579
- Dangel, O., Mergia, E., Karlisch, K., Groneberg, D., Koesling, D., & Friebe, A. (2010). Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase is the only nitric oxide receptor mediating platelet inhibition. *J Thromb Haemost*, *8*(6), 1343-1352. doi:10.1111/j.1538-7836.2010.03806.x
- Davies, M. J. (1992). Anatomic features in victims of sudden coronary death. Coronary artery pathology. *Circulation*, *85*(1 Suppl), 119-24. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1728500>
- Demer, L. L. (2002). Vascular calcification and osteoporosis: inflammatory responses to oxidized lipids. *Int J Epidemiol*, *31*(4), 737-741. doi:10.1093/ije/31.4.737
- Derbyshire, E. R., & Marletta, M. A. (2012). Structure and regulation of soluble guanylate cyclase. *Annu Rev Biochem*, *81*, 533-559. doi:10.1146/annurev-biochem-050410-100030
- Desch, M., Sigl, K., Hieke, B., Salb, K., Kees, F., Bernhard, D., . . . Schlossmann, J. (2010). IRAG determines nitric oxide- and atrial natriuretic peptide-mediated smooth muscle relaxation. *Cardiovasc Res*, *86*(3), 496-505. doi:10.1093/cvr/cvq008
- Do, R., Stitzziel, N. O., Won, H. H., Jorgensen, A. B., Duga, S., Angelica Merlini, P., . . . Kathiresan, S. (2015). Exome sequencing identifies rare LDLR and APOA5 alleles conferring risk for myocardial infarction. *Nature*, *518*(7537), 102-106. doi:10.1038/nature13917
- Ensembl. (2022). 1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies. Retrieved from [http://oct2022.archive.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Population?db=core;r=4:155713657-155714657;v=rs7692387;vdb=variation;vf=94315558](http://oct2022.archive.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=4:155713657-155714657;v=rs7692387;vdb=variation;vf=94315558)

- Erdmann, J., Stark, K., Esslinger, U. B., Rumpf, P. M., Koesling, D., de Wit, C., . . . Schunkert, H. (2013). Dysfunctional nitric oxide signalling increases risk of myocardial infarction. *Nature*, *504*(7480), 432-436. doi:10.1038/nature12722
- Fabre, J. E., Nguyen, M., Athirakul, K., Coggins, K., McNeish, J. D., Austin, S., . . . Koller, B. H. (2001). Activation of the murine EP3 receptor for PGE2 inhibits cAMP production and promotes platelet aggregation. *J Clin Invest*, *107*(5), 603-610. doi:10.1172/JCI10881
- Feil, R., & Kemp-Harper, B. (2006). cGMP signalling: from bench to bedside. Conference on cGMP generators, effectors and therapeutic implications. *EMBO Rep*, *7*(2), 149-153. doi:10.1038/sj.embor.7400627
- Fernandez-Ortiz, A., Badimon, J. J., Falk, E., Fuster, V., Meyer, B., Mailhac, A., . . . Badimon, L. (1994). Characterization of the relative thrombogenicity of atherosclerotic plaque components: implications for consequences of plaque rupture. *J Am Coll Cardiol*, *23*(7), 1562-1569. doi:10.1016/0735-1097(94)90657-2
- Finn, A. V., Nakano, M., Narula, J., Kolodgie, F. D., & Virmani, R. (2010). Concept of vulnerable/unstable plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *30*(7), 1282-1292. doi:10.1161/ATVBAHA.108.179739
- Fontana, P., Zufferey, A., Daali, Y., & Reny, J. L. (2014). Antiplatelet therapy: targeting the TxA2 pathway. *J Cardiovasc Transl Res*, *7*(1), 29-38. doi:10.1007/s12265-013-9529-1
- Furchgott, R. F., & Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, *288*(5789), 373-376. doi:10.1038/288373a0
- Gambaryan, S., Kobsar, A., Rukoyatkina, N., Herterich, S., Geiger, J., Smolenski, A., . . . Walter, U. (2010). Thrombin and collagen induce a feedback inhibitory signaling pathway in platelets involving dissociation of the catalytic subunit of protein kinase A from an NFkappaB-IkappaB complex. *J Biol Chem*, *285*(24), 18352-18363. doi:10.1074/jbc.M109.077602
- Halbrugge, M., Friedrich, C., Eigenthaler, M., Schanzenbacher, P., & Walter, U. (1990). Stoichiometric and reversible phosphorylation of a 46-kDa protein in human platelets in response to cGMP- and cAMP-elevating vasodilators. *J Biol Chem*, *265*(6), 3088-3093. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2154470>
- Hall, K. T., Kessler, T., Buring, J. E., Passow, D., Sesso, H. D., Zee, R. Y. L., . . . Schunkert, H. (2019). Genetic variation at the coronary artery disease risk locus GUCY1A3 modifies cardiovascular disease prevention effects of aspirin. *Eur Heart J*, *40*(41), 3385-3392. doi:10.1093/eurheartj/ehz384
- Harteneck, C., Koesling, D., Soling, A., Schultz, G., & Bohme, E. (1990). Expression of soluble guanylyl cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits. *FEBS Lett*, *272*(1-2), 221-223. doi:10.1016/0014-5793(90)80489-6
- Horstrup, K., Jablonka, B., Honig-Liedl, P., Just, M., Kochsiek, K., & Walter, U. (1994). Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition. *Eur J Biochem*, *225*(1), 21-27. doi:10.1111/j.1432-1033.1994.00021.x
- Humbert, P., Niroomand, F., Fischer, G., Mayer, B., Koesling, D., Hinsch, K. D., . . . Bohme, E. (1990). Purification of soluble guanylyl cyclase from bovine lung by a new

- immunoaffinity chromatographic method. *Eur J Biochem*, 190(2), 273-278. doi:10.1111/j.1432-1033.1990.tb15572.x
- Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., & Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(24), 9265-9269. doi:10.1073/pnas.84.24.9265
- International Consortium for Blood Pressure Genome-Wide Association Studies, Ehret, G. B., Munroe, P. B., Rice, K. M., Bochud, M., Johnson, A. D., . . . Johnson, T. (2011). Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk. *Nature*, 478(7367), 103-109. doi:10.1038/nature10405
- Irie, A., Segi, E., Sugimoto, Y., Ichikawa, A., & Negishi, M. (1994). Mouse prostaglandin E receptor EP3 subtype mediates calcium signals via Gi in cDNA-transfected Chinese hamster ovary cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 204(1), 303-309. doi:10.1006/bbrc.1994.2460
- Kamisaki, Y., Saheki, S., Nakane, M., Palmieri, J. A., Kuno, T., Chang, B. Y., . . . Murad, F. (1986). Soluble guanylate cyclase from rat lung exists as a heterodimer. *J Biol Chem*, 261(16), 7236-7241. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2872214>
- Kannel, W. B., Dawber, T. R., Kagan, A., Revotskie, N., & Stokes, J., 3rd. (1961). Factors of risk in the development of coronary heart disease--six year follow-up experience. The Framingham Study. *Ann Intern Med*, 55, 33-50. doi:10.7326/0003-4819-55-1-33
- Kessler, T., & Schunkert, H. (2021). Coronary Artery Disease Genetics Enlightened by Genome-Wide Association Studies. *JACC Basic Transl Sci*, 6(7), 610-623. doi:10.1016/j.jacbts.2021.04.001
- Kessler, T., Schunkert, H., & von Hundelshausen, P. (2020). Novel Approaches to Fine-Tune Therapeutic Targeting of Platelets in Atherosclerosis: A Critical Appraisal. *Thromb Haemost*, 120(11), 1492-1504. doi:10.1055/s-0040-1714352
- Kessler, T., Vilne, B., & Schunkert, H. (2016). The impact of genome-wide association studies on the pathophysiology and therapy of cardiovascular disease. *EMBO Mol Med*, 8(7), 688-701. doi:10.15252/emmm.201506174
- Kessler, T., Wobst, J., Wolf, B., Eckhold, J., Vilne, B., Hollstein, R., . . . Schunkert, H. (2017). Functional Characterization of the GUCY1A3 Coronary Artery Disease Risk Locus. *Circulation*, 136(5), 476-489. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024152
- Kessler, T., Wolf, B., Eriksson, N., Kofink, D., Mahmoodi, B. K., Rai, H., . . . Schunkert, H. (2019). Association of the coronary artery disease risk gene GUCY1A3 with ischaemic events after coronary intervention. *Cardiovasc Res*, 115(10), 1512-1518. doi:10.1093/cvr/cvz015
- Kimura, H., & Murad, F. (1974). Evidence for two different forms of guanylate cyclase in rat heart. *J Biol Chem*, 249(21), 6910-6916. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4153733>
- Klein, L., & Gheorghade, M. (2004). Coronary artery disease and prevention of heart failure. *Med Clin North Am*, 88(5), 1209-1235. doi:10.1016/j.mcna.2004.03.002
- Koglin, M., Vehse, K., Budaus, L., Scholz, H., & Behrends, S. (2001). Nitric oxide activates the beta 2 subunit of soluble guanylyl cyclase in the absence of a second subunit. *J Biol Chem*, 276(33), 30737-30743. doi:10.1074/jbc.M102549200

- Lacoste, L., Lam, J. Y., Hung, J., Letchacovski, G., Solymoss, C. B., & Waters, D. (1995). Hyperlipidemia and coronary disease. Correction of the increased thrombogenic potential with cholesterol reduction. *Circulation*, *92*(11), 3172-3177. doi:10.1161/01.cir.92.11.3172
- Lamas, S., Marsden, P. A., Li, G. K., Tempst, P., & Michel, T. (1992). Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *89*(14), 6348-6352. doi:10.1073/pnas.89.14.6348
- Langer, H. F., Daub, K., Braun, G., Schonberger, T., May, A. E., Schaller, M., . . . Gawaz, M. (2007). Platelets recruit human dendritic cells via Mac-1/JAM-C interaction and modulate dendritic cell function in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *27*(6), 1463-1470. doi:10.1161/ATVBAHA.107.141515
- Leitner, A., Joachimiak, L. A., Bracher, A., Monkemeyer, L., Walzthoeni, T., Chen, B., . . . Frydman, J. (2012). The molecular architecture of the eukaryotic chaperonin TRiC/CCT. *Structure*, *20*(5), 814-825. doi:10.1016/j.str.2012.03.007
- Levy, D., Ehret, G. B., Rice, K., Verwoert, G. C., Launer, L. J., Dehghan, A., . . . van Duijn, C. M. (2009). Genome-wide association study of blood pressure and hypertension. *Nat Genet*, *41*(6), 677-687. doi:10.1038/ng.384
- Libby, P., Ridker, P. M., & Hansson, G. K. (2011). Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*, *473*(7347), 317-325. doi:10.1038/nature10146
- Libby, P., Ridker, P. M., & Maseri, A. (2002). Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, *105*(9), 1135-1143. doi:10.1161/hc0902.104353
- Libby, P., & Theroux, P. (2005). Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation*, *111*(25), 3481-3488. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.537878
- Lievens, D., Zerneck, A., Seijkens, T., Soehnlein, O., Beckers, L., Munnix, I. C., . . . Lutgens, E. (2010). Platelet CD40L mediates thrombotic and inflammatory processes in atherosclerosis. *Blood*, *116*(20), 4317-4327. doi:10.1182/blood-2010-01-261206
- Lincoln, T. M. (2007). Myosin phosphatase regulatory pathways: different functions or redundant functions? *Circ Res*, *100*(1), 10-12. doi:10.1161/01.RES.0000255894.25293.82
- Lindemann, S., Tolley, N. D., Dixon, D. A., McIntyre, T. M., Prescott, S. M., Zimmerman, G. A., & Weyrich, A. S. (2001). Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. *J Cell Biol*, *154*(3), 485-490. doi:10.1083/jcb.200105058
- Lloyd-Jones, D. M., Nam, B. H., D'Agostino, R. B., Sr., Levy, D., Murabito, J. M., Wang, T. J., . . . O'Donnell, C. J. (2004). Parental cardiovascular disease as a risk factor for cardiovascular disease in middle-aged adults: a prospective study of parents and offspring. *JAMA*, *291*(18), 2204-2211. doi:10.1001/jama.291.18.2204
- Luo, C., Gangadharan, V., Bali, K. K., Xie, R. G., Agarwal, N., Kurejova, M., . . . Kuner, R. (2012). Presynaptically localized cyclic GMP-dependent protein kinase 1 is a key determinant of spinal synaptic potentiation and pain hypersensitivity. *PLoS Biol*, *10*(3), e1001283. doi:10.1371/journal.pbio.1001283
- Lusis, A. J. (2000). Atherosclerosis. *Nature*, *407*(6801), 233-241. doi:10.1038/35025203

- Ma, H., Hara, A., Xiao, C. Y., Okada, Y., Takahata, O., Nakaya, K., . . . Ushikubi, F. (2001). Increased bleeding tendency and decreased susceptibility to thromboembolism in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP(3). *Circulation*, *104*(10), 1176-1180. doi:10.1161/hc3601.094003
- Marenberg, M. E., Risch, N., Berkman, L. F., Floderus, B., & de Faire, U. (1994). Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins. *N Engl J Med*, *330*(15), 1041-1046. doi:10.1056/NEJM199404143301503
- Matsumoto, H., Naraba, H., Murakami, M., Kudo, I., Yamaki, K., Ueno, A., & Oh-ishi, S. (1997). Concordant induction of prostaglandin E2 synthase with cyclooxygenase-2 leads to preferred production of prostaglandin E2 over thromboxane and prostaglandin D2 in lipopolysaccharide-stimulated rat peritoneal macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, *230*(1), 110-114. doi:10.1006/bbrc.1996.5894
- Mattila, J. T., & Thomas, A. C. (2014). Nitric oxide synthase: non-canonical expression patterns. *Front Immunol*, *5*, 478. doi:10.3389/fimmu.2014.00478
- Mayer, B., Erdmann, J., & Schunkert, H. (2007). Genetics and heritability of coronary artery disease and myocardial infarction. *Clin Res Cardiol*, *96*(1), 1-7. doi:10.1007/s00392-006-0447-y
- Mergia, E., Friebe, A., Dangel, O., Russwurm, M., & Koesling, D. (2006). Spare guanylyl cyclase NO receptors ensure high NO sensitivity in the vascular system. *J Clin Invest*, *116*(6), 1731-1737. doi:10.1172/JCI27657
- Musunuru, K., Strong, A., Frank-Kamenetsky, M., Lee, N. E., Ahfeldt, T., Sachs, K. V., . . . Rader, D. J. (2010). From noncoding variant to phenotype via SORT1 at the 1p13 cholesterol locus. *Nature*, *466*(7307), 714-719. doi:10.1038/nature09266
- Nakahata, N. (2008). Thromboxane A2: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacol Ther*, *118*(1), 18-35. doi:10.1016/j.pharmthera.2008.01.001
- Narumiya, S., Sugimoto, Y., & Ushikubi, F. (1999). Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev*, *79*(4), 1193-1226. doi:10.1152/physrev.1999.79.4.1193
- Needleman, P., Turk, J., Jakschik, B. A., Morrison, A. R., & Lefkowitz, J. B. (1986). Arachidonic acid metabolism. *Annu Rev Biochem*, *55*, 69-102. doi:10.1146/annurev.bi.55.070186.000441
- Newton-Cheh, C., Johnson, T., Gateva, V., Tobin, M. D., Bochud, M., Coin, L., . . . Munroe, P. B. (2009). Genome-wide association study identifies eight loci associated with blood pressure. *Nat Genet*, *41*(6), 666-676. doi:10.1038/ng.361
- Nikpay, M., Goel, A., Won, H. H., Hall, L. M., Willenborg, C., Kanoni, S., . . . Farrall, M. (2015). A comprehensive 1,000 Genomes-based genome-wide association meta-analysis of coronary artery disease. *Nat Genet*, *47*(10), 1121-1130. doi:10.1038/ng.3396
- O'Connell, M. K., Murthy, S., Phan, S., Xu, C., Buchanan, J., Spilker, R., . . . Taylor, C. A. (2008). The three-dimensional micro- and nanostructure of the aortic medial lamellar unit measured using 3D confocal and electron microscopy imaging. *Matrix Biol*, *27*(3), 171-181. doi:10.1016/j.matbio.2007.10.008

- Palmer, R. M., Ferrige, A. G., & Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, *327*(6122), 524-526. doi:10.1038/327524a0
- Palmer, R. M., Rees, D. D., Ashton, D. S., & Moncada, S. (1988). L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun*, *153*(3), 1251-1256. doi:10.1016/s0006-291x(88)81362-7
- Patrono, C. (2015). The Multifaceted Clinical Readouts of Platelet Inhibition by Low-Dose Aspirin. *J Am Coll Cardiol*, *66*(1), 74-85. doi:10.1016/j.jacc.2015.05.012
- Peden, J. F., & Farrall, M. (2011). Thirty-five common variants for coronary artery disease: the fruits of much collaborative labour. *Hum Mol Genet*, *20*(R2), R198-205. doi:10.1093/hmg/ddr384
- Reilly, M. P., Li, M., He, J., Ferguson, J. F., Stylianou, I. M., Mehta, N. N., . . . Rader, D. J. (2011). Identification of ADAMTS7 as a novel locus for coronary atherosclerosis and association of ABO with myocardial infarction in the presence of coronary atherosclerosis: two genome-wide association studies. *Lancet*, *377*(9763), 383-392. doi:10.1016/S0140-6736(10)61996-4
- Rhodin, J. A. (1962). Fine structure of vascular walls in mammals with special reference to smooth muscle component. *Physiol Rev Suppl*, *5*, 48-87. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14491796>
- Ridker, P. M., Cook, N. R., Lee, I. M., Gordon, D., Gaziano, J. M., Manson, J. E., . . . Buring, J. E. (2005). A randomized trial of low-dose aspirin in the primary prevention of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med*, *352*(13), 1293-1304. doi:10.1056/NEJMoa050613
- Roberts, W. C. (1972). Coronary arteries in fatal acute myocardial infarction. *Circulation*, *45*(1), 215-230. doi:10.1161/01.cir.45.1.215
- Ross, R. (1999). Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J*, *138*(5 Pt 2), S419-420. doi:10.1016/s0002-8703(99)70266-8
- Russwurm, M., Behrends, S., Harteneck, C., & Koesling, D. (1998). Functional properties of a naturally occurring isoform of soluble guanylyl cyclase. *Biochem J*, *335* ( Pt 1), 125-130. doi:10.1042/bj3350125
- Russwurm, M., Wittau, N., & Koesling, D. (2001). Guanylyl cyclase/PSD-95 interaction: targeting of the nitric oxide-sensitive alpha2beta1 guanylyl cyclase to synaptic membranes. *J Biol Chem*, *276*(48), 44647-44652. doi:10.1074/jbc.M105587200
- Salvi, E., Kuznetsova, T., Thijs, L., Lupoli, S., Stolarz-Skrzypek, K., D'Avila, F., . . . Staessen, J. A. (2013). Target sequencing, cell experiments, and a population study establish endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene as hypertension susceptibility gene. *Hypertension*, *62*(5), 844-852. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01428
- Samani, N. J., Erdmann, J., Hall, A. S., Hengstenberg, C., Mangino, M., Mayer, B., . . . the Cardiogenics, C. (2007). Genomewide association analysis of coronary artery disease. *N Engl J Med*, *357*(5), 443-453. doi:10.1056/NEJMoa072366
- Schlossmann, J., Ammendola, A., Ashman, K., Zong, X., Huber, A., Neubauer, G., . . . Ruth, P. (2000). Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase Ibeta. *Nature*, *404*(6774), 197-201. doi:10.1038/35004606

- Schober, A., Bernhagen, J., Thiele, M., Zeiffer, U., Knarren, S., Roller, M., . . . Weber, C. (2004). Stabilization of atherosclerotic plaques by blockade of macrophage migration inhibitory factor after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, *109*(3), 380-385. doi:10.1161/01.CIR.0000109201.72441.09
- Schorr, K. (1997). Aspirin and platelets: the antiplatelet action of aspirin and its role in thrombosis treatment and prophylaxis. *Semin Thromb Hemost*, *23*(4), 349-356. doi:10.1055/s-2007-996108
- Schunkert, H., Konig, I. R., Kathiresan, S., Reilly, M. P., Assimes, T. L., Holm, H., . . . Samani, N. J. (2011). Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease. *Nat Genet*, *43*(4), 333-338. doi:10.1038/ng.784
- Semple, J. W., Italiano, J. E., Jr., & Freedman, J. (2011). Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol*, *11*(4), 264-274. doi:10.1038/nri2956
- Signorello, M. G., Segantin, A., & Leoncini, G. (2009). The arachidonic acid effect on platelet nitric oxide level. *Biochim Biophys Acta*, *1791*(11), 1084-1092. doi:10.1016/j.bbali.2009.07.003
- Sinitski, D., Kontos, C., Krammer, C., Asare, Y., Kapurniotu, A., & Bernhagen, J. (2019). Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF)-Based Therapeutic Concepts in Atherosclerosis and Inflammation. *Thromb Haemost*, *119*(4), 553-566. doi:10.1055/s-0039-1677803
- Smith, J. B., & Willis, A. L. (1970). Formation and release of prostaglandins by platelets in response to thrombin. *Br J Pharmacol*, *40*(3), 545P-546P. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5497809>
- Smolenski, A. (2012). Novel roles of cAMP/cGMP-dependent signaling in platelets. *J Thromb Haemost*, *10*(2), 167-176. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04576.x
- Smolenski, A., Bachmann, C., Reinhard, K., Honig-Liedl, P., Jarchau, T., Hoschuetzky, H., & Walter, U. (1998). Analysis and regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation in vitro and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody. *J Biol Chem*, *273*(32), 20029-20035. doi:10.1074/jbc.273.32.20029
- Smyth, S. S., McEver, R. P., Weyrich, A. S., Morrell, C. N., Hoffman, M. R., Arepally, G. M., . . . Platelet Colloquium, P. (2009). Platelet functions beyond hemostasis. *J Thromb Haemost*, *7*(11), 1759-1766. doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03586.x
- Sonnweber, T., Pizzini, A., Nairz, M., Weiss, G., & Tancevski, I. (2018). Arachidonic Acid Metabolites in Cardiovascular and Metabolic Diseases. *Int J Mol Sci*, *19*(11). doi:10.3390/ijms19113285
- Steering Committee of the Physicians' Health Study Research, G. (1989). Final report on the aspirin component of the ongoing Physicians' Health Study. *N Engl J Med*, *321*(3), 129-135. doi:10.1056/NEJM198907203210301
- Stone, J. R., & Marletta, M. A. (1996). Spectral and kinetic studies on the activation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide. *Biochemistry*, *35*(4), 1093-1099. doi:10.1021/bi9519718
- Stouffer, G. A., & Runge, M. S. (1998). The role of secondary growth factor production in thrombin-induced proliferation of vascular smooth muscle cells. *Semin Thromb Hemost*, *24*(2), 145-150. doi:10.1055/s-2007-995833

- Tabas, I., Williams, K. J., & Boren, J. (2007). Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation*, *116*(16), 1832-1844. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.676890
- Thomas, D. W., Mannon, R. B., Mannon, P. J., Latour, A., Oliver, J. A., Hoffman, M., . . . Coffman, T. M. (1998). Coagulation defects and altered hemodynamic responses in mice lacking receptors for thromboxane A<sub>2</sub>. *J Clin Invest*, *102*(11), 1994-2001. doi:10.1172/JCI51116
- Toschi, V., Gallo, R., Lettino, M., Fallon, J. T., Gertz, S. D., Fernandez-Ortiz, A., . . . Badimon, J. J. (1997). Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation*, *95*(3), 594-599. doi:10.1161/01.cir.95.3.594
- Townsend, N., Wilson, L., Bhatnagar, P., Wickramasinghe, K., Rayner, M., & Nichols, M. (2016). Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016. *Eur Heart J*, *37*(42), 3232-3245. doi:10.1093/eurheartj/ehw334
- Ursell, P. C., & Mayes, M. (1993). The majority of nitric oxide synthase in pig heart is vascular and not neural. *Cardiovasc Res*, *27*(11), 1920-1924. doi:10.1093/cvr/27.11.1920
- Waldman, S. A., & Murad, F. (1987). Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol Rev*, *39*(3), 163-196. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2827195>, <https://pharmrev.aspetjournals.org/content/39/3/163.long>
- Warner, T. D., Mitchell, J. A., Sheng, H., & Murad, F. (1994). Effects of cyclic GMP on smooth muscle relaxation. *Adv Pharmacol*, *26*, 171-194. doi:10.1016/s1054-3589(08)60054-x
- Weber, C., Schober, A., & Zernecke, A. (2004). Chemokines: key regulators of mononuclear cell recruitment in atherosclerotic vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *24*(11), 1997-2008. doi:10.1161/01.ATV.0000142812.03840.6f
- Wilcox, J. N., Smith, K. M., Schwartz, S. M., & Gordon, D. (1989). Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *86*(8), 2839-2843. doi:10.1073/pnas.86.8.2839
- Wobst, J., Kessler, T., Dang, T. A., Erdmann, J., & Schunkert, H. (2015). Role of sGC-dependent NO signalling and myocardial infarction risk. *J Mol Med (Berl)*, *93*(4), 383-394. doi:10.1007/s00109-015-1265-3
- Wobst, J., Rumpf, P. M., Dang, T. A., Segura-Puimedon, M., Erdmann, J., & Schunkert, H. (2015). Molecular variants of soluble guanylyl cyclase affecting cardiovascular risk. *Circ J*, *79*(3), 463-469. doi:10.1253/circj.CJ-15-0025
- World Health Organization. (2020, 2020, December 9). The top 10 causes of death. Retrieved from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
- Yusuf, S., Hawken, S., Ounpuu, S., Dans, T., Avezum, A., Lanas, F., . . . Investigators, I. S. (2004). Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*, *364*(9438), 937-952. doi:10.1016/S0140-6736(04)17018-9
- Zabel, U., Hausler, C., Weeger, M., & Schmidt, H. H. (1999). Homodimerization of soluble guanylyl cyclase subunits. Dimerization analysis using a glutathione s-transferase affinity tag. *J Biol Chem*, *274*(26), 18149-18152. doi:10.1074/jbc.274.26.18149



- Zabel, U., Weeger, M., La, M., & Schmidt, H. H. (1998). Human soluble guanylate cyclase: functional expression and revised isoenzyme family. *Biochem J*, 335 ( Pt 1), 51-57. doi:10.1042/bj3350051
- Zdravkovic, S., Wienke, A., Pedersen, N. L., & de Faire, U. (2007). Genetic influences on angina pectoris and its impact on coronary heart disease. *Eur J Hum Genet*, 15(8), 872-877. doi:10.1038/sj.ejhg.5201846
- Zernecke, A., Bernhagen, J., & Weber, C. (2008). Macrophage migration inhibitory factor in cardiovascular disease. *Circulation*, 117(12), 1594-1602. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.729125
- Zoumi, A., Lu, X., Kassab, G. S., & Tromberg, B. J. (2004). Imaging coronary artery microstructure using second-harmonic and two-photon fluorescence microscopy. *Biophys J*, 87(4), 2778-2786. doi:10.1529/biophysj.104.042887

# Anhang

## Veröffentlichungen

### *Publikationen*

Mauersberger C, Sager HB, Wobst J, Dang TA, **Lambrecht L**, Koplev S, Stroth M, Bettaga N, Schlossmann J, Friebe A, Björkegren JLM, Dietz L, Sandner P, Soehnlein O, Schunkert H, Kessler T. Loss of soluble guanylyl cyclase in platelets contributes to atherosclerotic plaque formation and vascular inflammation. *Nat Cardiovasc Res* 2022, epub ahead of print.

### *Vorträge*

**Lambrecht L**, Wobst J, Wolf B, Schunkert H, Kessler T. Platelet inhibition in carriers of the *GUCY1A1* coronary artery disease risk allele. Hot Topics in Signal Transduction & cGMP Research, DFG FOR 2060 Research Unit, Tübingen, 8. – 10. Oktober 2018, selected for highlight session.

### *Posterbeiträge*

1. **Lambrecht L**, Wobst J, Wolf B, Schunkert H, Kessler T. Platelet inhibition in carriers of the *GUCY1A1* coronary artery disease risk allele. Hot Topics in Signal Transduction & cGMP Research, DFG FOR 2060 Research Unit, Tübingen, 8. – 10. Oktober 2018.
2. **Lambrecht L**, Wobst J, Wolf B, Schunkert H, Kessler T. Platelet inhibition in carriers of the *GUCY1A1* coronary artery disease risk allele. 87<sup>th</sup> European Atherosclerosis Society Congress (EAS), Maastricht, Netherlands, 26. – 29. Mai 2019.

## Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Heribert Schunkert für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe der experimentellen Erwachsenenkardiologie des Deutschen Herzzentrum zu absolvieren.

Darüber hinaus danke ich meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Thorsten Kessler für seine Unterstützung während meiner gesamten Doktorarbeit. Danke für die Geduld, die vielen Antworten und Erklärungen sowie das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ich danke meiner gesamten Arbeitsgruppe am DHM, namentlich Herrn Dr. Bernhard Wolf und Frau Dr. Jana Wobst für die fachliche Unterstützung sowie Frau Ulrike Weiss und Herrn Wolfgang Latz für die Unterstützung bei der Verarbeitung meiner Proben.

Zudem danke ich meinen Freunden für die schönen gemeinsamen Jahre im Medizinstudium und hoffentlich noch sehr lange darüber hinaus, im Besonderen Dorine, Celina und Claudia.

Zu guter Letzt geht mein größter Dank an meine Eltern, Karin und Andreas, meinen Bruder Sebastian und meinen Freund Paul. Ich danke euch für die durchgehende Unterstützung und den Rückhalt während meines gesamten Studiums und der Promotion. Dank euch kann ich meine Ziele verfolgen und meinen Weg finden.