I. MEDIZINISCHE KLINIK UND POLIKLINIK DER TECHNISCHEN UNIVERSITÄT MÜNCHEN
KLINIKUM RECHTS DER ISAR
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Albert Schömig)

Die thrombozytären Polymorphismen HPA-1, -2, -3, -5 und der Fibrinogenpolymorphismus Bß448 – Zusammenhänge mit der subakuten Stentthrombose?

Holger Seidl

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation
1. Univ.-Prof. A. Kastrati
2. apl. Prof. Dr. M. P. Gawaz

Die Dissertation wurde am 24.7.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 8.5.2002 angenommen.

Gliederung

1. Einführung 1

1.1 Stentthrombose: Entstehung und Hintergrund 1

1.1.1 Koronare Herzerkrankung und Stenting 1

1.1.2 Stenting und Stentthrombose 3

1.1.3 Stentthrombose und Ansätze zur Prävention 4

1.2 Grundlagen der Thrombozytenfunktion 6

1.2.1 Physiologie und Pathophysiologie der Thrombozyten 6

1.2.2 Thrombozytenrezeptoren 8

1.2.3 Polymorphismen und ihre Bedeutung 13

2. Fragestellungen 15

3. Methodik 16

3.1 Studienkonzept und Populationsplanung 16

3.1.1 Die Kontrollgruppe 17

3.1.2 Die Vergleichsgruppe 17

3.1.3 Die Studiengruppe mit subakuter Stentthrombose 18

3.2 Klinisches Vorgehen und Datenerhebung 20

3.2.1 Anamnese und Basisuntersuchungen 20

3.2.2 Angiografische Daten 20

3.2.3 Stentimplantation 21

3.3 Experimente 23

3.3.1 Probenentnahme 23

3.3.2 DNA-Isolation und Reinigung 23

3.3.3 PCR-Reaktion 24

3.3.4 Restriktionsverdau 27

3.3.5 Gelelektrophorese 29

3.3.6 Auswertung 32

3.3.7 Optimierung 32

3.3.8 Qualitätssicherung 34

3.3.8 Statistik und Datenverarbeitung 36

4. Ergebnisse 38

4.1. Patientencharakteristika 38

4.1.2 Prozedurale Charakteristika 39

4.1.3 Experimentelle Ergebnisse 40

4.2 Statistische Auswertung der Gendaten 42

4.3 Überblick über den Ergebnisteil 45

5. Diskussion 47

5.1 Pathophysiologische Überlegungen 47

5.1.1 Lage des polymorphen Locus 47

5.1.2 Bedeutung von Punktmutationen 49

5.1.3 Bedeutung heterozygoter Träger 50

5.2 Studienkonzept 53

5.3 Statistische Analyse 55

5.4 Die Studienpopulation 56

5.5 Vergleich mit anderen Studien 57

6. Zusammenfassung 60

7. Danksagungen 62

8. Lebenslauf 63

9. Anhang 64

9.1 Abkürzungsverzeichnis 64

9.2 Abbildungsverzeichnis 66

9.3 Tabellenverzeichnis 67

9.4 Literaturverzeichnis 68

1. Einführung

Die koronare Herzerkrankung, ihre Therapie – und deren Komplikationen – nehmen heute einen wichtigen Stellenwert in der Medizin ein. Eine bedrohliche Komplikation ist die subakute Stentthrombose in Folge des Einbringens eines Koronarstents.
Diese Arbeit will einen Beitrag zur Suche nach prädisponierenden Faktoren für die subakute Stentthrombose und deren Analyse liefern. Der Ansatzpunkt ist hierbei die Frage nach der Rolle genetischer Varianten von Thrombozytenoberflächenrezeptoren.

Im Folgenden wird anhand des klinischen (Kap. 1.1) Hintergrundes und zellulär/molekularer Grundlagen der Thrombozytenfunktion (Kap. 1.2) in die Zielsetzung und Relevanz dieser Arbeit eingeführt.

1.1 Stentthrombose: Entstehung und Hintergrund

1.1.1 Koronare Herzerkrankung und Stenting

In unserer westlichen Industriegesellschaft mit allen Vor- und Nachteilen der hohen und steigenden Lebenserwartung rückt der Stellenwert der degenerativen Erkrankungen immer mehr in den Vordergrund. Die Vielzahl der gesellschaftlich akzeptierten und geförderten kardiovaskulären Risikofaktoren hier gerade dem überproportionalen Altern des Herzkreislaufsystems an Brisanz verliehen: Schon längst hat sich diese Gruppe von Erkrankungen mit Abstand den ersten Platz in der Todesursachenstatistik erobert (siehe Abbildung 2). Besonders der Begriff der koronaren Herzerkrankung ist mittlerweile auch dem Laien geläufig – über 200 Deutsche pro 100.000 Einwohner der BRD sterben jährlich an deren ischämischen Folgen, wobei die Zahl an Sterbefällen in der Nachkriegsgesellschaft rapide zunahm und sich seit einigen Jahren auf einem hohen Niveau hält (siehe Abbildung 1) .

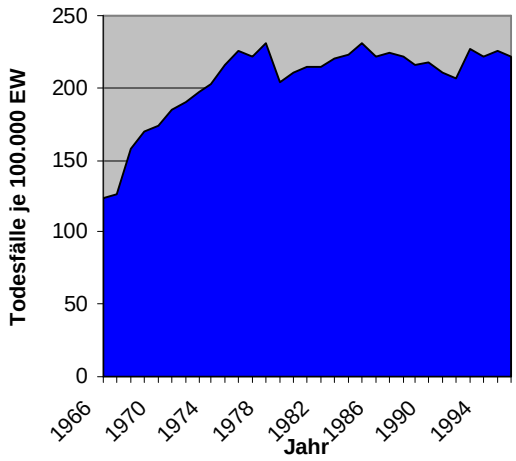


Abbildung 1: Todesfälle durch ischämische Herzerkrankungen (ICD/9 410-414) in der BRD (nach StBA, FS 12, R4, 1996)

Aus dieser epidemiologischen Priorität heraus war dieser Bereich der Humanmedizin eine Disziplin der intensiven Forschung und auch rapider Veränderungen. Antikoagulatorische Medikation, Lysetherapie, koronar-arterio-venöser Bypass und seit 1977 die Technik der perkutanen, transluminalen Koronarangioplastie [9] (PTCA) einschnei-

dende Fortschritte gebracht und der koronaren Herzerkrankung viel vom Charakter der unbeeinflußbaren Todesursache genommen.

Die PTCA war bald als Weiche für die Zukunft erkannt, da auf diese Weise nicht nur die Darstellung der Koronararterien, sondern auch eine Manipulation kurativen Ansatzes möglich war.[82,131] Die Expansion eines vor Ort positionierten Ballons zur Erweiterung eines pathologisch verengten Koronargefäßabschnitts hat in diesem Sinne die Kardiologie revolutioniert und den Weg zum neuen Sektor der interventionellen Kardiologie eröffnet.

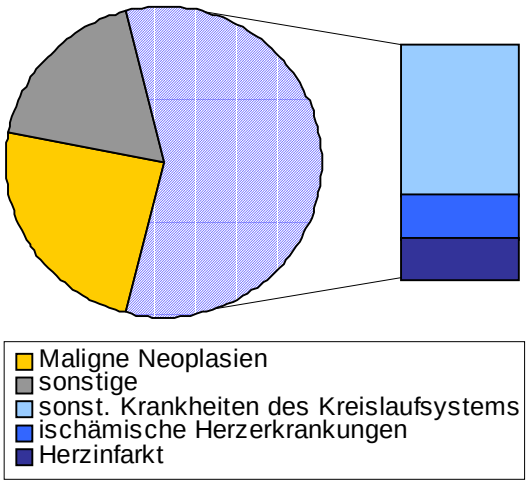


Abbildung 2: Todesursachenstatistik in der BRD 1996 (nach StBA, FS 12, R4, 1996)

Erste Rückblicke auf Studienzahlen von einigen hundert Patienten mit durchgeführter Ballonangioplastie Mitte der 80er Jahre gaben Anlaß zum Optimismus: 90% der Prozeduren wurden primär als erfolgreich gewertet.[10] Einen Schatten auf die neue Technologie warfen Risiken im Prozentbereich für akut okkludierende Komplikationen, v.a. Intima-Dissektionen,[131] und Restenoseraten im ersten halben Jahr von bis zu 40%.[61,83]

Einschneidende Verbesserungen schienen erst Ende der 80er Jahre in Sicht: Tierexperimentelle Resultate mit intrakoronaren Gefäßstützen von Schatz und Palmaz et al. stimmten zuversichtlich,[137] diese Stenttechnologie auch auf den Menschen zu übertragen. Tatsächlich konnten erste Studien mit ballon- und selbstexpandierbaren Stents der Hoffnung auf ein neues Konzept zur Bewältigung der Restenose- und Dissektionsproblematik neuen Nährboden verschaffen.[30,150,151] Unter dieser Perspektive begann eine Welle von neuen Untersuchungen, neue Stents wurden evaluiert und brachten neue Zahlen, die Anhalt für eine deutliche Reduzierung der Restenoserate boten.[28,29,52,138]

Heute können wir auf eine Vielzahl von großen klinischen Studien zurückblicken, die die frühen Berichte mit statistischem Material belegen.[34,136,140,143,153] Restenoseraten im Bereich von nur 20-30% bei follow-up konnten verzeichnet werden. Dabei hielt das Stenting als neue Erweiterung der PTCA auch dem statistischen Vergleich zur konservativen Ballonangioplastie stand und kann derzeit als anerkannte Therapie von akutem Verschluß und Restenose nach PTCA gelten.[34,136,143,159]

1.1.2 Stenting und Stentthrombose

Trotz aller Euphorie wurden schon die ersten klinischen Berichte von einer lebensbedrohlichen Komplikation überschattet: Gehäuft war eine Thrombose im Bereich des gestenteten Areals in engem zeitlichen Zusammenhang zur Stentimplantation beobachtet worden.[28,29,59,145,151] Dabei war die Thrombogenität der Gefäßstütze aus Metall keineswegs neu und unerwartet: Schon das Tierexperiment hatte den Stent als thrombogen ausgewiesen.[93,113]

Abbildung 3: Angiographische Darstellung einer Stentthrombose.

Die beiden Abbildungen zeigen koronarangiographische Aufnahmen des Ramus interventricularis posterior im Rahmen einer PTCA. In dieser „positiv"-Darstellung sind die kontrastmittelgefüllten Gefäße dunkel.

Links: Aufnahme nach der Primärversorgung des Patienten. Es wurde ein Stent gesetzt, der jedoch wegen der Kontrastmittelüberlagerung nicht zu sehen ist. Das Gefäß ist nun gut durchgängig.

Rechts: Zehn Tage später fand eine Rekoronarangiographie bei spontan eingetretenem Angina Pectoris Beschwerdebild statt. In der ähnlich eingestellten Aufnahme sieht man den abrupten Kontrastmittelabbruch. Angedeutet kann man nun fein die Struktur der metallenen Gefäßstütze unmittelbar distal des Abbruches erkennen. Es handelt sich folglich um eine vollständige Thrombosierung des gestenten Areals*: die subakute Stentthrombose*.

In den eingeblendeten EKGs lassen sich deutlich die ischämischen Veränderungen durch die Okklusion ausmachen. In diesem Fall konnten bleibende Folgeschäden aber durch eine sofortige Reintervention verhindert werden.

In Abbildung 3 sind die koronarangiografischen Aufnahmen nach einer gelungenen Intervention im Vergleich zu einer eingetretenen Thrombosierung zu sehen.
Zwar pendelten sich eingangs hohe Stentthrombose-Raten von über 6% [140] mit neuen technischen und medikamentösen Fortschritten heute auf einem deutlich niedrigeren Niveau ein. An unserer Klinik lag die Inzidenz in einer über 3600 Patienten umfassenden Studie beispielsweise bei 2,2%.[66] Dennoch ist trotz sofortiger Behandlung durch rePTCA, Bypassoperation oder Lyse die *Stentthrombose* mit relativ hoher Mortalität behaftet und stellt damit unverändert das *Hauptmanko des Stenting* dar.
Unglücklicherweise hat sich kürzlich auch herausgestellt, dass die Problematik der Stentthrombose nicht mit dem Management der Akutsituation als bewältigt gelten darf. Kastrati et al zeigten in einer großen Studie mit 12 monatiger Nachbeobachtung

auf hohem statistischen Niveau, dass auch das *langfristige Outcome* dieser Patienten wesentlich *verschlechtert* ist: Eine Einjahres-Überlebensrate von 80% mit gegenüber 97% ohne Stentthrombose und eine Myokardinfarktrate von 62% gegenüber 4% sprechen für sich.[66]

1.1.3 Stentthrombose und Ansätze zur Prävention

Angesichts der immanenten Gefahr der subakuten Thrombose bei der mittlerweile zum kardiologischen Alltag gewordenen Prozedur des Stenting sind Strategien zur Prävention heute ein Thema hoher Priorität.
Schon im Rahmen der ersten Versuche mit Stents wurde die an sich naheliegende Medikation mit antikoagulatorischen Stoffen propagiert.[29] Dabei kamen vor allem Aspirin in Kombination mit Kumarinen, z.T. auch Dipyramidol zum Einsatz.[29] Während allerdings die protektive Wirksamkeit mit dieser Therapie nur sehr eingeschränkt war,[28,139] mußte zusätzlich eine erhöhte Blutungsgefahr in Kauf genommen werden.[139]

Von dieser unbefriedigenden Bewältigungsstrategie ausgehend sind derzeit zwei Ansätze aktuell:

Ein Teil der kardiologischen Forschung setzt den Schwerpunkt, getragen von der Leitfrage „who was thrombogenic – the stent or the doctor...“,[144] bei der Verbesserung der Implantationsprozedur. Diese Zielrichtung scheint dadurch bekräftigt, dass klinische Studien in großem Umfang, ungeachtet völligen Verzichts auf Antikoagulantien, eine Stentthrombose-Rate von nur 0,9% demonstrieren konnten: Colombo et al. hielten bei ausschließlicher Applikation von Thrombozytenaggregationshemmern vor allem den Einsatz des intravaskulären Ultraschalls (IVUS) zur Feinabstimmung der Stentpositionierung und eine finale Hochdruckexpansion des Stents für ausschlaggebend.[21]

Andere Überlegungen zielen mehr auf die Optimierung des pharmakologischen Management ab. Hier gaben neue experimentelle Grundlagen der Thrombozytenforschung unter dem Motto „the attention shifts to the white clot“[105] der Aggregation der Blutplättchen erhöhte Beachtung.
Von vieler Seite wurde die zentrale Rolle des Thrombozyten bei der arteriellen Thrombose herausgestellt.[39,53,105,119,157,171] Gawaz et al. konnten unter durchflußzytometrischer Analyse von Oberflächenrezeptoren (siehe unten) darstellen, dass bei der Stentimplantation unter konventioneller Antikoagulationstherapie eine starke Aktivierung von Thrombozyten stattfindet. Wurden dagegen neue Thrombozytenaggregationshemmer eingesetzt, so das neu eingeführte Tiklopidin, so war eine deutlich verringerte Aktivierung zu messen.[39]

Der Nachweis einer erhöhten Effektivität des neuen Regimen mit Tiklopidin und Aspirin gelang auch auf Basis der klinischen Anwendung. Die Rate kardialer Zwischenfälle und von Blutungskomplikationen wurden deutlich reduziert.[81,141]
Die logische Lücke zwischen Klinik und Grundlagen konnte kürzlich durch Arbeiten in unserem Haus geschlossen werden, die den Zusammenhang der Oberflächendichte der medikamentös beeinflußbaren Thrombozytenrezeptoren mit dem Auftreten der Stentthrombose aufzeigen.[38,107]

Die Frage, ob der technisch-prozeduralen oder der pharmakologischen Entwicklung mehr Aufmerksamkeit geschenkt werden sollte,[2,21,104] ist in Anbetracht der Erfolge beiderseits wohl nicht mit einem „entweder-oder", sondern „sowohl-als-auch" zu beantworten: Beide Ansätze scheinen sich zu einem optimierten Therapiekonzept zusammenzufügen. *Trotz alledem kann auf diesem status quo von einer Lösung der Stentthromboseproblematik klar noch nicht gesprochen werden.*[1]

Das große Resumee dieser Erkenntnis ist offensichtlich: Wichtig ist, Risikofaktoren der Stentthrombose zu erkennen, deren Erfassung zu klinischen Routine werden zu lassen und damit frühzeitig und gezielt reagieren zu können. Viele klinische und prozedurale Faktoren sind in multivariaten Analysen bereits fokusiert und evaluiert worden (siehe Tab. 1).

Tab. 1: Angiografische Prädiktoren der subakuten Stentthrombose.

Reduzierte LV-Funktion	66,101
Verbleibende Dissektionen	55,66,85,101
Mehrere Stents implantiert	66,101
Überlappende Stents	66
Kleiner Stentdurchmesser	55,85
Einsatz verschiedener Stents	101
Suboptimaler Lumengewinn	85,101
Komplexe Läsionen	55
Instabile Angina pectoris	55,106
Wandunregelmäßigkeiten distal d. Stents	55

Die große Frage nach einer Prädisposition von Seiten der molekularen Eigenschaften der Thrombozyten steht aber weiter im Raum und gewinnt momentan rapide durch neue biochemische und genetische Erkenntnisse an Bedeutung.

Zur Abklärung dieser gewichtigen Fragestellung leistet diese Arbeit einen Beitrag. Auf der Ebene genetischer Aberrationen von Thrombozytenrezeptoren wurden Zusammenhänge zur Entwicklung einer Stentthrombose untersucht. Dabei waren fünf dieser sogenannten Polymorphismen auf gerinnungs- und adhäsionsrelevanten Oberflächenmolekülen einbezogen.

1.2 Grundlagen der Thrombozytenfunktion

Im vorigen Abschnitt wurde die immanente klinische Bedeutung der Stentthrombose und die zunehmende Tendenz, den Thrombozyten eine zentrale Rolle dabei zuzuordnen, dargelegt.
Aus diesem Grunde soll hier in kompakter Form das physiologisch-pathologische Funktionsspektrum der Blutplättchen erläutert werden (siehe 1.2.1). Auf Basis eines Überblicks über wichtige Rezeptoren (siehe 1.2.2) des Thrombozyten sollen die Hintergründe der Auswahl der fünf Polymorphismen (siehe 1.2.3) in der Studie erläutert werden.

1.2.1 Physiologie und Pathophysiologie der Thrombozyten

Bringt man die Reaktionsvarianten des Thrombozyten bei Aktivierung auf einen einfachen Nenner, so sind vier wichtige Aspekte zu unterscheiden:

- Adhäsion
- Formänderung
- Aggregation
- Sekretion

Diese stehen in einem sehr geregelten Funktionsablauf zueinander.[149]
Wird eine Reaktionskaskade durch eine Kontinuitätsunterbrechung der vasalen *Endothelschicht* ausgelöst, so ist die erste Reaktion die Adhäsion des Blutplättchen mittels Rezeptoren für subendotheliale Strukturen, z.B. von Willebrand-Faktor oder Kollagen.[8,42] Der Kontakt erfolgt dabei erst über einzelne Pseudopodien, dann über größere Membranareale.[84]
Die erste Reaktion bei Stimulation des zirkulierenden Thrombozyten „*in Lösung*“ ist die Formänderung. Stimuli dieser Art sind diverse physiologische Botenstoffe, so zum Beispiel ADP (Adenosindiphosphat), Endoperoxide oder Thromboxan A_2 (TxA_2), aber auch Fremdkörper wie Stentmaterial oder nichtionisches Kontrastmittel.[19] Der Thrombozyt ändert hierbei seine Form binnen ein bis zwei Sekunden [25] von diskoid zu einer gefalteten, sphärischen Form.[31]

Beide primären Reaktionsformen sind reversibel, werden aber dadurch bedeutungsschwer, dass man ihnen heute Übergangscharakter zuweist. Vor allem die initiale Formänderung scheint durch Konfiguration intrazellulärer Vesikel Vorstufe der Sekretion zu sein.[169] Die Faltelung und Ausbildung von Pseudopodien könnte im Zusammenhang mit einer folgenden *Aggregation* stehen.[96,170]

Gawaz et al. konnten auf Basis von Zellversuchen mit rekombinantem Fibrinogenrezeptor zeigen, dass für eine solche Aggregation lediglich diese Rezeptoren der Plättchen und ein Fibrinogenmolekül als Brückenglied nötig sind, also kein Gegenrezeptor vonnöten ist.[41]

Da eine Aggregation physiologisch nur unter ganz bestimmten kausalen Verhältnissen erfolgen darf, muss hier ein Regulationsmechanismus vorhanden sein. Tatsächlich liegt bei inaktivierten zirkulierenden Thrombozyten kaum aktivierter Fibrinogen-Rezeptor auf der Oberfläche vor, er muss partiell erst oberflächenexprimiert und aktiviert werden.[87,114] Als auslösende Stoffe dafür wurden ADP[7,56,87,102], Epinephrin [7,115,120], Thrombin[56,121], Endoperoxide[6,99], Arachidonsäure[27,54], Platelet activating Factor (PAF)[73,74], Kollagen[27,80] und von Willebrand Faktor (vWF)[24] beschrieben, die über ein komplexes Regelwerk aus Rezeptor, Transducer und intrazellulären Effektorwegen eingreifen.[149] Dieses System ist sehr wirkungsvoll – Versuche konnten eine sehr schnelle Exprimierung demonstrieren, der aktive Thrombozyt weißt dann ca. 40.000 Fibrinogen-Bindungsstellen auf.[7,88] Interessanterweise greift der Thrombozyt selbst durch Endoperoxid-,TxA_2- und ADP-Sekretion in das Regulationssystem ein. Er vermag also im Sinne einer positiven feedback-Schleife den eigenen und den Aktivierungsgrad benachbarter Blutplättchen hochzuregulieren.

Eine weitere wichtige Konsequenz der Aktivierung ist das Potential, an der Membranoberfläche Thrombin zu generieren und damit die *Koagulation* einzuleiten.

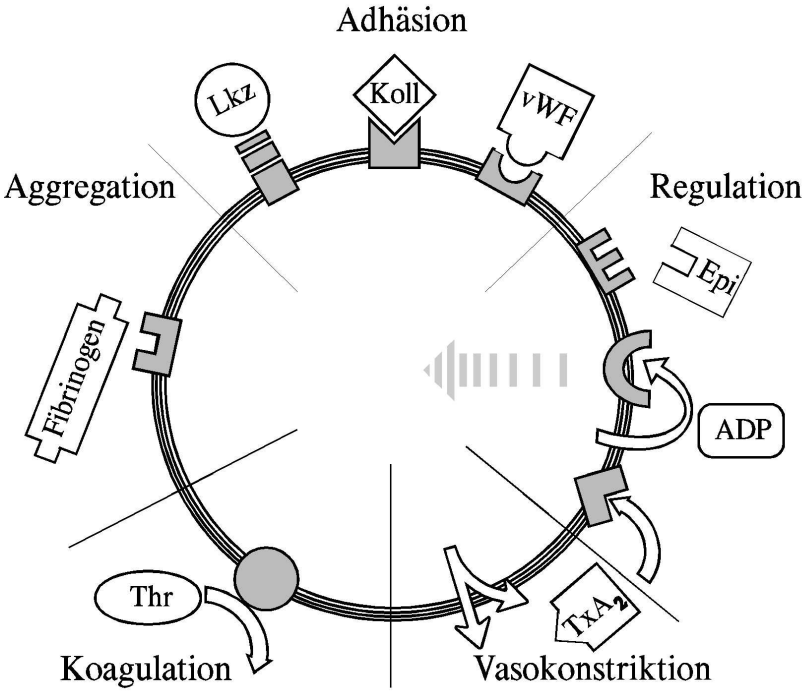


Abbildung 4: Vereinfachte und schematisierte Darstellung der funktionellen Grundsäulen des Thrombozyten.

Die Substanzen des regulatorischen Abschnittes bewirken ein Kaskade von Aktivierungsvorgängen im Thrombozyten (gerafter Pfeil).

Abkürzungen: Lkz Leukozyt, Koll Kollagen, vWF von Willebrand-Faktor, Epi Epinephrin, Thr Thrombin, ADP Adenosindiphosphat, TxA_2 Thromboxan A_2

Aus obigem ergibt sich der Stellenwert des Thrombozyten weitaus höher als der einer rein mechanisch-funktionellen Komponente: Durch Sekretion ist nicht nur eine Effektorfunktion, z.B. die Vasokonstriktion durch TxA_2, sondern auch eine wichtige Steue-

rungsrolle gegeben. Diese umfasst auch die Interaktion mit anderen zellulären Systemen, beispielsweise entsteht durch PDGF (platelet derived growth factor), endothelial growth factor und thrombocytal growth factor eine Wirkung auf die Gefäßwand,[58,128,129,142] chemotaktischer und mitogener Natur.[26,50] Die Expression von P-Selektin konnte schließlich als interaktive Größe zum inflammatorischen System identifiziert werden.[40]

Alle diese Funktionen stehen unter einer differenzierten Regulation durch eine Vielzahl von Rezeptoren, die in Abbildung 4 nochmals schematisch zusammengefasst sind. Da Alterationen von Thrombozytenrezeptoren Thema dieser Studie sind, wird im folgenden näher auf ausgewählte Rezeptoren in Struktur und Funktion eingegangen.

1.2.2 Thrombozytenrezeptoren

Alle nachfolgend beschriebenen Rezeptoren der Plättchenmembran sind sogenannte heterodimere Komplexe, d.h. sie setzen sich aus zwei Glykoproteinen in einem engen räumlichen Verbund zusammen. Auf den Blutplättchen sind circa 100 verschiedene solcher Glykoproteine bekannt.[108]
Die meisten Rezeptoren sind Integrine, besitzen also Domänen beiderseits der Membran. Ausnahme der unten beschriebenen hierfür ist nur der vWF-Rezeptor.[98]

Der Fibrinogen-Rezeptor:
Dieser Rezeptor setzt sich aus den Glykoproteinen IIb und IIIa zusammen, welche aber ein getrenntes Genom und eine unabhängige Prozessierung aufweisen.[11] Erst durch die regulierende Bindung von Ca^{2+} oder Mg^{2+} an GPIIb [1] entstehen heterodimere Komplexe.[45,46,51,77] Nur dann ist der Rezeptor funktionsfähig. [45,103,118,146] Ein Beleg für die Notwendigkeit dieser funktionellen Einheit ist mittlerweile Bestandteil des medizinischen Alltags: wird der Komplex durch EDTA reversibel getrennt, so ist die Gerinnungsfähigkeit inhibiert.
Abbildung 5 veranschaulicht den Aufbau des Rezeptors aus seinen beiden Untereinheiten, auch $\alpha_{IIb}ß_3$ genannt. Markiert ist hier auch die sogenannte RGD-Erkennungsregion, die man heute als Bindungsstelle für die RGD-Sequenz Ala-Gly-Asp auf allen Liganden des Rezeptors annimmt; Allerdings vermutet man heute eine weitere Erkennungsregion auf GPIIb.[78] Diese Region könnte mit der Dodekapeptid-Sequenz der Fibrinogen-γ-Kette interagieren (Abbildung 5, auch siehe unten).

Wie angedeutet, wird die Bezeichnung als Fibrinogenrezeptor zwar dem Hauptliganden Fibrinogen gerecht, dennoch qualifiziert sich auch der vWF und Fibronectin durch eine RGD-Region als Ligand.[122,123] Diese Multivalenz wird dadurch weiter deutlich,

dass GPIIIa auch im Verbund mit anderen Glykoproteinen , zum Beispiel als Vitronectin-Rezeptor [78] und auf anderen Zellen zu finden ist – wohingegen GPIIb nur auf Zellen der megakaryozytären Reihe vorkommt.[43,67]

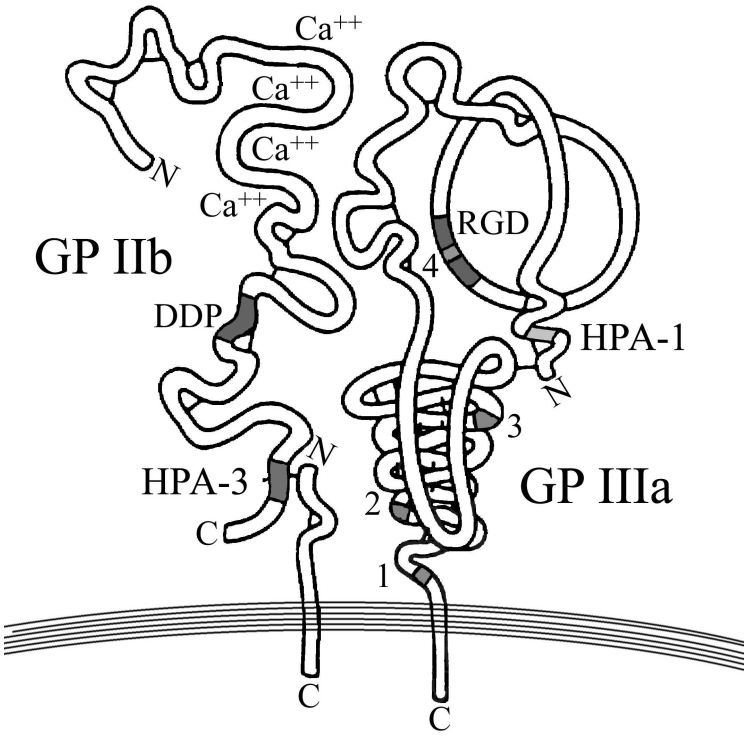


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Fibrinogenrezeptors auf Thrombozyten.

Gezeigt sind die beiden Integrine GP IIb und IIIa, die durch die Anlagerung von vier ***Ca***$^{++}$-Ionen einen heterodimeren Komplex bilden. Mit ***C*** und ***N*** sind jeweils die Carboxy- bzw. Amino-terminalen Enden der Ketten gekennzeichnet. Der schleifenreiche Aufbau wird v.a. durch Disulfidbrücken (schwarze Striche) stabilisiert. ***Grün*** hervorgehoben sind die Regionen, die für die Bindungsfähigkeit des Rezeptors verantwortlich gemacht werden (***RGD***-Erkennungsregion, Dodekapeptid-Erkennungsregion (***DDP***)).
Gelb ist die Region des ***HPA-1***, blau des ***HPA-3*** –Polymorphismus markiert. Die ***grauen*** Areale zeigen: ***1*** den Sr, ***2*** den Ca, ***3*** den Mo und ***4*** den Pen Polymorphismus. Details zu Lokalisation und Prävalenz sind Tab. 2 zu entnehmen.
Abb. basiert auf Ref. 78,109,135

Während ein durchschnittlicher Thrombozyt ca. 40-90.000 $\alpha_{IIb}ß_3$-Komplexe besitzt,[116] was im aktivierten Zustand auch in etwa der Zahl der Fibrinogenbindungen gleichzusetzen ist,[91] wird eine Reduzierung dieser Zahl eindrucksvoll bei Betroffenen der Glanzmann Thrombasthenie deutlich: Hier sind nahezu keine der beiden GP auf der Membran zu finden –die für den Organismus so wichtige Aggregation unterbleibt entsprechend.[111,117] Unterschiedliche mutante Allele der Glykoproteine sind hier für verschiedene klinische Schweregrade verantwortlich.[12] Neben diesen drastischen Mutationen sind mittlerweile eine Reihe von anderen, diallelen Polymorphismen auf genetischer und molekularer Ebene bekannt, über deren klinische Konsequenzen teilweise noch recht wenig Informationen vorliegen – ein Überblick darüber wird in Tabelle 2 gegeben.[108]

Wegen des vergleichsweise gehäuften Auftretens des selteneren Allels (HPA-1b) war der HPA-1 Polymorphismus zuletzt mehrfach Gegenstand des Interesses, gestützt von zweierlei Ansätzen:
Nachdem durch grundlegende Arbeiten zur genetischen Charakterisierung dieses Polymorphismus eine methodische Basis für klinische Assoziationsstudien geschaffen war, propagierten Weiss et al.,[165] später gestützt von Carter et al.,[17,18] eine Assoziation des HPA-1b Allels mit der Myokardinfarktinzidenz. Der Appell „DNA-based detec-

tion of GPIIb-IIIa variants – the future is here!“[2] rief allerdings eine Reihe weiterer Gruppen mit neuen, kontroversen Ergebnissen auf den Plan, so dass die Frage der kardiologischen Relevanz dieses Polymorphismus noch immer einer abschließenden Klärung bedarf.

Weitere Unterstützung erhielt diese kardiologische Fragestellung durch neue, biochemische Details:

Die räumliche Entschlüsselung (siehe Abbildung 5) des $\alpha_{IIb}ß_3$-Integrin brachte die – an sich auf der Molekülkette von der Bindungsstelle entfernte – Aminosäuren-Substitution in im dreidimensionalen Raum in räumliche Beziehung zur zysteinreichen Bindungsregion. Diese Arbeiten schlossen damit eine Beeinflussung der Fibrinogenbindung mit klinischen Konsequenzen nicht aus.[4,14,47] Doch auch hier wurden von anderer Seite berechtigte Zweifel angemeldet.[48]

Anhaltspunkte zu einer eventuellen funktionellen Bedeutung genetischer Alterationen demonstrierten kürzlich Feng et al. anhand zellulärer Aktivierungsparameter wurde gezeigt, dass die HPA-1b Variante funktionell mit einer höheren Aktivierung des Thrombozyten verbunden sei – ein Bindeglied zur Stentthrombose?[32]

Die kontroverse Thematik soll im Rahmen der Diskussion detailliert ausgeführt werden. Hier gehen auch die Ergebnisse dieser Studie ein: Der HPA-1 und HPA-3 Polymorphismus (siehe Tabelle 2) wurde einbezogen, letzterer ist durch seine Allelverteilung von 0,36:0,64 für eine statistische Analyse vielversprechend und schließt durch seine Lokalisation auf GPIIb den Themenkreis.

Tabelle 2: Allele Formen des GPIIb-IIIa-Gens im menschlichen Genpool (siehe auch Abb. 4)

Allele Formen	Gen-Frequenz*	Serologische Nomenklatur
GP IIb Val_{837} Ile_{843}	0,61	HPA-3b
GP IIb Val_{837} Ser_{843}	0,36	HPA-3a
GP IIb Met_{837} Ser_{843}	0,03	HPA-3a Variante
GP IIIa Leu_{33} Leu_{40} Arg_{143} Pro_{407} Arg_{489} Arg_{636}	0,85	HPA-1a
GP IIIa **Pro_{33}** Leu_{40} Arg_{143} Pro_{407} Arg_{489} Arg_{636}	0,15	HPA-1b
GP IIIa **Pro_{33}** **Arg_{40}** Arg_{143} Pro_{407} Arg_{489} Arg_{636}	0,005	HPA-1b Variante
GP IIIa Leu_{33} Leu_{40} **Gln_{143}** Pro_{407} Arg_{489} Arg_{636}	<0,01	Pen[b]
GP IIIa Leu_{33} Leu_{40} Arg_{143} **Ala_{407}** Arg_{489} Arg_{636}	<0,01	Mo[a]
GP IIIa Leu_{33} Leu_{40} Arg_{143} Pro_{407} **Gln_{489}** Arg_{636}	<0,01	Ca[a]
GP IIIa Leu_{33} Leu_{40} Arg_{143} Pro_{407} Arg_{489} **Cys_{636}**	<0,01	Sr[a]

*Genfrequenzen in Europa nach Referenz 108

Der von-Willebrand-Rezeptor

Die Glykoproteine Ib, aus einer α und ß Untereinheit, und IX sind die obligaten Bausteine des vWF-Rezeptor. Dieser ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt.
Modderman et al präsentierten zudem Ergebnisse, dass das GP V mit dem Komplex assoziiert ist,[32] wenn auch dieses keine regelmäßige Rezeptorkomponente zu sein scheint. Bemerkenswert ist eine Leucin-reiche Region, die allen genannten GP gemeinsam ist. Man vermutet daher, dass diese für die strukturelle Integrität der Glykoproteine im Gesamtkomplex verantwortlich ist.[97]

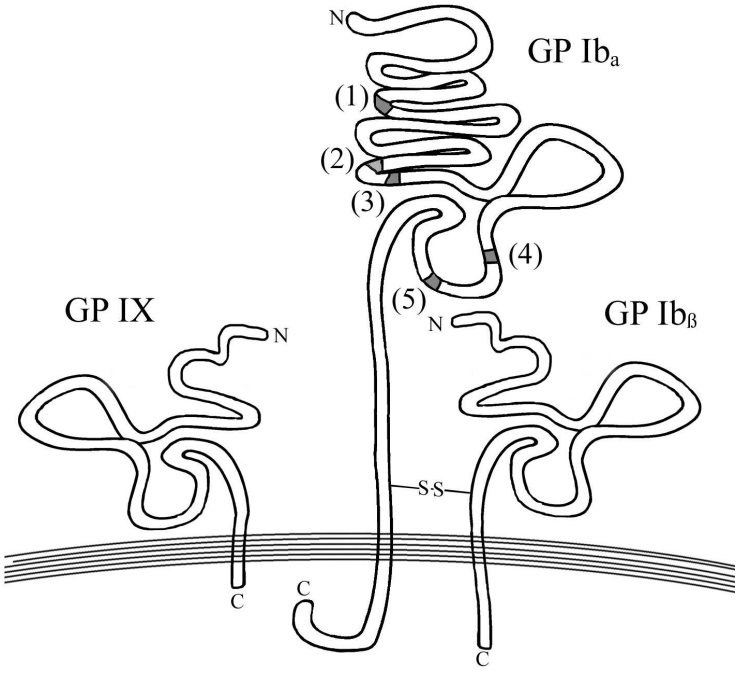


Abbildung 6: Schematische Darstellung des von Willebrand-Rezeptors auf Thrombozyten.

Gezeigt sind die Integrine GP Ib$_α$, Ib$_ß$ und IX, von denen erstere beiden durch eine Disulfidbrücke verbunden sind.
Fünf Polymorphismen sind besonders hervorgehoben und mit Nummern gekennzeichnet, die auf Details in Tabelle 3 verweisen. Besonderes Augenmerk sei auf den orangemarkierten HPA-2 (2) Polymorphismus gerichtet, der Gegenstand dieser Studie ist. Mit C ist das carboxyterminale, mit N das aminoterminale Ende der Molekülketten gekennzeichnet.Vgl. Referenz 135

Mittlerweile ist bekannt, dass Ib, IX und V von verschiedenen Genloci kodiert werden.[97,130] Umso mehr mag es verwundern, dass bei dem autosomal rezessiven Bernard Soulier Syndrom (BSS), einer schweren Blutungserkrankung, das Fehlen *aller* Komponenten des vWF-Rezeptors zu einer Adhäsionsstörung führt.[42] Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen liefert ein Bericht von Lopez et al., der eine Expression des Komplexes nur bei intakter Biosynthese aller Komponenten meldet.[168]
Die Schwere einer solchen genetischen Störung des vWF-Rezeptors wird einleuchtend, wenn man sich die hohe Zahl von 20-30.000 Ko-

Tabelle 3: Punktmutationen auf dem GPIb$_α$ Moleküls

	Polymorpher Locus	Bezeichnung	Ref.
(1)	$Leu_{57} \rightarrow Phe$	BSS-Variante	86
(2)	*$Thr_{145} \rightarrow Met$*	*HPA-2 (Syn. Ko)*	95
(3)	$Ala_{156} \rightarrow Val$	BSS, Typ Bolzano	75
(4)	$Met_{239} \rightarrow Val$	vW-Krankheit, Plättchentypus	164
(5)	$Gly_{233} \rightarrow Val$	vW-Krankheit, Plättchentypus	133

vW: von Willebrand, BSS: Bernard Soulier Syndrom
Die Nummern in Klammern verweisen auf Abb. 6

pien pro Thrombozyt vor Augen hält und Studien einbezieht, die den Stellenwert der hochaffinen vWF-Adhäsion unter hohen Scherkräften betonen.[94] Auf der Suche nach den bindenden Regionen, die diese hohe Affinität bedingen, ist man mittlerweile sowohl auf dem vWF als auch auf $GPIb_{\alpha}$ fündig geworden.[98,132] Nach diesen Quellen ist die Region Ser_{251}-Tyr_{279} an der Bindung beteiligt, man geht aber davon aus, dass auf dem Rezeptorkomplex noch weitere Sites identifiziert werden.
Für das oben erwähnte Bernard Soulier Syndrom wurden mehrere Genabnormalitäten auf GP Ib und IX als Ursachen ausfindig gemacht.[12] Das für GP Ib_{α} kodierende Genom ist aber Träger einer Reihe weiterer Polymorphismen, die alle auf einer Punktmutation beruhen. Detailliert sind diese in Tabelle 3 beschrieben und anhand der Abbildung 6 veranschaulicht.
Während alle anderen aufgeführten Genvariationen mit schweren adhäsiven Dysfunktionen einhergehen, ist der Ko-Polymorphismus (Synonym HPA-2) bisher noch keiner pathologischen Auffälligkeit zugeordnet worden. Verwunderlicherweise, denn es besteht eine enge räumliche Nachbarschaft zu den anderen genetischen Alterationen. Dies war Anlass zur Überprüfung des diallelen Systems in dieser kardiologischen Studie.

Der Kollagenrezeptor

Der Komplex aus GP Ia und IIa, auch als $\alpha_2ß_1$-Integrin bezeichnet, fungiert als Rezeptor für Kollagen. Zirka 2000 Integrine je Blutplättchen sind für die Bindung an dieses Baumaterial des Gefäßsubendotheliums verantwortlich.[160]
Im Vergleich zu dem zum Teil recht fundierten Wissen zu den anderen Rezeptoren ist hier wenig bekannt. Auch den Br-Polymorphismus (syn. HPA-5), ein dialleles System auf dem GP Ia Gen hat man erst mittels neuer Antikörper-Techniken entdeckt.[69] Dieser Polymorphismus kommt durch eine Punktmutation zustande, die durch Veränderung des Codons für Glutaminsäure an Position 505 zum Austausch gegen Lysin führt.[70]
Es wurden bisher wenig Daten zu Einflüssen dieses Polymorphismus im kardiologischen Sektor veröffentlicht.[135] Erst kürzlich wurde der Br-Polymorphismus im Zusammenhang mit einem weiteren, neu-entdeckten Polymorphismus 807 C/T neu ins Gespräch gebracht: Beide scheinen die Expression des Rezeptorkomplexes auf der Oberfläche zu modulieren.[23] Hier bestünde ein kausales Bindeglied zum entscheidenden ersten Schritt der Thrombozytenadhäsion und –aggregation: der Bindung an Kollagen. Das hat Anlass gegeben, den Br-Polymorphismus in dieser Studie zu evaluieren.

Fibrinogen

In diese Reihe der Thrombozytenrezeptoren habe ich als Zusatz den Aufbau und Polymorphismen des Fibrinogens aufgenommen, weil dieses Molekül gerade im Zusammenhang mit obigen eine wichtige Rolle bei der Aggregation spielt.
Das 340 kD Fibrinogenmolekül besteht aus der Aα, Bß und γ Untereinheit, die durch Disulfidbrücken verknüpft sind.[112,116] Es weist drei Bindungsstellen auf, denen man eine Bedeutung bei der Kopplung an den Fibrinogenrezeptor zuschreibt. Zwei Sites vom RGD Typ (s.o.) sind an den beiden Enden der Aα-Kette situiert. Eine dritte Region auf der γ-Kette verfügt über eine besondere Dodekapeptid-Sequenz und wird auch vom GPIIIa-Anteil des Rezeptors erkannt.[23]
Zahlreiche Polymorphismen sind auf dem Fibrinogen-Gen charakterisiert worden, mehrheitlich auf der für die ß-Kette kodierenden Region: Schon seit einiger Zeit sind Daten verfügbar, die den ß Bcl I Polymorphismus mit der Artheroskleroseneigung und dem Plasmafibrinogenspiegel korrelieren.[110]
Ähnliche Überlegungen sind derzeit auch zum Bß448 Polymorphismus publiziert worden: Zusammen mit den variablen Regionen C345 (C→T) und ß16 (I/D) wurde für diesen Polymorphismus eine enge Korrelation mit dem Plasmafibrinogenspiegel erfaßt.[18,36,72] Die übereinstimmende Eigenschaft könnte darin begründet sein, dass überwiegend zwei Allelkombinationen gibt, in denen diese drei Polymorphismen in Form eines Genlinkage gemeinsam vererbt werden.[72] Eine mögliche Erklärung für die Wirkung auf den Fibrinogenspiegel wäre eine weitere Genkopplung mit hoher Konkordanz (D=0,96) – der gekoppelte ß Hae III Polymorphismus ist nämlich auf der Promotorregion für Fibrinogen lokalisiert und damit bekannter Einflussfaktor auf den Plasma Level.
Ein folgenschwerer Kausalzusammenhang zu Gerinnungs- und Aggregationsvorgängen wäre damit für den Bß448 Polymorphismus denkbar.[5,16,110] Ich habe dies als Motivation gesehen, den Bß448 Polymorphismus in dieser Studie zu untersuchen.

1.2.3 Polymorphismen und ihre Bedeutung

Im Rahmen der Rezeptordarstellung wurden oben fünf Polymorphismen herausgestellt, die ich als studienrelevant für meine Fragestellung erachte; die Polymorphismen HPA-1, HPA-3, HPA-2 und HPA-5 sind auf Glykoproteinen bzw. deren Genom lokalisiert, Bß448 ist eine Alteration des Fibrinogen-Gens.
Schon lange sind die Konsequenzen der genannten Glykoproteinveränderungen auf immunologischer Ebene bekannt. Als schwere Komplikationen seien die Krankheitsbilder der Post-Transfusions-Purpura (PTP) und neonatalen alloantigenen, thrombozytopenischen Purpura (NATP) genannt:[3,65] Fremde Thrombozyten werden aufgrund

differenter Strukturen – obige Polymorphismen auf Eiweiß-Molekülebene - als solche vom Immunsystem erkannt und mit pathologischen Konsequenzen eliminiert. Erst mit der Entwicklung der Genanalyse wurden diese Ergebnisse der Antikörperdiagnostik den Veränderungen im Genom zugeordnet. Konsequenz der umfangreichen Forschung weltweit waren diverse Doppelbenennungen und Begriffsverwirrungen, die man versucht hat durch eine einheitliche Nomenklatur, das „human platelet antigen“ (HPA) System übersichtlich zu gestalten.[126] Es klassifiziert aktuell acht polymorphe Regionen mit antigenen Eigenschaften, einen für diese Arbeit relevanten Ausschnitt gibt Tabelle 4 wieder.

Tabelle 4: Humane Plättchenalloantigene*

HPA-System	Synonyme	Glykoprotein
HPA-1	PI^A, Zw	IIIa
HPA-2	Ko, Sib	Ib
HPA-3	Bak, Lek	IIb
HPA-5	Br, Zav, Hc	Ia

* Ausschnitt; mittlerweile sind insgesamt acht Systeme klassifiziert.

Über die beschriebenen immunitätsbedingten Folgen wird deutlich, welche Auswirkungen der Austausch einer einzelnen Aminosäure kann. Oben wurde auch bereits im Einzelnen dargelegt, dass aktuelle Ergebnisse eine lebhafte Diskussion zu einer auch *funktionellen Bedeutung* der Polymorphismen entfacht .

Daher wurde dieser Studie zum Ziel gesetzt, Zusammenhänge zur klinisch wichtigen Thrombozytenaggregation in den Koronarien nach Stentimplantation zu suchen: Die subakute Stentthrombose.

2. Fragestellungen

Obige Überlegungen führen konkret zu folgenden Fragestellungen:

- Kann man für die Polymorphismen HPA-1, -2, -3, -5 (Pl^A, Ko, Bak, Br) und Bß448 ein zuverlässiges genanalytisches Verfahren etablieren, das den Anforderungen eine großen Studie genügt und sich damit auch als Screeningmethode eignet?

- Ist es möglich, signifikante Abweichungen der Allelverteilung für diese Polymorphismen in einer Gruppe von Patienten mit subakuter Stentthrombose im Vergleich mit Patienten ohne Stentthrombose zu finden?

- Weichen die Ergebnisse dieser Gruppen mit Stentpatienten von der Verteilung in einer Gruppe von Patienten ohne koronare Herzerkrankung ab?

3. Methodik

3.1 Studienkonzept und Populationsplanung

Die vorliegende Studie war konzipiert die Hypothese zu überprüfen, ob Patienten mit genetisch verschieden determinierten Glykoproteinen der Plättchenmembran einem erhöhten Risiko unterliegen, eine subakute Stentthrombose zu entwickeln.
Um dieser Fragestellung möglichst umfassend und akkurat gerecht zu werden, waren drei klinisch-definierte Patientengruppen vorgesehen:

- Patienten ohne koronarangiographisch-pathologischen Befund als Kontrollgruppe
- Patienten mit Stentprozedur, aber ohne subakut okkludierendes Ereignis als Vergleichsgruppe
- Patienten mit Stentprozedur und subakuter Stentthrombose als Studiengruppe mit Event.

Das Konzept hierbei war, die beiden Gruppen mit Stentprozedur, aber unterschiedlichem Outcome im Sinne der Fragestellung einer vergleichenden Analyse hinsichtlich aller klinischen und prozeduralen Parameter, besonders aber der Genausprägungen zu unterziehen. Die zusätzliche Kontrollgruppe war dabei im wesentlichen als Referenz bestimmt, um zu überprüfen, ob dieses Patientengut repräsentativ für die Genverteilung im europäischen Raum ist. Zudem war ein vergleichender Anhaltspunkt zwischen Koronargesunden und –kranken möglich.

Im Hinblick auf die praktische Umsetzung war es wichtig, prospektiv als primäres Patientenkollektiv eine möglichst große Gruppe zu erfassen, um auch bei der sehr geringen Prävalenz der subakuten Stentthrombose eine statistisch ausreichend dimensionierte Zahl einzuschließen. Das Ereignis der Stentthrombose wird derzeit in der Literatur mit ca. 1% beziffert.
In diesem Sinne wurden alle Patienten beobachtet, die im Zeitraum vom November 1995 bis September 1997 in den kardiologischen Kliniken am Klinikum Rechts der Isar und am DHZ in München behandelt wurden.
Alle diese Patienten wurden in einer großen Datenbank exakt hinsichtlich persönlicher Charakteristika, kardiologischem Risikoprofil und Procedere dokumentiert (s.u.). Diese Daten standen mir für Datenbankabfragen zur Verfügung.
Dieser Fundus stellte die Basispopulation der Studie dar.
Im folgenden wurde der klinischen Verlauf und die diagnostischen Ergebnisse herangezogen, um die drei oben genannten Gruppen zu bilden. Damit hier eine prägnante

Zuordnung erzielt werden konnte, wurden sehr strenge Kriterien angesetzt, die ich im folgenden im Detail ausführen möchte.

3.1.1 Die Kontrollgruppe

Zur klaren Definition eines Patienten ohne koronare Herzerkrankung im engeren Sinn war als diagnostisches Kriterium eine Koronarangiographie des linken und rechten Koronargefäßsystems vorausgesetzt. Um als „koronargesund“ zu gelten, durfte die Koronarangiographie in mehreren Ebenen keinen bemerkenswerten Befund aufweisen. Insbesondere sind Verschlüsse, Stenosen und Wandunregelmäßigkeiten der Koronarien zu nennen.
Die Größe dieser Gruppe wurde auf 74 Patienten festgesetzt, die aus der oben definierten Teilpopulation mittels eines randomisierten Verfahren ausgewählt wurden.

3.1.2 Die Vergleichsgruppe

Für die Vergleichsgruppe und die Studiengruppe mit Event galten die selben Anforderungen an die Stentprozedur: Vorab ausgeschlossen wurden alle Patienten mit „nicht erfolgreicher“ Stentimplantation. Dies war per definitionem der Fall, wenn der Stent nicht im geplanten Gefäßabschnitt platziert werden konnte oder post interventionem eine Reststenose von mehr als 30% vorlag. Von den 2070 Stentpatienten wurden nach diesem Schema 35 ausgeschlossen.
Der Charakter einer event-freien Kontrollgruppe wurde dadurch sichergestellt, dass

- alle Patienten mit per Angiographie oder per obductionem nachgewiesener Stentthrombose binnen 30 Tagen nach der Intervention ausgeschlossen wurden.
- Patienten mit einem sog. MACE, also einem schwerwiegendem kardialen Zwischenfall innerhalb 30 Tagen nicht einbezogen wurden. Als solche Zwischenfälle galten Myokardinfarkt, kardialer Tod und die Notwendigkeit einer Re-PTCA oder einer Bypass-OP bezüglich des ursprünglichen Läsionsareales.
- Patienten, die innerhalb des 30-Tage-Intervalls an einer nicht-kardialen Todesursache starben.
- alle Patienten, die ihrem Risikoprofil nach erhöhtes Thrombosierungspotential zeigten, zum Ausschluss einer „klinisch stillen“ Stentthrombose vor Entlassung kontrollangiographiert wurden.

Als diagnostische Kriterien eines Myokardinfarktes galt hier:

- typisches thorakales Schmerzbild für mehr als 30 Minuten
- abnorme Q-Wellen, die im Ausgangselektrokardiogramm nicht zu erkennen waren.

- Ein Anstieg der Kreatinin-Kinase Konzentration auf mehr als das doppelte des oberen Grenzwertes des Normbereiches und damit einhergehend ein Anstieg des CK-MB Isoenzyms.
- TIMI 0 oder 1 in der Flussmessung

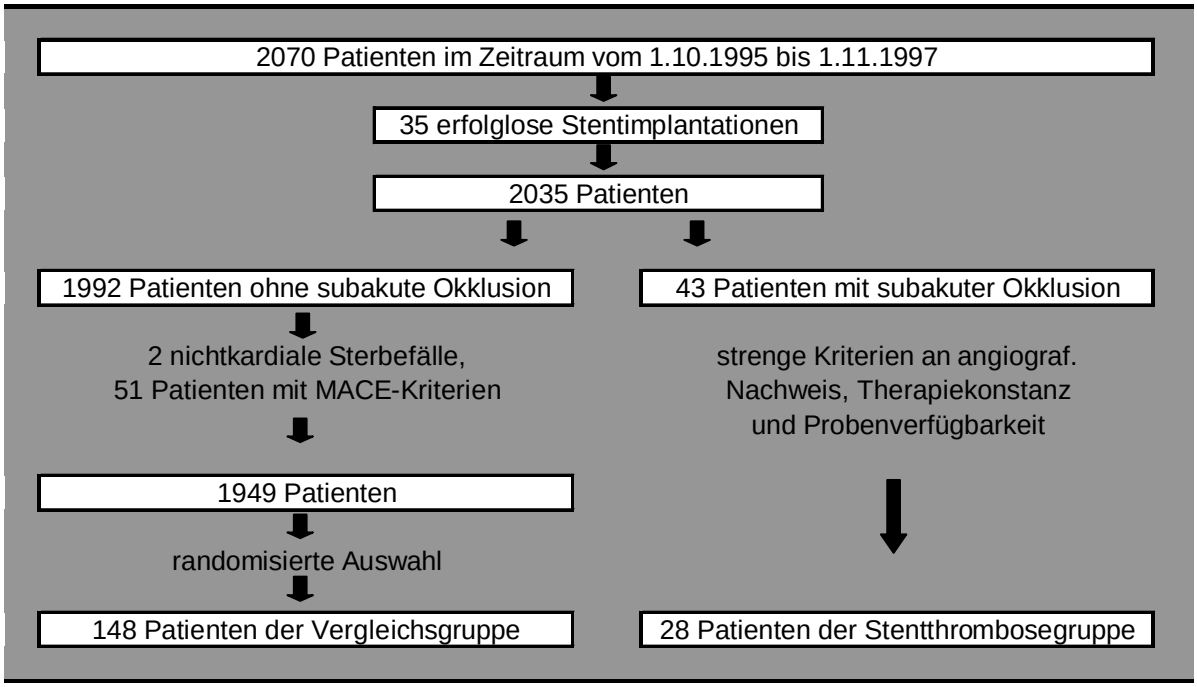


Abbildung 7: Bildung der Stentgruppen in der Studie

Ausgehend von allen gestenteten Patienten im Studienzeitraum wurden anhand verschiedner Ausschlusskriterien die Studiengruppen der Patienten mit und ohne subakute Stentthrombose eingeteilt.
Der Begriff MACE (major adverse cardiac event) schließt in diesem Falle den kardialen Tod, Myokardinfarkt und die Notwendigkeit zur Re-PTCA oder zur Bypass-Operation ein.

Nach diesen Ausschlusskriterien, die in Abbildung 7 gezeigt sind, verblieben 1949 Patienten. Hier wir ein randomisiertes Verfahren mittels Zufallsgenerator angewandt, um 148 Patienten für diese Gruppe zu selektionieren. Dieser Schritt wurde also rein zufällig vor der Genanalyse oder Bestimmung anderer Parameter durchgeführt.

3.1.3 Die Studiengruppe mit subakuter Stentthrombose

Als primäres Ausschlusskriterium galt - wie für die Vergleichsgruppe - wiederum eine nicht erfolgreiche Intervention, also kein ausreichender Lumengewinn oder das Scheitern der Stentplazierung im geplanten Zielabschnitt (s.o.). Diese Grundvoraussetzungen erfüllten 43 Patienten mit subakuter Okklusion.

Außerdem war als Bedingung gesetzt, dass die übliche kombinierte Anti-Plättchen-Therapie (s.u.) von 2* 250 mg/Tag Ticlopidin und 2*100mg/Tag Aspirin konsequent bis zum Eintreten der Stentthrombose durchgeführt wurde.

Im Gegensatz zur Kontrollgruppe war hier Voraussetzung, dass binnen 30 Tagen, im Angiogramm oder in einer Obduktion objektiviert, eine Thrombosierung des gestenteten Gefäßes stattgefunden hatte. Konkret wurde ein TIMI Grad 0 oder 1 als Definition des Verschlusses gesetzt.

Unter diesen strengen Kriterien waren 28 Patienten eingeschlossen und zur Analyse verfügbar.

3.2 Klinisches Vorgehen und Datenerhebung

Im Rahmen dieser Studie waren wir bedacht, einen vollständigen persönlichen, läsions- und prozedurbezogenen Datensatz zu allen Patienten zu erstellen. Alle diese Daten wurden zur eindeutigen Dokumentation umgehend in die kardiologische Datenbank aufgenommen. Durch feste Datensatzschemata und limitierte Zugriffsrechte war so eine lückenlose, zuverlässige und eindeutige Informationserhebung und –verwaltung gesichert. Diese Daten standen mir zur Datenbankabfrage zur Verfügung.

3.2.1 Anamnese und Basisuntersuchungen

Daten zur Person , Eigen- und Fremdanamnese (Rauchen, Alter, familiäre Disposition, Angina pectoris) wurden bei stationären Patienten im Rahmen der Aufnahme, bei auswärtigen Patienten in der intensiven Vorbereitungsphase in der Tagesklinik erhoben. Hier wurden auch Daten zu diabetes mellitus, Hypertonus und Hypercholesterinämie ermittelt bzw. überprüft.

3.2.2 Angiografische Daten

Der Herzkatheteruntersuchung wurden einer Reihe von studienrelevanten Daten entnommen:

- Läsionen wurden nach dem modifizierten Gradingsystem des American College of Cardiology / American Heart Association eingeteilt. Als Grad B2 oder C klassifizierte Läsionen wurden dabei als komplex eingestuft. Der Ort der Läsion wurde anhand mehrerer Projektion ermittelt und nach einem festen System eingeteilt.
- Linksventrikuläre Funktion: Anhand eines LV-Angiogramms in zwei Ebenen wurde die Funktion des linken Ventrikels qualitativ bestimmt. Die Zuordnung als eingeschränkte LV-Funktion wurde getroffen, wenn mindestens zwei hypokinetische Segmente zu erkennen waren.
- Quantitative Daten: Die quantitative Analyse wurde im offline-Modus durchgeführt. Dazu war ein automatisches Edge-Detection-System CMS (Medis Medical Imaging System) im Einsatz. Auf diese Weise wurde zweimal, unmittelbar vor und nach der Stentplazierung ein Datensatz erhoben. Dieser umfasst:
  - MLD (minimal lumen diameter): mittlerer Gefäßdurchmesser
  - RD (reference diameter): Referenzdurchmesser
  - DS (diameter stenosis): Durchmesser des stenosierten Gefäßabschnittes.
  - Durchmesser des maximal entfalteten Ballons.

- Prozedurale Parameter: Art und Zahl der verwendeten Stents, Drucke bei der Balloninflation und Winkelstellung der Projektion wurden während der Intervention von einem nicht in die Prozedur einbezogenen Operator festgehalten. Details hierzu siehe unter 3.2.3. Durch die Aufzeichnung wichtiger Sequenzen auf CD-Rom und die genaue Dokumentation der verwendeten Projektionen war eine Überprüfung anhand der Aufzeichnung bzw. eine Kontrolle anhand gleicher Projektionen möglich.

3.2.3 Stentimplantation

Nach allgemeiner Vorbereitung, Kontrolle der Schilddrüsen durch Anamnese und evtl. Blutwerte und Abschätzung der Nierenfunktion (Kreatinin) wurden die Patienten im Herzkatheterlabor behandelt.
Alle koronarangiografischen Untersuchungen wurden nach dem Prinzip der perkutanen, transfemoralen Koronarangiografie (PTCA) durchgeführt. Standardgemäß wurde hier einleitend eine Dosis von 15000 IU Heparin und 500mg Aspirin intraarteriell appliziert.
Lag die Indikation für eine Stentimplantation vor, wurde ein Führungsdraht durch das entsprechende Segment vorgeschoben.

Während dieser vor Ort verblieb, wurde in über 95% von Hand ein Stent (Typen siehe Tabelle 5) auf einen üblichen Angioplastieballon aufgebracht und so an die gewünschte Stelle platziert. Dies geschah unter fluoroskopischer Kontrolle, wobei röntgendichte Marker auf dem Ballon hilfreich waren. Der Stent wurde dann durch ein- oder mehrmaliges Dilatieren des Ballons an die Gefäßwand angelegt und so fixiert. Die Verwendung mehrerer Stents war dem Operateur freigestellt.

Tabelle 5: Verwendete Stents nach der Häufigkeit ihres Einsatzes

Palmaz-Schatz	Johnson and Johnson, Warren, NJ
ID	Inflow Dynamics, Arlington, VA
Pura A	Devon Medical, Hamburg, Germany
NIR	Boston Scientific, Watertown, MA
Multilink	Guidant, Teemcula, CA

Post interventionem wurde den Patienten die arterielle Schleuse noch für ca. 3 Stunden belassen, dann entfernt und die Blutung durch manuelle Kompression und später einen Druckverband gestillt.. Obligat war dabei eine intravenöse Gabe von Heparin in den ersten 12h, die auf eine Ziel PTT von 80-100 Sekunden hin kontrolliert wurde.
In der Folgezeit bestand die Standardtherapie aus einer Basisapplikation von zweimal 100 mg Aspirin p.o. täglich, die grundsätzlich ohne zeitliches Limit angesetzt war.

Zusätzlich erhielten die Patienten die ersten vier Wochen lang zweimal täglich 250 mg Tiklopidin oral.

Im Vordergrund stand auch eine engmaschige Überwachung im Krankenhaus:

- routinemäßige Enzymüberwachung für 24 Stunden, bei klinischen Auffälligkeiten auch danach,
- tägliche EKG Kontrolle,
- Rekoronarangiografie bei klinischen Zeichen der Ischämie,
- Bei Patienten mit erhöhtem Risiko einer Stentthrombose (siehe Tab.1) Rekoronarangiographie vor Entlassung

und außerhalb des Krankenhauses:

- ambulante Kontrollen oder telefonischer Kontakt

3.3 Experimente

Zur Bestimmung der Gendaten wurde ein System in unserem Labor etabliert, das ausgehend von Vollblut eine zuverlässige Analyse erlaubt. Dabei wird das in den Zellkernen der Leukozyten enthaltene Erbgut isoliert, gereinigt, das für die jeweilige Bestimmung relevante DNA-Teilstück amplifiziert, nachdem Prinzip der RFLP (restriction fragment length polymorphism) aufgespalten und die Ergebnisse mittels einer Gelelektrophorese dargestellt.
Die maximalen Anforderungen an die Zuverlässigkeit der Bestimmung und die wirtschaftlichen Aspekte einer großen Studie machten eine große Zahl an Versuchen im Vorfeld zur Optimierung erforderlich (siehe 3.3.7 und 3.3.8).
Im Anschluss sind die Einzelschritte der Analyseprozedur erläutert.

3.3.1 Probenentnahme

Ausgangsmaterial für den analytischen Teil ist EDTA-Vollblut. Circa fünf Milliliter wurden peripher venös in zwei Röhrchen entnommen und sofort durch einen eindeutigen Aufkleber gekennzeichnet. Die Entnahme war fest in die Routine des Katheterlabors eingebunden und fand somit standardisiert statt.
Sofern keine sofortige Bearbeitung im Labor durchgeführt wurde, lagerte ich die Proben bei –72°C, ebenso Restvolumina post analysis im Sinne einer Blutbank für Nachkontrollen. Zur Bearbeitung wurden die Proben für die Zeit der Entnahme des Analysevolumen kurz auf Raumtemperatur gebracht.

3.3.2 DNA-Isolation und Reinigung

Zur Weiterverarbeitung des Erbguts mittels Amplifikationsverfahren ist es erforderlich, die DNA aus den kernhaltigen Zellen des Bluts freizusetzen und in eine gereinigte Form überzuführen.
Das betrifft vor allem die Entfernung bzw. Inaktivierung von:

- Ionen und Proteinen, die zu falscher oder verminderter Anlagerung der Primer-Oligonukleotide (siehe 3.3.3) und Polymerasen der PCR-Reaktion führen
- DNAsen, also den Basenstrang enzymatisch teilenden Enzymen, die zu unverwertbaren Bruchstücken und abnehmenden Konzentrationen intakten Erbguts führen.

Diese Faktoren beeinflussen zum einen die Auswertbarkeit der Restriktionsendprodukte (Signalstärke und Störhintergrund), zum anderen ist so auch die Haltbarkeit des Extraktes deutlich gesteigert. Dieser Punkt war vor allem daher wichtig, weil hiermit eine

Extraktion als Ausgangsmaterial für die Bestimmung aller fünf Polymorphismen dienen konnte.

Aus diesem Grund habe ich eine Reihe verschiedener Extraktionskits getestet, um das Optimum für die angelegten Bedürfnisse zu ermitteln. Wegen sehr guten Signalen bei allen getesteten Polymorphismen und der vergleichsweise hohen Bluteinsatz- und damit DNA-Outputmenge ist dabei die Entscheidung zugunsten des QIAmp Blood Kit (Quiagen, Hilden, Deutschland) ausgefallen.
Dieses Kit vereinigt folgende Prinzipien:

- Lyse der Zellen und Zellorganellen durch mechanische Beeinflussung (mehrfaches Vortexen bei hoher Stufe), durch enzymatischen Verdau (25 µl Protease C, mitgeliefert) und Veränderung des Milieus (210 µl Puffer AL) sowie thermische Lyse (Inkubation bei 70°C für 10 Minuten)
- Elution störender Stoffe durch Lösung in Ethanol (200 µl) und mehrfaches Waschen mit Puffer AW (3* 500 µl, mitgeliefert)
- Vollständiges Entfernen der gelösten Stoffe durch Zentrifugation bei 8000 und 14.000 /min, während die DNA durch Adsorption an eine spezielle Filtermatrix (spin column, mitgeliefert) zurückgehalten wird.

Resultat aus 200 µl eingesetztem Vollblut sind 200 µl gereinigten DNA-Extraktes, das wegen seiner hohen Konzentration für eine Vielzahl an Bestimmungen suffizientes Ausgangsmaterial bietet. Um in diesem Sinne eine gute Haltbarkeit zu gewährleisten, wurde zur finalen Elution aus der Matrix auf 70°C temperierten Puffer AE (200 µl, mitgeliefert) eingesetzt und die Proben dann bei -20°C in Eppendorfcups gelagert.

3.3.3 PCR-Reaktion

Die jetzt vorliegende DNA-Lösung ist noch nicht ausreichend konzentriert, um direkt dem Enzymverdau und der Gelelektrophorese zugeführt zu werden. An dieser Stelle wurde daher das Amplifikationsverfahren der Polymerase Ketten Reaktion (PCR) eingesetzt, das heute zentrales Element für die meisten Methoden der Gentechnik ist.
Dieses Verfahren sei hier in Kürze dargestellt:
Grundsätzlich macht man sich ein biologisches Prinzip zu nutze, das in allen Eukaryontenzellen zur Replikation des Genoms gebraucht wird. Das Enzym DNA-Polymerase läuft unter geeigneten Bedingungen (hier durch 10fach PCR-Puffer, Boehringer Mannheim) einen vorgegebenen DNA-Einzelstrang (DNA-Extrakt) entlang. Sind hierbei die Bausteine der DNA, also die Nukleoside Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin in energetisch aktivierter Form (hier als dNTP-Mix, Fa. Gibco) vorhanden, so baut die Polymerase den jeweiligen Gegenstrang auf. Trennt man nachfolgend den

synthetisierten Doppelstrang thermisch in Einzelstränge auf, so stehen zwei neue Ausgangsstränge zur neuen Reaktion zur Verfügung.
Lässt man diese Reaktion mehrfach ablaufen, so entsteht durch den Effekt der zweier Potenzierung ein pyramidenförmiger Zuwachs an DNA.

Für eine Laboranalyse anwendbar wird dieses Prinzip durch folgende Modifikationen:

- Einsatz einer besonderen „Taq-Polymerase“ (Boehringer Mannheim) aus dem Bakterium *t*hermus *aq*uaticus, die aufgrund ihrem natürlichen Umfeld in heißen Quellen sehr temperaturresistent ist. Das eröffnet zwei Möglichkeiten: zum einen die Beschleunigung der Synthesereaktion des Enzyms bei erhöhter Temperatur, zum anderen das häufige Durchführen des Elongations-Strangtrennungs-Zyklus, da das Enzym der thermischen Strangtrennung bei 95°C standhält.
- Verwendung von speziellen Primern: Da für meine Fragestellung nur eine Sequenz von einigen hundert Basenpaaren rund um den polymorphen Locus von Interesse ist, liegt das Konzept nahe, auch nur diesen kleinen Bereich des Millionen von Basenpaaren umfassenden Genoms zu amplifizieren. Diese Markierung geschieht durch synthetische Oligonukleotide, sogenannte Primer. Ein Primer ist eine kleine Basenpaarsequenz, die sich, aufgrund der komplementären Basenabfolge zu einer Stelle des Mutterstrangs, dort bindet und zusammen mit einem zweiten Oligonukleotid Start- und Endpunkt der Polymerase-Reaktion auf dem Strang markiert (siehe Abb. 7).

Tabelle 6: Primer für die PCR-Amplifikation

	Primer	Genort	PCR-Prod.
HPA-1 (Pl^A)	5'-TTC TGA TTG CTG GAC TTC TCT T-3' [125] 5'-TCT CTC CCC ATG GCA AAG AGT-3' [125]	GP IIIa Gen, Exon 2 [153]	268 bp
HPA-2 (Ko)	5'-CTT CTC CCT GGC AAC CCT GAT-3' * 5'-TTC AGC ATT GTC CTG CAG CCA GC-3' [133]	GP Ib Gen, Exon 2 [64]	551 bp
HPA 3 (Bak)	5'-GTA AGA GCT GGG TGG AAG AAA GAC C-3' * 5'-CTC CTT AAC GTA CTG GGA AGC-3' [161]	GP IIb Gen, Exon 26 [79]	460 bp
HPA 5 (Br)	5'-GTG ACC TAA AGA AAG AGG-3' [63] 5'-CTC TCA TGG AAA ATG GCA G-3' [64]	GP Ia Gen, Exon ? [167]	274 bp
Bß448	5'-GGG ACA TGG CAA AGC ATG G-3' [5] 5'-GGT GAG CAA GAG AAA TGA AG-3' [5]	Fibrinogen ß-Ketten Gen, Exon 8 [57]	324 bp

* Primer, die wir selbst entwickelt und erprobt haben.

Um diese zehn erforderlichen Primer für die hier relevanten fünf Polymorphismen zu finden, konnten ich zum Teil auf etablierte Experimente aus der Literatur zu-

rückgreifen. Zum Teil waren die Ergebnisse hiermit aber unter dem Aspekt des problemlosen Screenings am großen Kollektiv nicht ausreichend. In diesen Fällen war es erforderlich, selbst Primer zu designen und zu optimieren (siehe 3.3.7). Die Synthese dieser Primer wurde dann an auswärtige Spezialunternehmen übergeben.
Die Sequenz aller Primer, Referenz, Länge des markierten Basenstrangs und der Genlocus des Polymorphismus sind in Tabelle 6 [5,57,63,64,79,125,133,153,161,167] aufgeführt.

- Schaffung optimaler Temperaturbedingungen durch einen Thermocykler. Wie schon beschrieben, muss für das Verlängern („Elongation“) der neuen Kette durch die Polymerase, für das Trennen („Denaturation“) des entstandenen Doppelstrangs und vor diesen beiden Phasen für das Koppeln („Annealing“) der Primer ein jeweiliges Temperaturoptimum vorliegen.

Während den konkreten, idealen Zeiten (siehe Tabelle 7) für diese Vorgänge sollte die Temperatur möglichst konstant gehalten werden, im Wechsel dazwischen sehr schnell den neuen Wert erreichen. Diese Bedingungen wurden mit einem Thermocykler-Gerät (Omnigene, Fa. Hybaid) geschaffen. Dieses ermöglicht, ca. 50 Proben gleichzeitig nach einem programmierten Zyklus mit variabler Wiederholung, hier 35 mal, zu prozessieren.. Das resultierende, in etwa 2 stündige Programm wird zusätzlich von einer zwei-minütigen 95°C Vorlaufphase eröffnet, um bestehende Bindungen zu trennen und von einer finalen Elongation (72°C, 5 min.) beendet.

Tabelle 7: PCR-Bedingungen

Vorlaufphase	2 min 95° C	
Denaturierung	1 min 95° C	35 Zyklen
Annealing und Kettenverlängerung	1 min 60° C	
Nachlaufphase	7 min 72 ° C	
Abkühlen	2 min 25° C	

Tabelle 8: PCR-Ansatz

1µl dNTP (10mmol/ml je Nukleotid)	dNTP-Kit, Fa. Gibco
5 µl 10 fach PCR-Puffer	Boehringer Mannheim
1 µl Taq-Polymerase	Boehringer Mannheim
2,5 µl DNA Extrakt	
1 µl je Primer (ca. 5µmol/ml)	Fa. Perkin Elmer
38,5 µl destilliertes und autoklaviertes Wasser	

Zu erwähnen sei noch, dass ich bessere Ergebnisse durch das Überschichten des Ansatzgemisches mit ca 50 µl speziellen Öls (Mineralöl, Sigma, St. Luis, Mo) erzielt habe. Dies erklärt sich dadurch, dass die Verdunstung von Flüssigkeit und Kondensation am etwas kühleren Deckel des Reaktionsgefäßes verringert wird. Damit bleiben die Konzentration im Ansatz auch im Verlauf optimal.

Zusammenfassung: Für die Amplifikation mittels PCR wurden je nach Polymorphismus spezifische Primer (s. Tabelle 6) eingesetzt. Durch die Herstellung eines abgestimmten Reaktionsansatzes (s. Tab. 8) erhielt man damit über ein angepasstes Thermocyklerprogramm (s. Tab. 7) Genprodukte typischer Basenpaarlänge (s.Tab. 6). Der quantitative und qualitative Erfolg dieser Prozedur ließ sich durch Gelelektrophorese überprüfen (siehe Abbildung 8, Prinzip siehe 3.3.5)

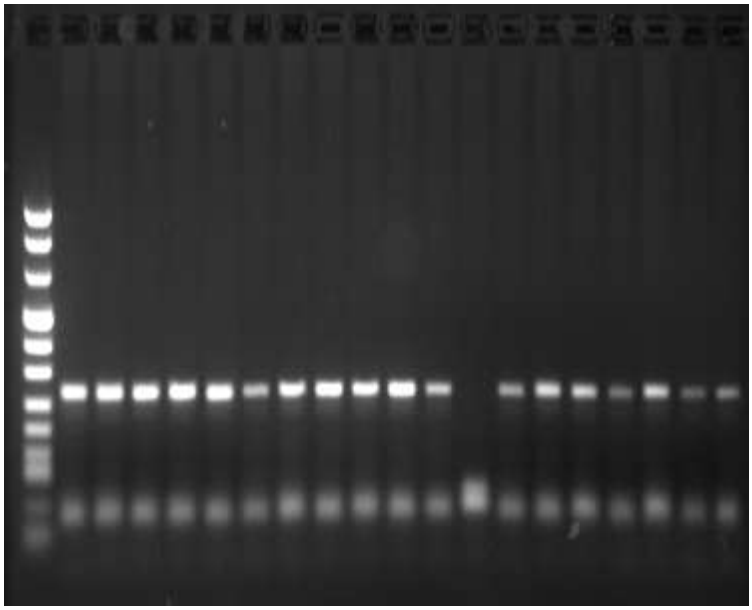


Abbildung 8: Agarosegel zur PCR-Kontrolle.

Spur 1: Molekular-Gewichtmarker mit Fragmenten bekannter bp-Länge.

Spur 2-20: PCR-Produkte HPA-1.

Spur 13: Fehlerhafte PCR.

Am Oberrand des Bildes sind andeutungsweise die Geltaschen zu erkennen, in die das PCR-Gemisch aufgetragen wird. Weit unten am Ende der Laufstrecken sind schwach die Banden der Oligonukleotide zu sehen, die wegen ihrer geringen bp-Länge vergleichsweise weit laufen.

3.3.4 Restriktionsverdau

Die PCR-Produkte erlauben nach dem Prinzip der einfachen Gelelektrophorese noch keine Aussage, welche Variante des diallelen Systems vorliegt. Hier wird lediglich nach Größe und Laufeigenschaft getrennt, der Austausch einer Base stellt keinen zur Darstellung ausreichenden physikalischen Unterschied dar. Abbildung 8 zeigt zum Beispiel PCR-Produkte, die später als verschiedene Genvarianten dargestellt wurden, hier aber nicht zu differieren sind. Daher wurde ein Zwischenschritt erforderlich.

Hier kommen Restriktionsenzyme zur Anwendung. Solche sind DNAsen, die den DNA-Strang nur dann zerteilen, wenn das Enzym eine besondere Basensequenz „erkennt“, d.h. aufgrund sterischer Verhältnisse eine hohe Affinität zu dieser Stelle aufweist.

Wählt man aus einer enormen Zahl verschiedener erhältlicher Enzyme ein geeignetes aus, das nur im Falle einer genetischen Variante an dem polymorphen Locus bindet und schneidet, so kann man das Vorliegen eines geschnittenen oder unversehrten PCR-Produktes als Merkmal für das vorliegende Allel nützen.

Zusätzlich waren folgende Bedingungen für die Wahl des Enzyms entscheidend:

- Es soll an mindestens einer weiteren, nicht allel-abhängigen Stelle schneiden. Diese Veränderung der bp-Länge, bzw. das Vorliegen des Schnittfragments fungiert als Erfolgskontrolle der Verdaureaktion („internal control“)
- Dennoch sollte die Zahl der Schnittstellen nicht zu groß sein, um eine Zerstückelung in viele kleine, evtl. nicht optisch trennbare Fragmente zu verhindern
- Die Fragmente sollten einen bp-Unterschied von mindestens 20 bp . Nur so ist eine deutliche Darstellung der Einzelfragmente bei einem Routine-Gellauf sinnvoll möglich.

Das Prinzip sei im folgenden am Beispiel des HPA-5 Polymorphismus erklärt: Das Enzym Mnl 1 hat das Erkennungsschema **5‘...CCTC(N)$_7$↓...3‘** bzw. auf dem Gegenstrang **3` ...GGAG(N)$_6$↓...5‘.** Das bedeutet, dass der DNA-Strang sieben bzw. sechs beliebige Basen nach der Erkennungssequenz CCTC bzw. GGAG durchtrennt wird. So entstehen hier vier Fragmente von 8, 33 und 97 und 136 bp Länge. Allelspezifisch wird das Verfahren dadurch, dass eine der Erkennungssequenzen GGAG nur beim Typus HPA-5b vorliegt, der Typ HPA-5a hat an dieser Stelle durch die Sequenz GGAA keine Schnittstelle und liefert folglich nur die Fragmente von 8,97 und 169 (136+33) bp Länge.

Tabelle 9: Restriktionsverdau: Enzyme, Ansätze und Fragmente

	HPA-1 (Pl^A)		HPA-2 (Ko)		HPA-3 (Bak)		HPA-5 (Br)		Bß 448	
Ansätze für den Verdau + 10 µl PCR-Produkt	0,25 µl Enzym Msp 1 (10 U/µl), 2 µl Puffer L 7,75 µl ddH_2O		0,25 µl Enzym BsaH (10 U/ µl), 2µl NE- u. 0,2 µl BSA Puffer, 7,55 µl ddH_2O		0,8 µl Enzym Fok 1 (3 U/ µl), 2 µl Puffer M 7,2 µl ddH_2O		0,5 µl Enzym Mnl 1 (5 U/ µl), 2 µl Puffer 2 0,2 µl BSA 7,3 µl ddH_2O		0,5 µl Enzym Mnl 1 (5 U/ µl), 2 µl Puffer 2 0,2 µl BSA 7,3 µl ddH_2O	
Typus	*a*	*b*	*a*	*b*	*a*	*b*	*a*	*b*	*a*	*b*
Schnitt-Fragment blau: interne Kontrolle	*223* + 39 + 9	*173* + *50* + 39 + 9	*117* + *242* + 192	*359* + 192	*120* + *191* + 149	*311* + 149	*136* + *33* + 97 + 8	*169* + 97 + 8	*64* + *159* + 101	*223* + 101

Natürlich muss für einen sicheren und effizienten Verdau ein dem Enzym angepasstes Milieu vorliegen. Alle Reaktionen wurden daher bei einer Temperatur von 37°C (Inkubation im Thermoblock) durchgeführt. Ideale Ionenkonzentrationen und pH-Werte liessen sich durch Zugabe von Puffern einstellen, welche vom Hersteller mitgeliefert wurden. Da die Enzyme bei Raumtemperatur schnell an Aktivität einbüssen, waren ich

bedacht, den Enzymvorrat nur zur Entnahme der benötigten Menge aus dem Eisschrank bei –20°C zu entnehmen und während dieser Zeit auf Eis zu lagern.
Als suffiziente Verdauzeit bis zum vollständigen Schnitt des Ausgangsprodukts ermittelten sich ca. 1h. Laut Auskunft des Herstellers ist aber sogar ein Verdau bis zu 16h ohne falsche Schnittstellen garantiert.
Die jeweiligen Enzyme und Puffer sind Tabelle 9 zu entnehmen.

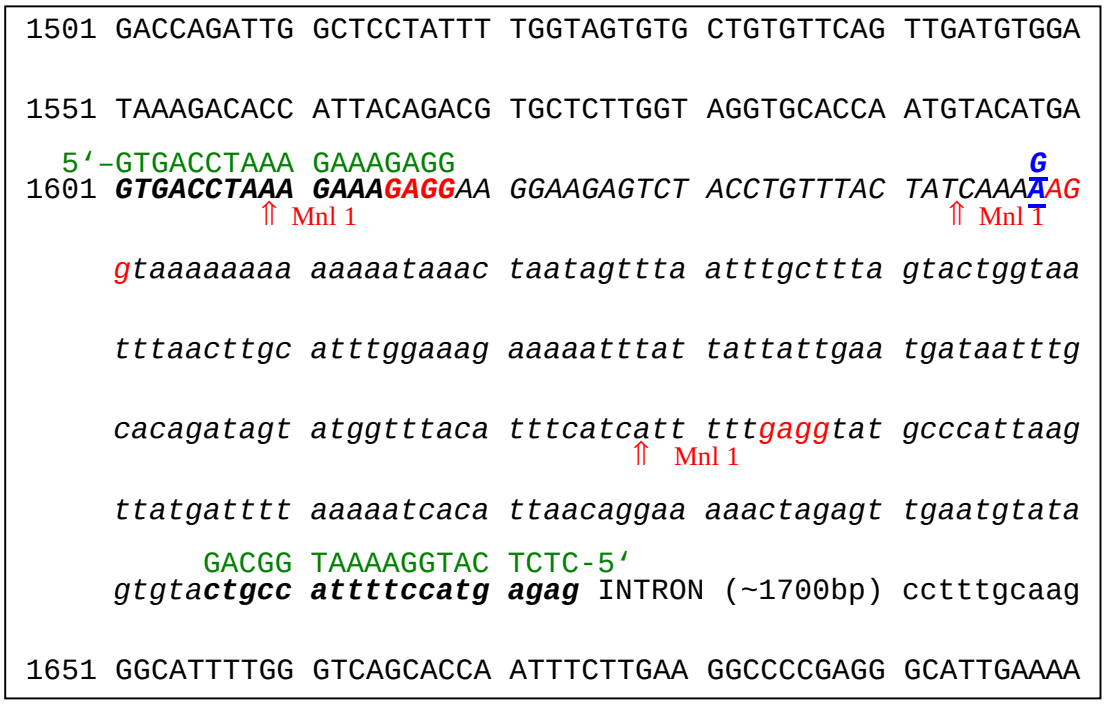


Abbildung 9: Ausschnitt aus dem GP Ia Gen.

Mit den Buchstaben A, G, T und C sind die vier Grundbausteine des menschlichen Genoms, Adenin, Guanin, Thymin und Cytosin symbolisiert. Kleine Buchstaben verweisen auf die Lokalisation im Intron, große im Exon. Die Nummerierung bezieht sich auf die Position im Exon.
Gezeigt sind:
Grün die Primer, die den gewünschten Ausschnitt zur HPA-5 Analyse demarkieren und zur Vervielfältigung des *kursiven* Abschnittes in der PCR führen.
Blau die dem Polymorphismus zugrundeliegende Punktmutation.
Rot die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym Mnl 1, der Pfeil deutet auf die Schnit tstelle.
An der polymorphen Stelle liegt nur für die Guanin-Variante diese Erkennungssequenz vor.

3.3.5 Gelelektrophorese

Dieser finale Schritt dient der Darstellung der nun ausreichenden Menge (PCR) an DNA-Fragmenten aussagekräftiger Länge (Restriktion).
Das Prinzip ist einfach: DNA-Moleküle werden in einem elektrischen Feld auf einem Medium bewegt. Wie weit unterschiedliche Moleküle wandern, hängt ab von konstantgehaltenen Parametern:

- der Dauer des angelegten Feldes (ca. 90 min.)

- der Spannung und resultierenden Feldstärke (150V)
- der Ladung des Moleküls, die vom Ionisationsgrad abhängt (pH-Milieu des Loading Buffers)
- der Porosität der Matrix (Agarosegel konstanter Zusammensetzung)und den physikalischen Determinanten des DNA-Moleküls (Größe), deren Effekt zur Analyse genutzt wird.

Vereinfacht gesagt wandern unter konstanten Bedingungen gleiche Fragmente immer gleich weit, wobei kleinere DNA-Moleküle auf dem Gel weiter bewegt werden.

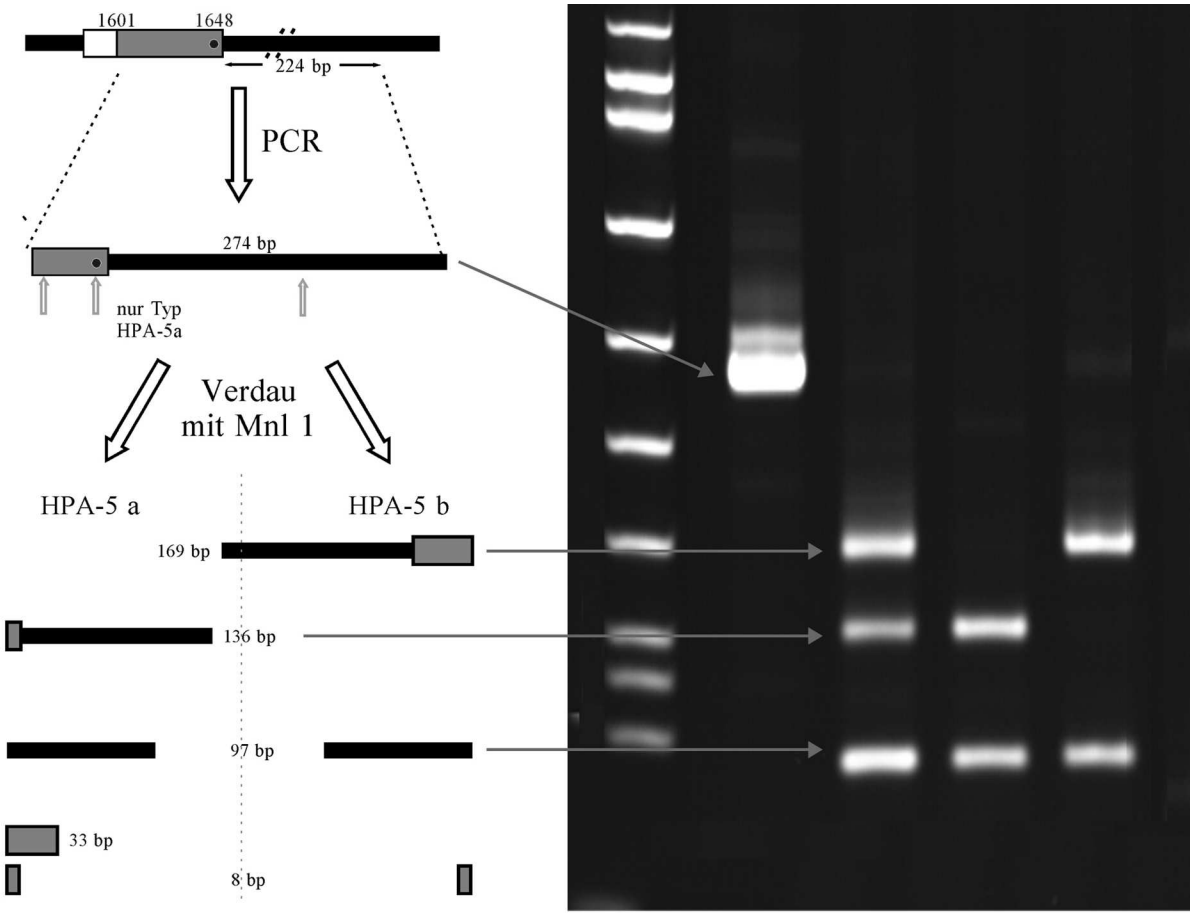


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Analyseablaufes und Synopsis zur Auswertung des finalen Gelergebnisses am Beispiel des HPA-5-Polymorphismus.

Dünne, massive Balken symbolisieren Intronabschnitte, dicke Balken Exonabschnitte. Die polymorphe Stelle ist mit einem blauen Punkt gekennzeichnet. Die gelben Pfeile markieren die Schnittstellen des Restriktionsenzyms Mnl I.
Das fotografierte Polyacrylamidgel zeigt auf Spur 1 die Banden eines DNA-Normmarkers, Spur 2 ein ungeschnittenes PCR-Produkt, Spur 3 einen heterozygoten HPA-5a/b Typus, Spur 4 einen homozygoten HPA-5a und Spur 5 HPA-5b Typ.
Die linke Bildhälfte veranschaulicht die Schritte ausgehend vom Genom: die selektive Vervielfältigung eines Abschnittes via PCR, den Restriktionsverdau und die resultierenden Fragmente, links für den HPA-5a und rechts für den HPA-5b Typus. Durch grüne Pfeile wird auf die entsprechenden Banden im rechts abgebildeten Polyacrylamidgel verwiesen. Die Fragmente von 8 und 33 bp stellen sich hier nicht dar.

Die Zuverlässigkeit des Versuchs wurde zusätzlich durch ein mitlaufendes Standard-DNA-Gemisch (Marker VIII, Boehringer, Mannheim, BRD) erhöht, welches eine Skala bekannter Fragmentgrößen markierte (siehe Spur 1 in Abbildung 8).

Da die Banden auf dem Gel dem Auge nicht unmittelbar sichtbar sind, wurde dem Medium eine stark DNA-affine Substanz (Ethidiumbromid) zugesetzt. Regt man die so markierte DNA auf einem Spezialschirm mit UV-Strahlung an, so kann man die Banden durch Lichtemission im sichtbaren Bereich deutlich ausmachen. Die Dokumentation bewerkstelligte ich mittels einer senkrecht über dem Schirm angebrachten Digitalkamera.
Praktisch von Vorteil war, dass schon während dem „unsichtbaren" Gellauf eine Kontrolle durch eine mitwandernde, blaue Bande (dem Loading-Puffer zugesetztes Bromphenolblau) vorhanden war.

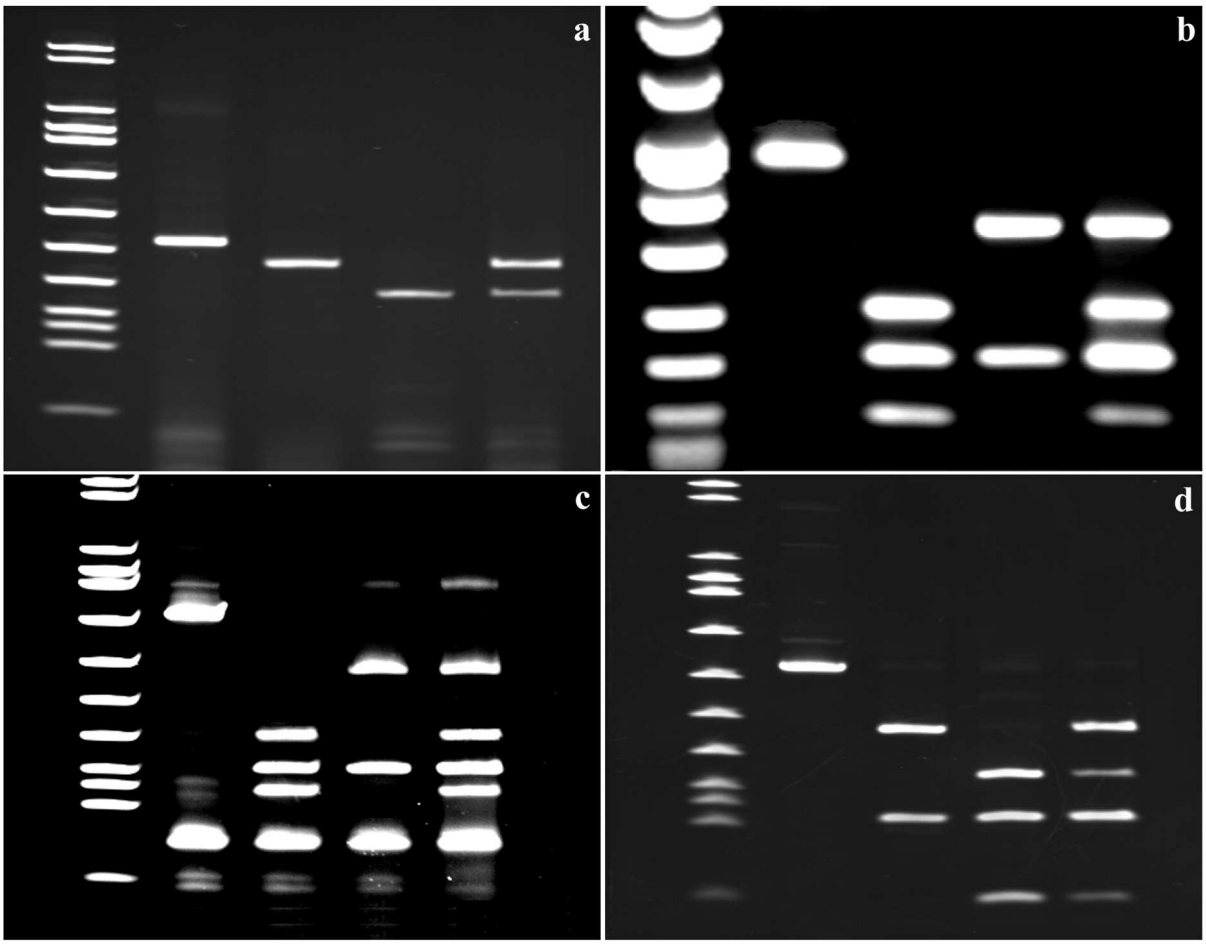


Abbildung 11: Ausschnitte aus Polyacrylamidgelen zur Demonstration der Gelresultate bei den Polymorphismen HPA-1 (a), HPA-2 (b), HPA-3 (c) und Bß448 (d).

Da die Banden auf dem Gel für das Auge nicht unmittelbar sichtbar sind, wurde dem Medium eine stark DNA-affine Substanz (Ethidiumbromid) zugesetzt. Regt man die so markierte DNA auf einem Spezialschirm mit UV-Strahlung an, so kann man die Resulate mit einer geeigneten Kamera festhalten. Die jeweils erste Spur zeigt einen DNA-Marker mit bekannten Fragmentlängen als „Maßstab". Bei allen Gelen lief auf Spur zwei ein ungeschnittenes PCR-Produkt, auf Spur drei und vier die beiden Homozygoten Ausprägungen und auf Spur fünf ein heterozygoter Allelträger.
Im Einzelnen sind dies auf Gel
(a) die Typen HPA-1a/a, HPA-1a/b, HPA-1b/b
(b) HPA-2a, HPA-2b und HPA-2a/b
(c) HPA-3b/b, HPA-3a/b und HPA-3a/a
(d) Bß448-1, Bß448-2 und Bß448-1/2
Die Längen der visualisierten DNA-Fragmente (in bp) nimmt von oben nach unten ab, genaue Daten zu den Einzelfragmenten je Genotyp sind Tabelle 9 zu entnehmen.

Die Agarosegele stellte ich selbst her. Dazu standen Gießformen und Gelkästen zur Verfügung. Für den Guss wurde eine erhitzte Mischung aus 10% Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE, Fa. Gibco) in destilliertem Wasser, zwei Prozent Agarose (Seakem GTG-Agarose, Biozym, Oldenburg, BRD) und zwei Promille Ethidiumbromid verwendet. Nach dem Festwerden wurden die Gele mit selbiger TBE-Pufferlösung in die Gelkästen eingebracht und die Taschen mit den Laufansätzen beschickt. Für diese Ansätze wir 15 µl des Verdaus mit 5 µl Ficoll-Puffer versetzt (1,5% in TBE-Puffer).

3.3.6 Auswertung

Wie schon beschrieben, geht aus der Konzeptionierung des Verdaus bereits hervor, welche Basenpaar-Längen potentiell entstehen sollen. Die Banden auf dem Gel diesen erwarteten Banden zuzuordnen wird dadurch einfach, dass als Skala gedachte Banden mitlaufender, vielbandiger Normmarker verwendet werden. Als weitere Orientierung lief grundsätzlich ein ungeschnittenes PCR Produkt mit. gibt Beispiele aller möglichen Gelbilder der polymorphen Typen. Abbildung 10 stellt nochmals am Beispiel HPA 5 den Zusammenhang zur Theorie her.
Zum Verständnis ist wichtig, dass aufgrund des diploiden Chromosomensatzes der menschlichen Soma-Zellen auch beide Allele in einem Individuum vorkommen können, also sowohl die Banden des ungeschnittenen, als auch der geschnittenen Fragmente gleichzeitig sichtbar sein können. Das Individuum ist also heterozygot bezüglich des polymorphen Gens.

3.3.7 Optimierung

Im Hinblick auf die geplanten fast 2000 Analysen war ich bedacht darauf, ausgehend von dem grundlegenden Prototyp des Bestimmungsverfahren diverse Optimierungen vorzunehmen. Solche waren für alle Schritte der experimentellen Durchführung möglich:

Polymerase-Ketten-Reaktion:
Wie schon oben dargelegt, war unter Verwendung von Primern, die in der aktuellen Literatur recherchiert werden konnten, nicht immer ein ideales Ergebnis zu erzielen. Konkret waren für HPA-2 und –3 oft zu schwache Signale aufgetreten, die eine Wiederholung erforderlich machten. Im Fall HPA-2 waren ich zudem mit dem Problem konfrontiert, dass durch das übernommene Primerpaar ein Schnittfragment, welches als interne Kontrolle allelunabhängig auftrat, nur um wenige Basenpaare vom Schnitt-

produkt des Typ b abwich. Die Gefahr einer Missinterpretation dieser nur schlecht auf dem Gel getrennten Fragmente war dadurch nicht auszuschließen.

Konsequent wurden hier neue Primer entworfen und getestet. Dabei ergab sich folgende Vorgehensweise: Als Grundstock war die Gensequenz für die entsprechenden Genloci vonnöten. Diese war für beide Polymorphismen bereits von anderen Gruppen sequenziert worden und konnte über eine Gendatenbank abgefragt werden.[79,153]
Im nächsten Schritt nahm man die Sequenzen in eine Oligonuktleotid-Software auf. Dieser Griff zur digitalen Verarbeitung anstelle einer „von Hand" Auswahl eines b eliebigen Primers an günstiger Stelle war unumgänglich, denn:

- jeder potentielle Primer muss auf eventuelle weitere Erkennungsstellen im gesamten Genom überprüft werden (Gefahr zusätzlicher, unerwünschter Markierung). Dies gilt auch für bestimmte ähnliche Sequenzen, da Primer oft nicht 100%ig selektiv für die selektierte Sequenz sind.
- Für jeden Primer kann eine bestimmte Temperatur ermittelt werden, bei der das „binding" besonders effektiv und selektiv stattfindet. Diese Temperatur muss für die PCR-Programmierung bekannt sein und v.a. bei up und downstream Primer möglichst nahe beieinander liegen.
- Ungünstige Primersequenzen bilden Schleifen in sich, sogenannte „hairpinloops" oder sind instabil. In beiden Fällen ist der korrekte Output unbefriedigend. Für solche Schwierigkeiten kann eine Prognose errechnet werden.

Mittels der PC-Applikation Oligo Primer Analysis Software (Version 5.0, NLB) konnte man all diese Faktoren einbeziehen und unter Eingabe der Zielregion ideale Primer berechnen.
Abschließend wurde diese Sequenz (wie auch alle anderen recherchierten Sequenzen) bei einem darauf spezialisierten Syntheselabor (PE Applied Biosystems, Weiterstadt, BRD) in Auftrag gegeben und man konnte so in kurzer Zeit auf die Oligonukleotide in einer Konzentration von etwa 5-10 nmol zugreifen.
Weitere Testreihe waren dann durchzuführen, damit eine optimale DNA-Einsatzmenge starke Signale lieferte.

Andere, wirtschaftliche Überlegungen schließlich zu weiteren Veränderungen der PCR bewogen.

- Um Zeit- und Materialeinsatz zu minimieren reduzierte ich die Ansatzmenge der PCR von den derzeit üblichen 50 µl auf 10 µl bei Pl^A. Dies entspricht exakt der Menge, die man im weiteren für einen Analyseverdau benötigen. Bei konstant guten Resultaten konnte man den Nachteil der fehlenden Reservemenge problemlos in Kauf nehmen - zugunsten der Möglichkeit im selben Reaktionsgefäß weiterzu-

arbeiten und einer 80%igen Kosteneinsparung. Für HPA-3 war der optimale Kompromiss bei einer Ansatzmenge von 20 µl erreicht. Die Zusammensetzung der Ansätze blieb dabei gleich, lediglich die Menge wurde proportional reduziert.

- Ein neues Thermocyklergerät wurde eingeführt, welches:
- durch eine Deckelbeheizung der PCR-tubes die Kondensation verhindert und den Ölauftrag entbehrlich macht.
- kleinere PCR-Cups einsetzt und damit der kleinen Ansatzmenge entgegenkommt
- kürzere Übergangszeiten zwischen den Zyklustemperaturen durch steilere Temperaturkurven erzielt. Die PCR-Zeit wurde damit um mehr als 20% verkürzt.
- Weiter konnte ich durch den Zusatzstoff TMAC (Tetra-Methyl-Ammonium-Chlorid) in geringsten Mengen die Selektivität der HPA-3 PCR erheblich verbessern.

Restriktionsverdau:

Die neuen, verringerten PCR-Volumina entsprachen den Vorgabemengen für den Verdau. Damit war es moglich unter Einsparung an Arbeitsmaterial direkt im PCR-Gefäß den Verdau anzusetzen, d.h. die Restriktionsenzyme und Puffer zupipettieren zu können. Im Falle des HPA-1-Verdaus waren die Rahmenbedingungen sogar so günstig, dass man ohne Verschlechterung die Pufferzugabe zum Verdau entbehren konnte.

Gelelektrophorese:

Das Herstellen von Agarose-Gelen stellte einen relativ hohen Zeitaufwand dar und ist relativ anfällig für störende Unregelmäßigkeiten in der Produktion. Dies und die vergleichsweise schlechte Schärfe und Auflösung der Banden war ausschlaggebend dafür, auf Polyacrylamidgele (PAA) umzusteigen. Versuche mit 6 und 12%igen Gelen, also unterschiedlichen Auflösungsoptima bei verschiedenen Fragmentgrößen, fielen zugunsten von 6%igen PAA-Gelen der Firma Novex (San Diego, Kalifornien) aus. Da hier kein Ethidiumbromid in der Gelmatrix eingebracht ist, müssen die Gele nach Lauf erst ca. 10 Minuten in einer Pufferlösung (200 ml Laufpuffer und 20 µl Ethidiumbromidlsg.) gefärbt werden. Anschließend wurden die Gele durch fünf minütiges Wässern in frischer Pufferlösung zur UV-Dokumentation vorbereitet.

3.3.8 Qualitätssicherung

Zwei potentiellen Fehlerquellen wurden gezielt entgegengewirkt: Durch Überprüfung und Kontrolle der *RFLP-Methodik*, sowie engmaschige Prävention und Kontrolle menschlicher und apparativer *Fehler der Screening-Phase*.

- Kontrollexperimente; Zwei Verfahren kamen zur Verwendung:

- Grundsätzliche Überprüfung der Endresultate durch ein zweites Bestimmungsverfahren:

  Wie in der Einleitung erwähnt, war der historische Weg der Entdeckung der Polymorphismen ursprünglich über die unterschiedlichen antigenen Eigenschaften der resultierenden Translationsprodukte, also der Rezeptormoleküle. So bindet der erhältliche Antikörper gegen CD 61 (*C*luster of *D*ifferentiation) in unterschiedlichem Maße an der Oberfläche von Thrombozyten verschieden-alleler megakaryozytärer Ursprungszellen. Diese Eigenschaft ist heute sehr gut semiquantitativ auf dem Wege der Laserdurchflußzytometrie erfassbar. Damit wäre dies an und für sich auch ein Weg der Polymorphismusanalyse, wenn auch diese Methode umständlicher und an die Verarbeitung frischen Blutes gebunden ist. Das Verfahren der Durchflußzytometrie ist in der einschlägigen Literatur beschrieben und soll hier nicht näher erläutert werden.

  Diese zweite Methode machte ich mir zunutze, um anhand von 58 Patienten beide Verfahren auf die Prüfbank zu stellen. Abbildung 12 setzt beide Ergebnisse auf verschiedenen Achsen zueinander in Relation. Dass die genanalytische Erfassung der Gruppen HPA-1b positiv bzw. negativ eine Einteilung ergibt, die auch für die zweite Methode eine plausible Trennung der Messwerte zeigt, bestätigt die Konsistenz der Verfahren.

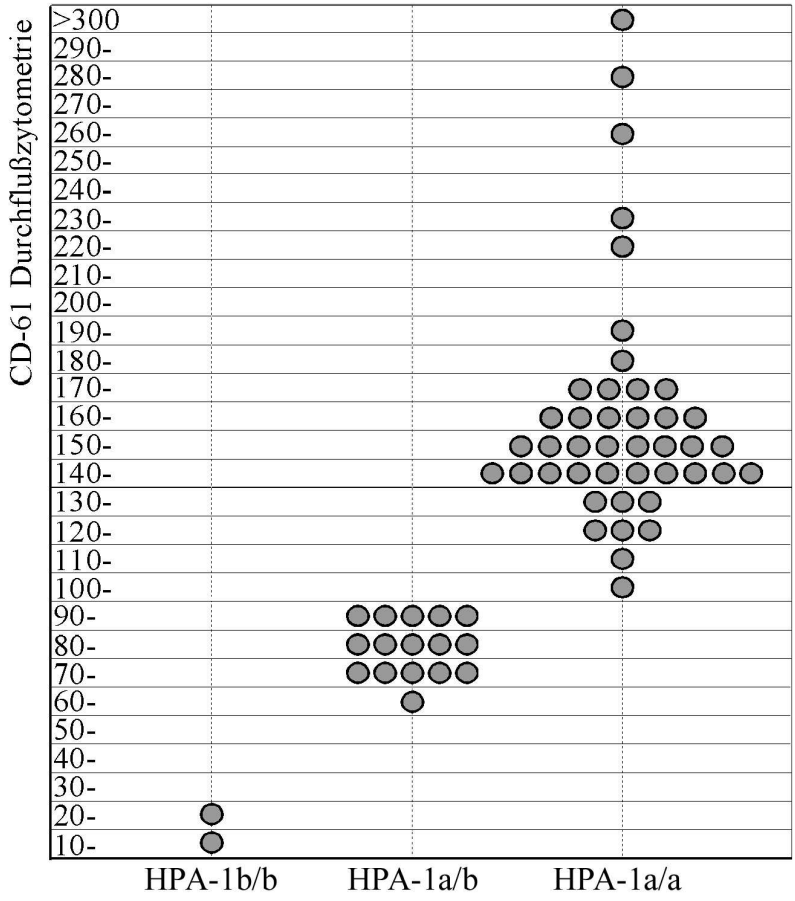


Abbildung 12: Bestimmung des HPA-1 Merkmals über Genanalyse und auf Basis durchflußzytometrischer Messung des polymorphen Oberflächenantigens.

Als Kontrollexperiment wurden beide Verfahren an 58 Patienten parallel angewandt. Jeder Punkt symbolisiert eine Patientenanalyse. Als Rechtswert wurde auf Basis der RFLP-Genanalyse zwischen HPA-1b-positiven und negativen Individuen unterschieden. Als Hochwert wurden semiquantitative Werte der Durchflußzytometrie zugrundegelegt, die auf Markierung mit Antikörpern gegen das Merkmal CD 61 beruht. Dieses **C**luster of **D**ifferentiation unterscheidet thrombozytäre Oberflächenstrukturen, die das Korrelat des HPA-1-Genpolymorphismus darstellen. Die kontinuierlich skalierten Werte wurden in Zehnerschritten zusammengefasst.

- Überprüfung der richtigen Auswertung des Verdaus und der Gelelektrophorese: Hierfür machte ich mir zu nutze, dass die große Zahl erhältlicher DNAsen mehrere Alternativen bei der Wahl für unsere polymorphe Region als Recognition-site bot. So wählte ich für den Pl^A –Verdau neben MspI das Enzym NclI aus. Die Fragestellung eines Versuchs mit 40 Patienten war, inwieweit bei Auswertung via beider Enzyme die Ergebnisse identisch ausfallen. Erfreuliche Aussage war, dass beide Wege ohne Abweichung zu den selben Resultaten führen. Damit kann man die theoretischen Überlegungen zur Analysemethodik und deren praktische Umsetzung bestätigt sehen. Die Daten zeigt Tabelle 10.

Tabelle 10: Doppelbestimmung mit verschiedenen Restriktionsenzymen

Genotyp	Ncl I-Verdau	MspI-Verdau
HPA-1a/a	29	29
HPA-1a/b	10	10
HPA-1b/b	1	1

- Qualitätssicherung im Screening: Eine große Studie die mehrere experimentellen Abläufen und die Arbeit verschiedener Laboranten vereint, birgt grundsätzlich die Gefahr der systematischen und unsystematischen Fehler. Um solche zu eliminieren, wurden präventive und kontrollierende Maßnahmen ergriffen.

  Präventive Maßnahmen waren hierbei:
- Umstellung auf das Arbeitsschema in einem Reaktionsgefäß ohne Umpipettierschritte (siehe Kap 3.3.7 Optimierung)
- Einführung eines einheitlichen, obligaten Protokolls bezüglich Arbeitsanweisung, Zeitpunkt und Art der Kennzeichnung aller Analysen und Beschränkung auf eine Maximalzahl paralleler Probenläufe unter Abstimmung auf die optimale Laborplatzkapazität.

  Kontrollierend wurde eingegriffen durch
- doppeltes Auswerten der dokumentierten Gele durch unabhängige Untersucher,
- komplette Doppelbestimmung ca. 20% aller Proben nach einem festen Stichprobenschema sowie komplette Doppelbestimmung aller Patientenproben mit Event. Dies geschah prinzipiell durch einen anderen Laboranten als bei der Erstbestimmung.

3.3.8 Statistik und Datenverarbeitung

Alle Patientendaten, prozedurale Parameter und läsionsbezogene Informationen, sowie Genbestimmungen wurden in der klinikeigenen Omnis-7-Datenbank verwaltet. Von

dort war die Abfrage und der Transfer in Statistiksoftware via MS Access 97 zuverlässig zu bewerkstelligen.

Für die Auswertung kam zum Einsatz:
- für einfache statistische Berechnungen (Zahl, Mittelwerte, Standardabweichung) Microsoft Excel 97
- für andere statistische Kalkulationen SPSS 4.0

Bei den prozeduralen und läsionsbezogenen Parametern sei angemerkt, dass teilweise einem Patienten mehrere Läsionen, bzw. Stentprozeduren zugeordnet waren. Hier wurde grundsätzlich nach dem Zufallsprinzip eine Läsion/Prozedur für die Analyse ausgewählt. Ausgenommen hiervon waren nur Patienten, bei denen eine Stentthrombose eintrat.: hier wurde die Prozedur und Läsion selektiert, die assoziiert mit dem Event war.

4. Ergebnisse

Im folgenden sei die Auswertung des Datensatzes skizziert und im Detail tabellarisch wiedergegeben.

4.1. Patientencharakteristika

Die subakute Stentthrombose war bei 9 Patienten am Tag der Prozedur, bei 8 am Folgetag, zweien am Tag 3 und einem am Tag 6 beobachtet worden. Bei den verbleibenden 6 der 28 Patienten trat die Stentthrombose nach Tag 6 auf. Bei allen Patienten konnte das verschlossene Gefäß im Rahmen einer PTCA wiedereröffnet werden.

In beiden Gruppen überwiegen die männlichen Patienten gegenüber weiblichen, das Altersmittel war dabei 63,3 Jahre in der Kontrollgruppe, 65,4 Jahre in der Stentthrombose-Gruppe.
Hinsichtlich der kardiovaskulären Risikofaktoren wurde streng nach den gängigen Kriterien der WHO bewertet.
Die LV-Funktion wurde nach dem gängigen Vier-Stufen-Schema hinsichtlich hypo- und akinetischer Areale beurteilt und ab Stufe 2 als reduziert klassifiziert. Eine Mehrgefäßerkrankung wurde ab zwei betroffenen Gefäßen diagnostiziert.

Tabelle 11: Klinische Charakteristika der Gruppen in der Pilotstudie

	Patienten mit Stentimplantation (n=176)		
	Patienten ohne Stentthrombose (n=148)	*	Patienten mit Stentthrombose (n=28)
Weibliches Geschlecht (%)	113/35	*(P=0.38)*	19/9
Alter in Jahren (Mittelwert±SD)	63.3 ± 9.8	*(P=0.31)*	65.4 ± 10.0
Aktive Raucher, n (%)	53 (35.8)	*(P=0.09)*	5 (19.2)
Hypercholesterinämie, n (%)	61 (41.2)	*(P=0.25)*	8 (30.8)
Arterieller Bluthochdruck, n (%)	83 (56.1)	*(P=0.39)*	13 (50.0)
Diabetes mellitus, n (%)	29 (19.6)	*(P=0.84)*	5 (19.2)
Reduzierte LV-Funktion, n (%)	27 (18.2)	*(P=0.25)*	8 (28.6)
Instabile Angina pectoris, n (%)	38 (25.7)	*(P=0.18)*	11 (44.0)
Mehrgefäßerkrankung, n (%)	95 (64.6)	*(P=0.50)*	20 (74.1)

* gibt den statistischen Unterschied zwischen beiden Gruppen wieder

Die Studiengruppen unterscheiden sich in den genannten Eigenschaften nicht signifikant. Dennoch sei angemerkt, dass auch hier ein Trend in Bezug auf anerkannt prädisponierende Größen für die Stentthrombose ausmachen werden konnte:

Die LV-Funktion galt unter den 28 Patienten mit Stentthrombose bei 28,6% als reduziert, unter den event-freien Patienten bei 18,2%, instabile Angina pectoris lag bei 11/28 (44%) gegenüber 38/148 (25,7%) vor. Diese Faktoren waren also häufiger bei den Patienten mit späterer Komplikation zu finden, wichen aber nicht signifikant voneinander ab. Die klassischen Risikofaktoren der KHK (Rauchen, Hypercholesterinämie, Hypertonus, diabetes mellitus) traten dagegen - ohne aber Signifikanzniveau zu erreichen – in der Kontrollgruppe öfter auf. Alle Daten sind in Tabelle 11 zusammengeführt.
Beide Gruppen scheinen nach dieser Analyse der Basiseigenschaften ausreichend vergleichbar zu sein.

4.1.2 Prozedurale Charakteristika

Die Indikation zur Stentimplantation war in der Mehrzahl ein ungenügender Lumengewinn nach primärer Ballonangioplastie (102 von 148 Patienten, bzw. 17 von 28), lediglich in 31,1 % der Kontrollen und 39,3% der Event-Patienten waren Dissektionen ausschlaggebender Grund zum Stenting.
Die Stents wurden hauptsächlich in die linke Koronararterien, hier v.a. in deren Äste ramus interventricularis anterior (LAD) und ramus circumflexus (LCx), sowie in die

Tabelle 12: Prozedurbezogene Daten

	Stentpatienten (n=176)		
	ohne Stentthrombose (n=148)	mit Stentthrombose (n=28)	P*
Stentlokalisation, n (%)			
LCA	6 (4,1)	0 (0,0)	0,32
LAD	59 (39,8)	14 (50,0)	0,36
LCx	29 (19,6)	7 (25,0)	0,55
RCA	51 (34,5)	6 (21,4)	0,22
CAVB	3 (2,0)	1 (3,6)	0,64
Prozedurale Charakteristika (MW ± SD)			
Mehr-Stent-Patienten, n (%)			
ein Stent	79 (53,4)	11 (39,3)	0,21
zwei Stents	41 (27,7)	10 (35,7)	0,43
drei oder mehr Stents	28 (18,9)	7 (25,00)	0,5
Ballon-Gefäß-Verhältnis	1,02 ± 0,09	1,06 ± 0,10	0,05
Max, Inflationsdruck, atm	13,3 ± 3,19	12,6 +/- 3,71	0,34
Referenzdurchmesser, mm	3,13 ± 0,53	2,82 ± 0,51	0,004
Diameter stenosis, %			
vor der Prozedur	74,1 ± 15,6	77,1 ± 15,9	0,36
nach der Prozedur	7,04 ± 6,18	5,87 ± 6,32	0,37

*gibt den statistischen Unterschied zwischen beiden Gruppen wieder

rechte Koronararterie und selten in Bypässe inseriert. Dominierend war die Insertion in die LAD (39,9 % der Kontrollen, bzw. 50% der Gruppe mit Event); In 46,6% bzw. 60,7% sich die interventionellen Kardiologen zum Einsatz mehrer Stents entschlossen.
Mit Drücken um 13 atm (13,32 bzw. 12,68 atm) wurde bei einem Ballon-Gefäß-Verhältnis von 1,02 bzw. 1,06 in Gefäßen von ca. 3mm (3,13 bzw. 2,82 mm) gearbeitet. Diese Referenzdurchmesser unterscheiden sich zugunsten der kleineren Gefäße in der Stentthrombosegruppe zwischen den Studiengruppen signifikant, was den Trend zur Thrombosierung kleinerer Arterien bestätigt.

Die errechneten p-Werte für den Vergleich aller anderen genannten Größen liegen über dem gesetzten Signifikanzniveau von p=0,05. Dies gilt auch für die präprozedural vorgefundenen durchmesser-bezogenen Stenosegrade, hier konnten Verengungen von 74,10 bzw. 77,08 % durch die Stentplazierung auf 7,04 bzw. 5,87% reduziert werden. Damit ist die Homogenität der Gruppen hinsichtlich der Durchführung im Herzkatheterlabor erfüllt.

4.1.3 Experimentelle Ergebnisse

Die Analyse der Genotypen war in allen Fällen und für alle Polymorphismen erfolgreich und eindeutig. Abweichungen in den Kontrollexperimenten und Doppelauswer-

Tabelle 13: Ergebnisse der Genanalyse in der Pilotstudie

	Alle (n=250)	**Patienten mit Stentimplantation (n=176)**			**Kontrollen (n=74)**
Gentypus, n (%)		ohne Stent-thrombose (n=148)	mit Stent-thrombose (n=28)	alle Stent-patienten (n=176)	keine angiografischen Zeichen einer KHK
HPA-1a/a	171 (68,4)	102 (68,9)	18 (64,3)	120 (68,2)	51 (68,9)
HPA-1a/b	70 (28,0)	41 (27,7)	8 (28,6)	49 (27,8)	21 (28,4)
HPA-1b/b	9 (3,6)	5 (3,4)	2 (7,1)	7 (4,0)	2 (2,7)
HPA-2a/a	196 (78,4)	120 (81,1)	27 (96,4)	147 (83,5)	64 (86,5)
HPA-2a/b	51 (20,4)	27 (18,2)	1 (3,6)	28 (15,9)	10 (13,5)
HPA-2b/b	3 (1,2)	1 (0,7)	0 (0,0)	1 (0,6)	0 (0,0)
HPA-3a/a	92 (36,8)	54 (36,5)	8 (28,6)	62 (35,2)	30 (40,5)
HPA-3a/b	113 (45,2)	69 (46,6)	13 (46,4)	82 (46,6)	31 (41,9)
HPA-3b/b	45 (18,0)	25 (16,9)	7 (25,0)	32 (18,2)	13 (17,6)
HPA-5a/a	213 (85,2)	126 (85,1)	27 (96,4)	153 (86,9)	60 (81,1)
HPA-5a/b	35 (14,0)	22 (14,9)	1 (3,6)	23 (13,1)	12 (16,2)
HPA-5b/b	2 (0,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (2,7)
Bß448 1/1	160 (64,0)	95 (64,2)	16 (57,1)	111 (63,0)	49 (66,2)
Bß448 1/2	78 (31,2)	45 (30,4)	10 (35,7)	55 (31,3)	23 (31,1)
Bß448 2/2	12 (4,8)	8 (5,4)	2 (7,2)	10 (5,7)	2 (2,7)

tungen gab es nicht. Tabelle 13 zeigt die absolute und relative Zahl an homozygoten und heterozygoten Individuen beider Studiengruppen, sowie der zusätzlichen Patienten ohne pathologischen Koronarbefund.

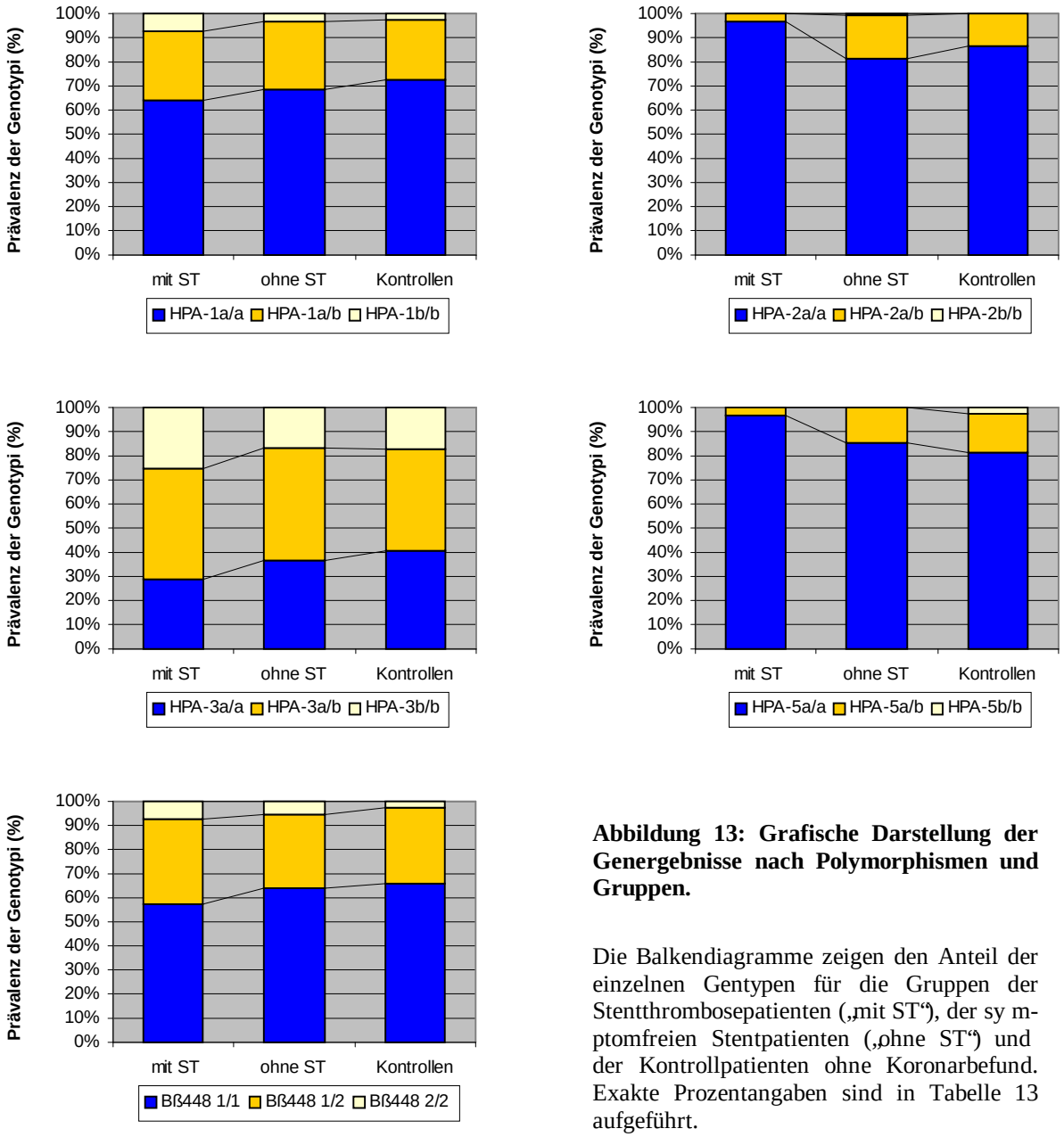


Abbildung 13: Grafische Darstellung der Genergebnisse nach Polymorphismen und Gruppen.

Die Balkendiagramme zeigen den Anteil der einzelnen Gentypen für die Gruppen der Stentthrombosepatienten („mit ST"), der sy m-ptomfreien Stentpatienten („ohne ST") und der Kontrollpatienten ohne Koronarbefund. Exakte Prozentangaben sind in Tabelle 13 aufgeführt.

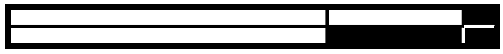
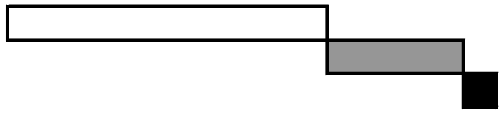
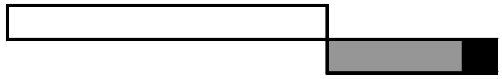
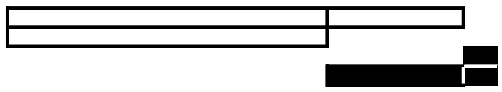
Betrachtet man im Überblick alle 250 Patienten der Studie, so ermittelten sich, jeweils in der Reihenfolge Typ a/a - a/b - b/b, für HPA-1 eine Verteilung von 68,4 – 28,0 und 3,6 Prozent, für HPA-2 von 78,4 – 20,4 und 1,2 Prozent, für HPA-3 von 36,8 – 45,2 – 18,0 Prozent, bei HPA-5 85,2 – 14,0 und 0,8 Prozent und schließlich bei Bß448 von 64,0 – 31,2 und 4,8 Prozent.

Abbildung 13 stellt den umfangreichen Datensatz bildlich dar.

4.2 Statistische Auswertung der Gendaten

Im experimentellen Abschnitt wurden die Gengruppenzugehörigkeit für jeden der fünf Polymorphismen exakt nach den beiden homozygoten und dem heterozygoten Gentyp analysiert.
Aufgabe der statistischen Analyse war es nun, diesen Datensatz präzise auf Signifikanzen bei der gesetzten Fragestellung zu untersuchen: Taucht eine Genvariante in der Stentthrombosegruppe gehäuft gegenüber der Stentgruppe ohne Komplikation auf und kann damit als prädisponierende Größe interpretiert werden?
Um dieser Aufgabe gerecht zu werden, wurden die Patienten in jeder Gruppe danach unterteilt, ob das Typ b Allel vorliegt. Dieses Allel ist in allen Fällen die seltenere Variante.
Es folgen daraus also zwei Untergruppen, nämlich die homozygoten Typ a Träger, und im Gegensatz dazu Patienten, die in homo- oder heterozygoter Form das Typ b Allel tragen.
Diese Aufteilung ist in Tabelle 14 schematisch erklärt, hier am Beispiel des HPA-1 Polymorphismus.

Tabelle 14: Genverteilung in der Studienpopulation bezüglich des Pl^A - Polymorphismus

Gesamtgruppe im diallelen, kodominanten HPA-1-System	250 (100)	
Homozygote HPA-1a-Träger	171 (68,4)	
Heterozygote HPA-1a/b-Träger	70(28,0)	
Homozygote HPA-1b-Träger	9 (3,6)	
Patienten ohne HPA-1b-Allel	171 (70,6)	
Patienten mit HPA-1b-Allel	79 (31,6)	
Quotient der Allelfrequenzen HPA-1a zu HPA-1b	0,83:0,17	

Allel HPA-1b Allel HPA-1a in Klammern: % der Gesamtpatientenzahl

Für die nun anschließende Statistik eignete sich optimal der Chi-Quadrat-Test: Aus der ermittelten Verteilung in der Stentthrombosegruppe wird vergleichend mit der nach den Daten der eventfreien Gruppe zu erwartenden Verteilung eine Prüfgröße errechnet. Im zweiten Schritt wird dieser eine Wahrscheinlichkeit p zugeordnet, die bei der

Interpretation dem vorabfestgelegten Signifikanzniveau (hier p< 0,05) gegenübergestellt wird.
Diese Auswertung wurde für alle fünf Polymorphismen durchgeführt.
Ergänzend wurde auch nach diesem Schema die Vergleichsgruppe der Patienten ohne KHK gegenüber allen 176 gestenteten Patienten statistisch analysiert.
Beide Ergebnisseserien sind in Tabelle 15 aufgelistet.

Tabelle 15: Statistische Berechnungen zu den Genergebnissen

Vergleich von*	HPA-1	HPA-2	HPA-3	HPA-5	Bß448
Gruppe mit ST und Gruppe ohne ST	0,60	0,04	0,38	0,10	0,44
Gruppe ohne KHK und allen Stentpat.	0,83	0,25	0,15	0,05	0,38

* p-Wert der Chi-Quadrat-Teststatistik, je Polymorphismus zwei Gruppen aufgeteilt nach Typ b positiv oder negativ

Alle Werte der Chi-Quadrat-Teststatistik liegen nicht unter dem Signifikanzniveau von 0,05 und gelten daher als *nicht signifikant.* Ausnahme ist der Test für beide Stentgruppen des HPA-2 Polymorphismus, der mit p=0,04 unter diesem Schwellenwert liegt. Ein Blick auf Tabelle 13 ruft aber wieder in Erinnerung, dass die signifikante Verteilungsabweichung hier aber zugunsten der wesentlich häufigeren Genvariante HPA-2a variiert.
Der angewendete statistische Modus im Kontext der Resultate wird nochmals detailliert in Kap. 5.3 und 5.1.3 diskutiert.

Tabelle 16: Allelfrequenzen

	Stentpatienten (n=176)			**Kontrollen (n=74)**	
Allel-frequenz	ohne Stent-thrombose (n=148)	P*	mit Stent-thrombose (n=28)	keine angiograf. Zeichen einer KHK	P#
HPA-1a	0,83		0,79	0,83	
HPA-1b	0,17	0,56	0,21	0,17	0,58
HPA-2a	0,90		0,98	0,82	
HPA-2b	0,10	0,06	0,02	0,18	0,29
HPA-3a	0,60		0,52	0,61	
HPA3b	0,40	0,33	0,48	0,39	0,27
HPA-5a	0,93		0,98	0,89	
HPA-5b	0,07	0,18	0,02	0,11	0,05
Bß448 1	0,79		0,75	0,82	
Bß448 2	0,21	0,57	0,25	0,18	0,38

** gibt den statistischen Unterschied zwischen Patienten mit und ohne*

 # zwischen Kontroll- und Stentthrombosegruppe wieder.

Eine weitere Berechnung, die an eine Genanalyse anschließen sollte, ist die Kalkulation und Überprüfung des Hardy-Weinberger-Äquilibriums. Dies wurde für alle drei Gruppen nachvollzogen, die entsprechenden 15 Wertepaare sind in Tabelle 16 zu ersehen. In der tabellarischen Aufstellung sind auch wieder die Teststatistiken des Chi-Quadrat Tests ergänzt. Keiner der p-Werte lag unter dem Signifikanzniveau.

4.3 Überblick über den Ergebnisteil

Als Einstieg in die anschließende Diskussion sollen hier die Resultate in Stichpunkten kurz repetiert werden:

- Es konnten keine statistisch signifikanten Abweichung hinsichtlich der klinischen Basisparameter, wie den kardiovaskulären Risikofaktoren, zwischen Stentpatienten mit und ohne Stentthrombose gefunden werden.

- Dennoch zeigte sich ein relativer Trend der Parameter einer reduzierten LV-Funktion und einer instabilen Angina Pectoris zum Risikofaktor für das Auftreten der Stentthrombose

- Die Parameter der Stentingprozedur in beiden Gruppen waren nicht signifikant voneinander differierend. Ausnahme war der Referenzdurchmesser des gestenteten Gefäßes: Bei den Patienten mit späterer Stentthrombose wurde im Mittel in kleineren Gefäßen gearbeitet. Diese Abweichung war mit p=0,004 hochsignifikant.

- Der HPA-1 Polymorphismus des Fibrinogenrezeptors tritt mit seiner selteneren Typ b- Variante nicht signifikant gehäuft unter den Patienten mit gegenüber den Stentpatienten ohne Stentthrombose auf.

- Die seltenere Typ-b Genausprägung des HPA-2 Polymorphismus (von Willebrand-Rezeptor) kann in der Pilotstudie nicht statistisch-gehäuft mit dem Auftreten der Stentthrombose in Verbindung gebracht werden. Hier tritt sogar die häufigere Typ-a Variante unter den Patienten mit der untersuchten Komplikation deutlich (p=0,04) öfter auf.

- Der Bak-Polymorphismus des Fibrinogenrezeptors weist in dieser Studie keine signifikante Assoziation zur Stentthrombose auf.

- Der HPA-5 Polymorphismus des Kollagen-Rezeptors tritt mit keiner Allelvariante signifikant gehäuft unter Stentthrombosepatienten auf.

- Für die Varianten des Bß448-Polymorphismus auf dem Fibrinogen-Gen findet sich keine statistisch begründete Auffälligkeit unter den klinischen Gruppen der Pilotstudie.

- Die Oberflächendichte eines durch den Antikörper CD-61 definierten Merkmals auf dem thrombozytären Fibrinogen-Rezeptor ist regelmäßig mit dem genetischen Pl^A-Typus verknüpft.

5. Diskussion

An dieser Stelle der Arbeit soll kritisches Resumee aus den Grundlagen zu Thrombozyten und Stenting aus der Einführung, dem entworfenen Analysekonzept und den experimentellen Ergebnissen gezogen werden. Dabei werden, ausgehend von pathophysiologischen Überlegungen, diese Punkte dialektisch abgewägt:

- Der Stellenwert des experimentellen Konzepts
- Der angelegte statistische Rahmen
- Die Studienpopulation
- Die Ergebnisse im Kontext des aktuellen Forschungsstandes.

5.1 Pathophysiologische Überlegungen

In der Einleitung wurden schon einige Grundlagen zu Thrombozyten und deren Rezeptoren im Kontext der Thrombose besprochen. Hier soll das Pro und Kontra eines Einflusses der Polymorphismen auf thrombotische Vorgänge anhand verschiedener Linien der Beweisführung aufgearbeitet werden und die Aussagekraft der gewonnenen experimentellen Daten jeweils im Zusammenhang evaluiert werden.

5.1.1 Lage des polymorphen Locus

Die beschriebenen Polymorphismen des HPA-Systems bedingen den Austausch einer Aminosäure auf dem jeweiligen Rezeptormolekül. Dennoch ist *keiner* dieser Loci direkt *innerhalb* einer Sequenz gelegen, die bisher als relevante Bindungsstelle beschrieben wurde. Dies könnte einen funktionellen Einfluss fraglich erscheinen lassen.

Andererseits muss man aber zwei Aspekte berücksichtigen:

Intramolekulare Kräfte, wie nichtkovalente Brücken zwischen Aminosäuren an verschiedenen Stellen der Kette, bewirken eine komplexe Konformation des Moleküls im dreidimensionalen Raum. Die Affinität von Rezeptor und Ligand ist nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip wiederum in hohem Maße von der räumlichen Struktur beider Komponenten abhängig. Dieser Effekt hat auch Konsequenzen für diese Arbeit.
Denaturiert man nämlich die Rezeptormoleküle chemisch, so reagiert das Molekül in seiner linearen Form nicht mehr mit bindungsspezifischen Antikörpern.[20,154] Weiter sehen Daten von Calvete et al. zum räumlichen Aufbau des GPIIIa-Moleküls den Pl^A-

Polymorphismus in räumlicher Nähe der Bindungsregion,[76] was als möglicher Einfluss auf die Fibrinbindung interpretiert wird.[4]
Auch für das GPIIb-Molekül Take et al. den Einfluss des Molekülaufbaus demonstriert: Eine kleine Aminosäurenänderung resultiert in einer veränderten sekundären Glykosilierung des Rezeptors. Dies wiederum führte zu einer Alteration der Affinität an Antikörper.[35]
Die Arbeit von Meiklejohn et al. legt aber nahe, dass sich dieses Konstrukt für den HLA-1 Polymorphismus nicht auf die spezifische Affinität des Fibrinogenrezeptors übertragen lässt: Die Anwesenheit des HLA-1b Allels brachte in der Durchflusszytometrie keine erhöhte Bindung an Fibrinogen zum Vorschein.[92]
Zudem wurde kürzlich erneut gezeigt, dass die transmembranalen Rezeptormoleküle in Ihrer Bedeutung nicht nur durch die Affinität der Bindungsstelle definiert sind; Vielmehr legten Feng et al. in vitro dar, dass die Aktivierung des Thrombozyten bei homo- oder heterozygotem Vorliegen des HPA-1b Gens stärker ausfällt. Dies belegten sie anhand Messungen des verbleibenden Epinephrin und ADP Speichers in aktivierten Thrombozyten.[32]
Obwohl obige Beobachtungen zwar Teile der kausalen Kette zwischen Polymorphismus und Klinik beleuchten, hat sich ein statistischer Zusammenhang zwischen dieser HPA-1b Genvariante und der Stentthrombose in unserem Krankengut nicht verifiziert.

Ein zweites wichtiges Schlagwort ist die Genkoppelung: Das menschliche Erbgut wird nicht in beliebig kleinen Teilen bei der Vererbung durchmischt. Dadurch ist es möglich, dass unabhängig entstandene Mutationen über weitere Strecken der Evolution gekoppelt vererbt werden. Diese Koppelung kann bedeuten, dass Effekte, die im Zusammenhang mit einem bekannten Polymorphismus auftreten, funktionell über eine regelmäßig gekoppelte Mutation an anderer Stelle begründet sind.
Anhaltspunkte dieses Aspekts für meine Arbeit lassen sich in der Literatur ausfindig machen. Simsek et al. beschreiben eine Koppelung zwischen dem hier untersuchten HPA-2 Polymorphismus und einem anderen Längenpolymorphismus.[13] Dieser wiederum bewirkt verschiedene Abstände der Bindungsregion des Glykoproteins zur Membran des Thrombozyten.[155]
Walchshofer et al. berichten von einer Genkopplung des Pl^{A2}-Locus mit einem $Leu_{40}\rightarrow$Arg Polymorphismus, dem die Gruppe aber bis dato keinen funktionellen Effekt zuschreibt.[92]
Eine ähnliche, interessante Beobachtung wurde von Corral et al. gemacht: Der hier untersuchte HPA-5 Polymorphismus an Position 505 der AS-Kette wird in verschiedenen Kombinationen mit einer weiteren Mutation an Position 807 vererbt. Gemeinsam beeinflussen sie scheinbar die Kollagenrezeptordichte auf der Thrombozytenoberfläche. Konkret korreliert die Kombination HPA-5a/a in Kombination mit 807 T/T mit

einer besonders hohen Expression des Kollagenrezeptors. Die naheliegende Schlussfolgerung einer erhöhten Koagulabilität im Sinne der Stentthrombose konnte ich aber zumindest isoliert für den Typus HPA-5a/a nicht demonstrieren.

Eine Evaluation eines Polymorphismus rein aus theoretischen Überlegungen zu dessen Lokalisation heraus ist also differenziert zu sehen. Auch wenn man also für untersuchten Polymorphismen keine Beteiligung an der Entstehung der kardio-vaskulären Thrombose nahelegte, kann damit nicht ausgeschlossen werden, dass diese Polymorphismen direkt oder über eine Genlinkage als Marker für andere Thrombozytenfunktionen gelten könnten. Beispielsweise steht weiter die noch nicht definitiv geklärte Frage einer thrombozytären Auslösung des Restenoseprozesses im Raum.

5.1.2 Bedeutung von Punktmutationen

Alle beschriebenen Polymorphismen sind Punktmutationen, bewirken also lediglich den Austausch *einer* Aminosäure, was man in Relation zu einer Molekülgröße im Kilo-Dalton-Bereich setzen muss. Kann eine derart „kleine" Veränderung eine relevante Konsequenz tragen? So waren für die Polymorphismen HPA-2, -und -3 noch keinerlei funktionelle Folgen im Gespräch.
Andererseits konnten andere Punktmutationen auf dem Glykoprotein GPIb für folgenschwere Änderungen der Form und Bindungsregion verantwortlich gemacht werden.[75,133,164] Zudem ist das Auftreten des HPA-1b-Allels mit einer erhöhten Plättchenaktivierung, das HPA-5a-Allel mit einer erhöhten Rezeptorexpression in Verbindung gebracht worden (siehe 5.1.1).[32] Gerade auch immunogene Reaktionen seitens des B- und T-Zell-Systems sind hochsensitiv für minimale Veränderungen der Konformation.[108,152] Dies erklärt auch die verheerenden Folgen der untersuchten Rezeptorpolymorphismen bei Erkennung der humanen Plättchenalloantigene durch das Immunsystem: Die Krankheitsbilder der NATP und PTP wurden oben bereits beschrieben (Kapitel 1.2.3).

Die Konsequenzen einer einzelnen Aminosäurensubstitution können also sehr groß sein.[135] Ich halte die Fragestellung, die einen weiten kausalen Bogen zwischen der singulären Basensubstitution und der lebensbedrohlichen Stentthrombose spannt, aus diesem Blickwinkel durchaus für appropriat. Trotz der immensen Bedeutung der HPA-Polymorphismen auf den Gebieten der Immunologie und Transfusionsmedizin, konnten ich eine ähnliche Auswirkung für das kardiologische Problem der Stentthrombose für die Polymorphismen *HPA-1, -3, -5 und Bß448* auf statistisch signifikantem Niveau *nicht* finden.

Von Interesse ist dagegen das Resultat der HPA-2-Bestimmungen. Hier wirft der statistische Vergleich einen p-Wert von 0,04 aus, der also unter unserem Signifikanzniveau von p=0,05 liegt. Zugrunde liegt ein Anstieg der Allelfrequenz des Typ HPA-2a von 81,1% unter den komplikationsfreien Stentpatienten auf 96,4 % der Stentthrombosepatienten.

5.1.3 Bedeutung heterozygoter Träger

Wie schon dargestellt, können Individuen Träger beider Allele der jeweiligen Polymorphismen sein – es handelt sich bei allen fünf untersuchten Polymorphismen um diallele Systeme. Dadurch stellt sich die Frage, inwieweit dann auch beide Varianten auf Ebene des Aminosäure-Austausches exprimiert werden. Beziehungsweise, inwieweit eine eventuell veränderte Funktionalität einer Variante also auch bei Heterozygoten obligat präsent wäre.

Anhaltspunkte liefern hier Antikörper-Versuche. Natürliche Antikörper gegen eine der beiden Varianten machten ursprünglich auf das Vorliegen eines polymorphen Systems aufmerksam (siehe 1.2.3) und wurden alsbald isoliert. Heute kann man auf polyklonale Sera und monoklonale Antikörper zurückgreifen,[100,161] die eine Phänotypisierung nach dem Prinzip der MAIPA (monoclonal antibody-specific immoblilization of platelet antigens) erlauben.[69] Dies ist aber nicht nur für homozygote Merkmalträger durchführbar, sondern Blutplättchen heterozygoter Träger binden Antikörper gegen beide Varianten.[69] Weiss et al stellten mit ihrem Pl^{A1}-hochaffinen Antikörper SZ 21 auch heraus, dass heterozygote Allelträger zwar quantitativ weniger Antikörper pro Thrombozyt binden als $Pl^{A1/A1}$ typisierte Personen; Andererseits zeigen diese Plättchen aber eine wesentlich höhere Antikörperbeladung als Thrombozyten von Patienten, die nur das kaum SZ 21 affine Pl^{A2} Merkmal besitzen.
Die Zuverlässigkeit dieses Phänomens machten ich mir schließlich über die kommerziell erhältliche Variante, den CD61 Antikörper für Kontrollexperimente meiner Genbestimmungen zunutze (siehe Kap. 3.3.8).

Einen Schritt weiter geht die Arbeit von van Leeuwen et al. Anti-Pl^{A1}-Antikörper blocken laut ihrer Arbeit die Fibrinogenbindung bei Heterozygoten teilweise,[162] Furihata et al. ergänzten dass bei Homozygoten eine Antikörperinhibition des Rezeptors die Bindung völlig unterbindet.[90] Dies wurde kürzlich auch auf funktioneller Ebene untermauert: Feng et al. zeigten für das HPA-1b Allel bereits bei heterozygotem Vorlie-

gen einen Anstieg der Plättchenaktivierung, ein Effekt der bei Homozygotie weiter zunimmt.[32]

Eine Expression beider Allele gilt auch für die anderen HPA-Polymorphismen,[161] man kann also folgern, dass in diesen kodominanten Erbgängen tatsächlich beide molekularen Varianten der Rezeptoren in relevanten Anteilen auf der Plättchenoberfläche vorhanden sind.

Vor dem Hintergrund dieser Rationale sollte man auch die Ergebnisse von Assoziationsstudien kritisch betrachten:

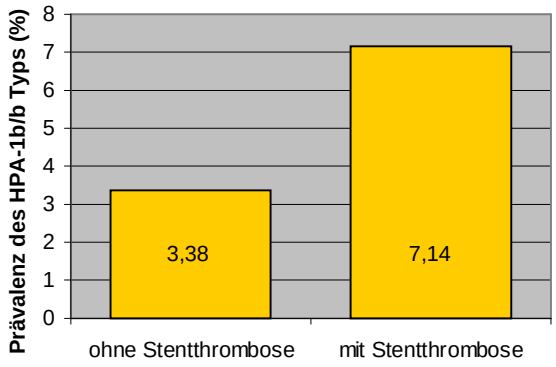


Abbildung 14: Prävalenz der HPA-1b/b Homozygotie.

Es wurde im Zuge der statistischen Auswertung den Focus nicht nur auf homozygote Träger des Typ-b Merkmals gesetzt, sondern auch heterozygote Träger für die Auswertung in eine Gruppe genommen. Damit analysierte man in Anlehnung an obige Grundlagenexperimente unter der Überlegung, dass auch die Anwesenheit eines Allels einflussreich sein könnte.

Aus diesem Blickwinkel konnte keine statistische Auffälligkeit mit dem Verdacht auf klinische Relevanz unter unseren Polymorphismen gefunden werden (vgl. Abbildung 13).

Die Interpretation ist aber auch aus anderer Perspektive möglich: Postuliert man eine klinische Auswirkung des Genotyps nur für homozygote Träger des Merkmals, so wäre es sinnvoll nur diese Patienten allen anderen gegenüberzustellen. Verfolgt man diese Fährte, so stellt man eine deutliche Auffälligkeit im HPA-1 System fest. Hier sind in der Stentthrombosegruppe über doppelt soviele HPA-1b-Träger als unter den Patienten ohne Stentthrombose. Dies entspricht 7,14% gegenüber 3,38%, wie in Abbildung 14 dargestellt.

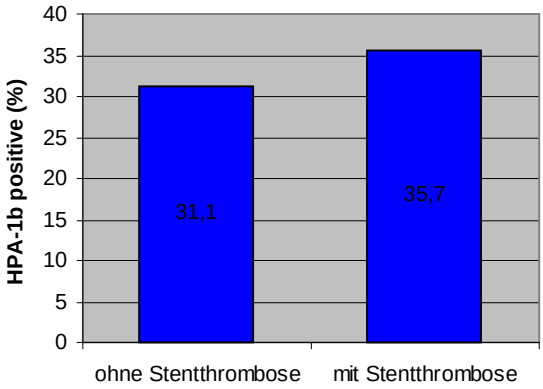


Abbildung 15: Prävalenz der HPA-1b positiven Patienten.

Ich favorisiere allerdings ganz klar die ursprüngliche Betrachtungsweise: Nicht nur, dass diese im Einklang mit den Schlussfolgerungen aus den Grundlagenexperimenten

steht. Weiter würde sich eine solche Gruppenbildung wegen der sehr schwachen Besetzung der Typ-b-Homozygotengruppe nur in einer Studie von enormen Ausmass für eine seriöse statistische Analyse eignen. Für den Umfang dieser Studie dagegen disqualifiziert sich diese Form der Auswertung. Aus diesem Grunde sei für die HPA-1 Analyse hier nochmal das Resultat in der ursprünglichen Gruppenbildung nach dargestellt (Abbildung 15)

5.2 Studienkonzept

Das Projekt war konzipiert, einen Zusammenhang zwischen selektierten Polymorphismen und dem klinischen Ereignis der Stentthrombose zu studieren. Diese erwogene Assoziation mag prinzipiell plausibel erscheinen. Man muss sich aber darüber im Klaren sein, dass das theoretisches Konstrukt dahinter, nämlich die kausale Kette Genpolymorphismus – Rezeptorveränderung – Funktionsveränderung des Thrombozyten – Einfluss auf thrombotische Vorgänge – Stentthromboserisiko eine Vielzahl von Zwischenschritten beinhaltet. Die erfassten Ansatzpunkte spannen also einen weiten Bogen, der eine Reihe von Vor- und Nachteilen birgt.
Eine Gefahr, der man gewahr sein muss, ist, dass positive wie negative Ergebnisse nicht als Aussage über die Richtigkeit der implizierten Zwischenschritte gewertet werden dürfen. Die Aussage, dass die untersuchten Polymorphismen laut diesem Projekt keine Assoziation zeigen, bestärkt die Vermutung, dass das vielschrittige Kausalmodell an einer Stelle unterbrochen sein muss. Eine konkrete funktionelle Schlussfolgerung, wie beispielsweise, dass die veränderte Aminosäure-Sequenz keinen Einfluss auf die Rezeptorfunktion habe, kann nicht gemacht werden.

Die Wertigkeit aus Sicht der funktionellen Forschung kann man aber dadurch erhöhen, dass weitere Untersuchungen von Einzelschritten den Bogen verkürzen und die Aussage damit eingrenzen und konkretisieren.
Ein aktuelles Beispiel dafür sind die kürzlich veröffentlichten Daten von Goldschmidt-Clermont und Corral; hier wurden die Aspekte der Aggregation, Aktivierung und Fibrinbindung von Plättchen bei Pl^{A2}-positiven Menschen beleuchtet.[48,166] Diese Daten konnten keine Abweichung im Sinne einer Steigerung dieser Eigenschaften gegenüber Beobachtungen an anderen Patienten offenlegen. Hier könnte man also einen fundamentale Erklärung in den negativen Ergebnissen dieser Studie sehen. Obige Ergebnisse sind allerdings kürzlich durch widersprüchliche Arbeiten wieder in Diskussion geraten.[32]

Man muss allerdings auch den Vorteil des übergreifenden Konzepts sehen: Die klinische Bedeutung der Stentthrombose ist groß, die Suche nach Risikofaktoren eine Angelegenheit hoher Priorität. Die übergreifende Evaluierung einer großen Kette von Einzelschritten erlaubt damit viele kosten- und zeitintensive Studie initial hinten anzustellen und bei der großen Zahl neuentdeckter Polymorphismen Kapazitäten für vielversprechende Ansätze freiwerden zu lassen.
Dies gilt beispielsweise für den HPA-3 Polymorphismus, dessen exakte funktionelle Beurteilung nach dieser Studie zu urteilen aus Sicht der Stentthrombose-Vorbeugung

zweitrangig erscheint. Einen ähnlichen Richtungszeig geben die Ergebnisse für HPA-2, -5 und Bß448. Die sehr ähnliche Genverteilung für betroffene und eventfreie Patienten in der Pilotstudie waren Wegweiser, diese Spur vorerst nicht weiter zu verfolgen.
Auch muß die hohe Zuverlässigkeit der Genbestimmungsmethodik als klarer Pluspunkt für eine Analyse auf dieser Ebene gewertet werden.

5.3 Statistische Analyse

Das Thema des adäquaten Studiendesigns zur Analyse einer multifaktoriellen Erkrankung wurde in der Vergangenheit debatiert.[158] Derzeit ist man auf dem Stand, dass Genstudien auf Populationsbasis durchgeführt werden sollten. Gerade prospektive Studien werden wegen ihrer hohen statistischen Power relativ hoch eingestuft.[158]
Dieser prospektive Charakter war in dieser Studie verwirklicht. Ebenso war ich bedacht bei der Gruppenauswahl von einer großen Population auszugehen.
Trotzdem muss man sich darüber im klaren sein, dass bedingt durch das Auftreten der Stentthrombose im Bereich weniger Prozente unsere Zahl solcher Patienten limitiert war. Insofern lag auch das Ziel der Studie klar darin, Einflussfaktoren von deutlicher klinischer Relevanz zu ergründen. Diese sollten entsprechend auch durch ein prägnantes statistisches Ergebnis als Einflussfaktor in der zweifellos multifaktoriellen Pathogenese auffallen.
Von den untersuchten Polymorphismen genügte keiner diesen hohen Anforderungen. Dagegen demonstriert das hochsignifikante Resultat für den Referenzdurchmesser des gestenteten Gefäßes klar, dass wichtige Pathogenesegrößen in dem gewählten Studienumfang deutlich zu Tage treten. Dieses Ergebnis steht sehr gut im Einklang mit Arbeiten anderer Gruppen (siehe Tabelle 1).

An dieser Stelle möchte ich kurz auf die Aussagekraft der verwendeten statistischen Test eingehen, deren Kernstück der Chi-Quadrat-Test war. Dieser Test eignet sich hervorragend, um Abweichungen in der Verteilung diskreter Merkmale zwischen Gruppen aufzuzeigen. Man muss sich jedoch darüber im Klaren sein, dass es sich bei der Berechnung um eine zweiseitige Fragestellung handelt. Beispielsweise bringt der p-Wert von 0,04 für die HPA-2 Analyse zum Ausdruck, dass ein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Merkmale vorliegt. Dies ist aber nicht gleichzusetzen mit einer Häufung des selteneren Merkmals b sondern in diesem Falle exakt des gegenteiligen Effekts. Dies ändert nichts an der Wertigkeit des Testes, aber deutlich an der klinischen Interpretation des Resultats (siehe oben).

5.4 Die Studienpopulation

Die überlegte Auswahl einer Studienpopulation ist eine wichtige Grundlage jeder Assoziationsstudie.[158]

Tabelle 17: Allelfrequenzen im internationalen Vergleich

	Finnland[22] n=200	Österreich[49] n=931	Japan[1478(68)] n=254 (331)	USA[62] n=100	Afrika[62] n=100	Korea[62] n=100	*Studie n=250*
HPA-1a	0,86	0.85	(0,998)			0,995	*0,82*
HPA-1b	0,14	0.15	(0,002)			0,005	*0,18*
HPA-2a	0,91	0.92	0,898	0,91	0,82		*0,92*
HPA-2b	0,09	0.08	0,102	0,09	0,18		*0,08*
HPA-3a	0,59	0.61	0,594				*0,59*
HPA-3b	0,41	0.39	0,406				*0,41*
HPA-5a	0,95	0.89		0,89	0,79		*0,92*
HPA-5b	0,05	0.11		0,11	0,21		*0,08*

Dadurch, dass Patienten der Studie nicht willkürlich rekrutiert, sondern und in größerer Zahl aufgenommen wurden, halte ich den Querschnitt für relativ repräsentativ für die Population in unserer Klinik und weitergehend im europäischen Raum. Dieses wird dadurch unterstützt, dass die Auswahl randomisiert erfolgte und somit keinem Bias unterlag. Wesentlich war auch, dass die Kontrollgruppe keinem anderen Auswahlverfahren unterzogen wurde.

Dies ist essentiell, da die Variabilität der Genverteilung in unterschiedlichen Populationen groß ist. Tabelle 17 listet eine Reihe von Studien auf, die Genverteilungen auf der ganzen Welt ermittelt . Während im europäischen Raum die Quoten vergleichbar sind, fallen zum Beispiel japanische Werte deutlich aus den Zahlenreihen heraus.[22,37,49,62,68,147] Die Allelfrequenz des Pl^{A2}-Allels ist dort vernachlässigbar gering, während der bei uns äußerst selten auftretende HPA-4 Polymorphismus dort häufiger ist und eine entsprechende Bedeutung für die Transfusionsmedizin hat.[37]
Dies wurde berücksichtigt. Vergleichende Statistik fand nur mit eigenen, lokalen Daten statt. Trotzdem wurden die Daten abschätzend neben andere Publikationen gestellt und konnten so in ihrer Größenordnung bestätigt werden.

Eine weitere Überprüfung der Homogenität der gebildeten Gruppen wurde anhand klinischer und prozeduraler Parameter mit gutem Ergebnis vollzogen (siehe oben).

5.5 Vergleich mit anderen Studien

An dieser Stelle sollen die Ergebnisse dieser Arbeit anderen Studien gegenübergestellt werden.

Der *Pl^A-Polymorphismus* war wie erwähnt in letzter Zeit mehrfach im Brennpunkt des kardiologischen Fachinteresses. Die Mehrheit dieser Arbeiten setzt sich mit der Assoziation zum Myokardinfarkt auseinander. Wegen der Themenverwandschaft, nämlich der These einer erhöhten thrombozytären Aggregationsneigung an einer auslösenden Stelle in den Koronarien, sollen diese in Tabelle 18 im Überblick wiedergegeben werden.

Tabelle 18: HPA-1 Assoziationsstudien im kardiologischen Fachgebiet

Studie	Kollektiv	n	a/a	a/b	b/b
England[148]	242 MI, 209 Kontr.	451	64,3	33,9	1,8
Irland[156]	191 MI, 176 Kontr.	367	72,2	25,9	1,9
Frankreich[156]	428 MI, 523 Kontr.	951	71,0	26,8	2,2
USA[71]	704 MI/ZI/ven. Thromb., 704 Kontr.	1408	74,0	23,7	2,3
BRD[134]	79 ZI, 79 Kontr.	158	73,4	24,7	1,9
BRD[124]	383 ZI/ neurol. Pat., 321 Kontr.	704	69,2	28,7	2,1
England[18]	156 MI, 244 ohne MI, 216 Kontr.	621	70,0	28,0	2,0
USA[60]	180 MI/KHK, 164 Kontr.	344	75,9	20,9	3,2
England[17]*	101 MI, 114 Kontr.	215	70,7	28,4	0,9
USA[165]*	71 MI, 68 Kontr.	139	70,5	25,2	4,3
BRD 159*	6 ST, 312 KHK	318	80,2	19,8	0,0
Unsere Studie	28 ST, 148 KHK, 74 Kontr.	250	68,4	28,0	3,6

Alle Zahlen in Prozent. Abkürzungen: MI (Myokardinfarkt), ZI (zerebraler Insult), KHK (Koronare Herzerkrankung), Kontr. (Kontrollen). * kennzeichnet Studien, die einen signifikanten Nachweis präsentieren

Die auslösende Arbeit war hier von Weiss et al.[165] Der Autor präsentiert Daten seiner Gruppe, die dem Pl^{A2}-Allel eine Odds-Ratio von 2,8, bei Patienten unter 60 Jahren sogar von 6,2 im Vergleich mit Pl^{A1} Trägern zuschreibt. In der Serie von Folgeuntersuchungen konnten Carter et al. die Bedeutung des Allels als Risikofaktor unterstützen,[17] andere konterten mit dem Verweis auf Weiss kleine Population mit einem konträren Ergebnis bei größeren Studienzahlen.[18,60,71,124,127,134,148,156] Aktuell scheint mir als Summe der zahlreichen Arbeiten eher der Konsens zu sein, keine Assoziation zum Myokardinfarkt anzunehmen.

Für neue Aufregung sorgte die Arbeit von Walter et al.[127] Da hier genau der Aspekt dieser Arbeit, nämlich die Stentthrombose, in einer zeitlich parallelen Arbeit untersucht wird, will ich hierauf genauer eingehen. Walter analysiert den Pl^A-Polymorphismus und kommt zum Schluß, dass die Präsenz des Pl^{A2}-Allels - bei einer Odds-Ratio von 5,26 in seiner Studie - in die Reihe der *klinisch-relevanten Risikofaktoren* aufgenommen werden sollte.

Dies steht im Widerspruch zu der abschließenden Meinung dieser Arbeit: Es ergab sich *kein* statistisch fundiertes *Verdachtsmoment*.

Der exakte Vergleich beider Arbeiten zeigte folgende Unterschiede:

- Walter et al untersuchten an einer kleineren Grundpopulation von 318 Patienten. Zwar analysiert dessen Labor wegen einer hohen Stentthromboserate von 3,5% elf Stentthrombosepatienten. Das liegt dennoch deutlich unter der Zahl von 28 Patienten in dieser Studie- bei einer weitaus geringeren Prävalenz von 0,9%.
- Walter berichtet von einer Allelfrequenz für Pl^{A2} von 0,1 für seine Gesamtpopulation (siehe Tabelle 21). Dabei findet er unter 318 Patienten keinen Pl^{A2}-homozygoten Träger. Mit diesen Ergebnissen liegt er weit neben der Allelfrequenz von im Mittel 0,16 und der $Pl^{A2/A2}$ Rate von 1,7-4,3% in allen mir bekannten Genotypisierungen (siehe Tabelle 21).

Fasst man diese Punkte zusammen, so entsteht der Eindruck, dass die Studienpopulation dieser Arbeit nicht repräsentativ für unseren mitteleuropäischen Raum ist. In Anbetracht der statistisch kleinen Zahl an Patienten mit Ereignis halte ich daher die Auslegung der Ergebnisse als bedeutenden Risikofaktor für einer weiteren Abklärung in typischer Population und größerem Studienumfang bedürftig. Als solche scheint meine Arbeit diese These zu widerlegen.

Tabelle 19: Vergleich einer Studie über zerebrovaskulären Insult mit unserer Studie

	Carlson et al.[124]		Unsere Studie	
	Blutspender (n=321)	Schlaganfall-patienten (n=218)	Stent-patienten (n=148)	Stentthrom-bosepatienten (n=28)
HPA-1a/a	72,0	65,6	68,9	64,3
HPA-1a/b	26,8	31,7	27,7	28,6
HPA-1b/b	1,2	2,8	3,4	7,1
HPA-2a/a	87,5	83,0	81,1	96,4
HPA-2a/b	12,5	15,6	18,2	3,6
HPA-2b/b	0,0	1,4	0,7	0,0
HPA-3a/a	35,2	35,8	36,5	28,6
HPA-3a/b	49,5	50,0	46,6	46,4
HPA-3b/b	15,3	14,2	16,9	25,0
HPA-5a/a	85,4	83,9	85,1	96,4
HPA-5a/b	14,0	15,1	14,9	3,6
HPA-5b/b	0,6	0,9	0,0	0,0

Die Studie von Carlson zeigte keinen signifikanten Unterschied

Hinsichtlich der anderen untersuchten Rezeptorpolymorphismen ist mir nur eine weitere Assoziationsstudie aus dem Bereich der thrombotischen Ereignisse bekannt. Carlson et al überprüften an Schlaganfallpatienten alle Prävalenzen der vier HPA-Polymorphismen unserer Studie (siehe Tabelle 19).[124] Sie fanden keine Assoziationen. Dies geht einher mit meinen Daten, aufgrund derer wir uns nicht veranlasst sehen, eine Folgeuntersuchung mit Priorität anzuknüpfen.

Mehr Daten wurden zum Bß448 Polymorphismus publiziert. Auf der publizierten Erkenntnis eines Genlinkage zur Promotorregion des Fibrinogens stützend, war dieses Thema Gegenstand von Assoziationsstudien bezüglich kardiovaskulären Erkrankungen und Myokardinfarkt. Doch hier war keine der beiden Studien von Carter und Behague in der Lage, eine statistische Relevanz anhand von Studiendaten festzumachen. Diese und die Daten dieser Arbeit sind in Tabelle 20 gegenübergestellt. Diesem Trend

schließen sich diese Ergebnisse an, die mit der Problematik der Stentthrombose diesen Themenkreis momentan vervollständigen.

Tabelle 20: Assoziationsstudien zum Bß448 Polymorphismus

	Carter et al.[18]		Behague et al.[72]		Unsere Daten	
	mit MI n=156	ohne MI n=244	mit MI n=565	ohne MI n=668	mit ST n=28	ohne ST n=148
Bß448 1/1	69,9	73,8	67,6	65,4	57,1	64,2
Bß448 1/2	28,8	24,2	29,2	31,6	35,7	30,4
Bß448 2/2	1,3	2	3,2	3	7,2	5,4
	p=NS		p=NS		p=NS	

Alle Zahlen in Prozent. NS bedeutet: keine statistisch signifikante Abweichung zwischen den Gruppen.

6. Zusammenfassung

Konzept: Ausgehend von pathophysiologischen und molekularbiologischen Verdachtsmomenten wurde in Form dieser Studie das Ziel gesetzt, fünf kürzlich beschriebene Genpolymorphismen im Zusammenhang mit dem Auftreten der lebensbedrohlichen kardiologischen Komplikation der subakuten Stentthrombose zu evaluieren.
Dies waren die thrombozytären Rezeptorpolymorphismen HPA-1 (Pl^A, Fibrinogenrezeptor), HPA-2 (von Willebrand-Rezeptor), HPA-3 (Bak, Fibrinogenrezeptor) und HPA-5 (Kollagenrezeptor) sowie der Fibrinogenpolymorphismus Bß448.
Eine *prospektive Studie* an 148 Stentpatienten ohne und 28 Patienten mit Stentthrombose war als Projekt für alle genannten Polymorphismen konzipiert. Weitere 74 Patienten ohne Koronarbefund wurden als Kontrollen mit eingeschlossen.

Methodik:
Alle Stentimplantationen wurden nach der Seldinger-Technik im Rahmen einer PTCA in unseren Herzkatheterlabors durchgeführt. Dazu wurde ein umfassender klinischer und prozedurbezogener Datensatz erhoben.
Für die Bestimmung der Polymorphismen wurde in unserem Genlabor je ein Analyseverfahren basierend auf der RFLP-Technik etabliert.

Ergebnisse:
Beide Gruppen wichen in keiner der erfassten Parameter signifikant voneinander ab. Alle Genanalysen waren erfolgreich. Die Allelfrequenzen lagen mit 0,82:0,18 (Pl^A), 0,92:0,08 (HPA-2), 0,51:0,49 (Bak), 0,92:0,08 (HPA-5) und 0,79:0,21 (Bß448) nahe bei den Werten anderer Studien im europäischen Raum.
Der statistische Vergleich zwischen den Gruppen mit und ohne Event und den Kontrollen brachte in keinem Fall eine signifikante Abweichung zugunsten des gehäuften Auftretens des selteneren Typ b-Allels zum Vorschein ($p>0,05$).
Für die HPA-2 Analyse ergab sich mit $p=0,04$ ein erniedrigtes Auftreten des Merkmals HPA-2b unter den Stentthrombosepatienten.
Eine hochsignifikante Veränderung konnte für den Referenzdurchmesser des gestenteten Gefäßes gefunden werden: mit einem p-Wert von 0,004 lag dieser bei Stentthrombosepatienten im Mittel bei 2,82 mm gegenüber 3,13 mm bei Stentpatienten ohne Stentthrombose.
Ein ähnlicher Bias, allerdings ohne Signifikanzniveau zu erreichen, war hinsichtlich einer reduzierten LV-Funktion und instabiler Angina pectoris zu beobachten.
Schließlich konnte man eine gute Übereinstimmung zwischen durchflußzytometrischer und genanalytischer Polymorphismusanalyse anhand des HPA-1 Polymorphismus zeigen.

Schlußfolgerungen:

Keiner der untersuchten Polymorphismen zeigte einen statistisch signifikant ausgeprägten Bias, den wir als Hinweis auf eine genetische Prädisposition zur Ausbildung einer Stentthrombose werten wollen. Die genannte Verringerung der HPA-2b-Prävalenz erscheint hierbei nicht von klinischer Relevanz im Sinne einer prognostischen Größe.
Ich sehe damit aktuell keinen Anlass, die Polymorphismen HPA-1, HPA-2, HPA-3, HPA-5 und Bß448 als prioritäres Diskussionsthema herauszustellen.

Bestätigen konnten man das andererorts diskutierte erhöhte Risiko einer Stentthrombose bei Stentinsertion in Gefäßen kleineren Referenzdurchmessers. Auch die Häufung anderer Risikofaktoren ließen sich in diesem Kollektiv nachvollziehen.

7. Danksagungen

Herrn Prof. Dr. med. Schömig, Direktor der Medizinische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München und des Deutsches Herzzentrum München danke ich für die Möglichkeit, die vorliegende Dissertation an seinem Klinikverbund durchführen zu können und den Zugriff auf die hervorragend strukturierte Klinikdatenbank.

Herrn Dr. Kastrati danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, meine „statistische Inspiration“ und für seine zur Verfügung gestellte statistische Expertise, sowie für die Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit.

Herrn PD Dr. med. Meinrad Gawaz danke ich sehr für die engagierte und anregende Betreuung meiner Arbeit.

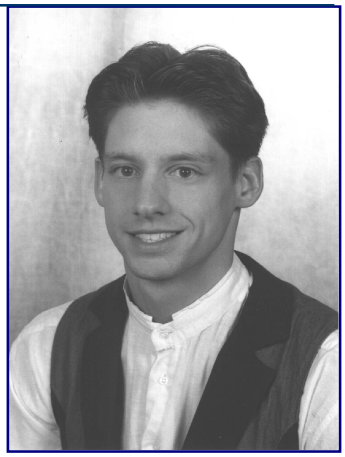
Herrn Dr. Koch danke ich für die kompetente Hilfestellung bei allen experimentellen Fragen und Problemen.

Großer Dank gilt auch dem ganzen Team im Labor, die mit Tatkraft und guter Stimmung die Arbeit im Labor unterstützt , besonders Frau Langenbrink.

8. Lebenslauf

Holger Seidl
geboren 9.6.1974
in Schongau

Marktstrasse 12
80802 München
✆ 089 38859159
Fax: 089 2443 35732
H.Seidl@lrz.tum.de



ELTERN	Dr. jur. Helmut Seidl, Richter am Amtsgericht Marianne Seidl, Hausfrau
SCHULBILDUNG	9/80 – 7/84 Grundschule Gernlinden 9/84 – 7/93 Gymnasium Olching Allgemeine Hochschulreife
WEHRDIENST	10/93 – 9/94 Roth/FFB
STUDIUM	Humanmedizin an der Technischen Universität München Vorklinik 11/94 – 9/96, Physikum klin. Abschnitt 11/96 - 8/97, 1. Staatsexamen klin. Abschnitt 11/97 - 8/99, 2. Staatsexamen Praktisches Jahr 9/99-11/00, Abschluss mit 3. Staatsexamen
PRAXIS	Famulaturen während der Semesterferien Urologie (Krkh. FFB) Radiologie (Niedergelassene Praxis Olching) Kardiologie (DHZ München) Kardiologie (Scripps Clinic, San Diego, USA) Gastroenterologie (Krankenhaus München Bogenhausen) Praktisches Jahr 9/99 – 10/00 Pädiatrie (Cornell Univ. NY Hospital, New York, USA) Chirurgie (Spital Solothurn, Schweiz) Gastroenterologie (Krankenhaus München Bogenhausen)
AUSZEICHNUNG	Hochbegabtenstipendium der Bayr. Staatsregierung Auswahl zum USA-Cornell-Programm der TU-München

München, den 10.5.2001

9. Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	*Bedeutung*
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Arg	Arginin (Aminosäure)
Asp	Asparaginsäure (Aminosäure)
bp	base pairs (Basenpaare)
°C	Grad Celsius
Cys	Cystein (Aminosäure)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	DNA-spaltendes Enzym
EDTA	Ethylen-Di-amin-Tetra-Acetate (Ethylendiamintetraessigsäure)
et al.	et altera (und weitere)
EW	Einwohner
Fa.	Firma
Gly	Glycin (Aminosäure)
GP	Glykoprotein
HPA	Human platelet antigen
IVUS	Intra-vaskulärer Ultraschall
LAD	Left anterior descending (Ramus interventricularis anterior)
LCA	Left common artery (Arteria coronaria sinistra communis)
LCx	Left circumflex artery (Ramus circumflexus)
min	Minuten
mg	Milligramm
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
NATP	Neonatale Alloimmune Thrombozytopenische Purpura
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
Pl^A	Platelet Antigen
post	nach
prae	vor
PTCA	Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty (perkutane transluminale Koronarangioplastie)

PTP	Posttransfusionspurpura
PTT	Partielle Thromboplastinzeit-Test
RCA	Right coronary artery (Arteria coronaria dextra)
RD	Referenzdurchmesser
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RGD	
s	Sekunden
ST	Subakute Stentthrombose
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
TMAC	Tetra-Methyl-Ammonium-Chlorid
TxA_2	Thromboxan A_2
z.B.	zum Beispiel

9.2 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: TODESFÄLLE DURCH ISCHÄMISCHE HERZERKRANKUNGEN (ICD/9 410-414) IN DER BRD (NACH STBA, FS 12, R4, 1996) 1

ABBILDUNG 2: TODESURSACHENSTATISTIK IN DER BRD 1996 (NACH STBA, FS 12, R4, 1996) 2

ABBILDUNG 3: ANGIOGRAPHISCHE DARSTELLUNG EINER STENTTHROMBOSE. 3

ABBILDUNG 4: VEREINFACHTE UND SCHEMATISIERTE DARSTELLUNG DER FUNKTIONELLEN GRUNDSÄULEN DES THROMBOZYTEN. 7

ABBILDUNG 5: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES FIBRINOGENREZEPTORS AUF THROMBOZYTEN 9

ABBILDUNG 6: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES VON WILLEBRAND-REZEPTORS AUF THROMBOZYTEN 11

ABBILDUNG 8: AGAROSEGEL ZUR PCR-KONTROLLE 27

ABBILDUNG 9: AUSSCHNITT AUS DEM GP IA GENOM 29

ABBILDUNG 10: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES ANALYSEABLAUFES UND SYNOPSIS ZUR AUSWERTUNG DES FINALEN GELERGEBNISSES AM BEISPIEL DES HPA-5-POLYMORPHISMUS 30

ABBILDUNG 11: AUSSCHNITTE AUS POLYACRYLAMIDGELEN ZUR DEMONSTRATION DER GELRESULTATE BEI DEN POLYMORPHISMEN HPA-1 (A), HPA-2 (B), HPA-3 (C) UND Bß448 (D) 31

ABBILDUNG 12: BESTIMMUNG DES HPA-1 MERKMALS ÜBER GENANALYSE UND AUF BASIS DURCHFLUßZYTOMETRISCHER MESSUNG DES POLYMORPHEN OBERFLÄCHENANTIGENS. 35

ABBILDUNG 13: GRAFISCHE DARSTELLUNG DER GENERGEBNISSE NACH POLYMORPHISMEN UND GRUPPEN. 41

ABBILDUNG 14: PRÄVALENZ DER HPA-1B/B HOMOZYGOTIE. 51

ABBILDUNG 15: PRÄVALENZ DER HPA-1B POSITIVEN PATIENTEN. 51

9.3 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: ANGIOGRAFISCHE PRÄDIKTOREN DER SUBAKUTEN STENTTHROMBOSE 5
TABELLE 2: ALLELE FORMEN DES GPIIB/IIIA GENOMS IM MENSCHLICHEN GENPOOL 10
TABELLE 3: PUNKTMUTATIONEN AUF DEM GPIBα MOLEKÜL 11
TABELLE 4: HUMANE PLÄTTCHENALLOANTIGENE 14
TABELLE 5:VERWENDETE STENTS NACH DER HÄUFIGKEIT IHRES EINSATZES 20
TABELLE 6: PRIMER FÜR DIE PCR-AMPLIFIKATION 24
TABELLE 7: PCR-BEDINGUNGEN 25
TABELLE 8: PCR-ANSATZ 25
TABELLE 9: RESTRIKTIONSVERDAU: ENZYME, ANSÄTZE UND FRAGMENTE 27
TABELLE 10: DOPPELBESTIMMUNGEN MIT VERSCHIEDENEN RESTRIKTIONSENZYMEN 35
TABELLE 11: KLINISCHE CHARAKTERISTIKA DER GRUPPEN 37
TABELLE 12: PROZEDURBEZOGENE DATEN 38
TABELLE 13: ERGEGNISSE DER GENANALYSE 39
TABELLE 14: GENVERTEILUNG IN DER STUDIENPOPULATION BEZ. DES HPA-1-POLYMORPHISMUS 41
TABELLE 15: STATISTISCHE BERECHNUNGEN ZU DEN GENERGEBNISSEN 42
TABELLE 16: ALLELFREQUENZEN 42
TABELLE 17: ALLELFREQUENZEN IM INTERNATIONALEN VERGLEICH 54
TABELLE 18: HPA-1-ASSOZIATIONSSTUDIEN IM KARDIOLOGISCHEN BEREICH 55
TABELLE 19: VERGLEICH EINER STUDIE ÜBER ZEREBROVASK. INSULT MIT DIESER STUDIE ...56
TABELLE 20: ASSOZIATIONSSTUDIEN ZUM Bß448 POLYMORPHISMUS 57

9.4 Literaturverzeichnis

1.) Baim DS, Carrozza JP, Jr. Stent thrombosis. Closing in on the best preventive treatment. Circulation 1997; 95:1098-100.

2.) Barragan P, Sainssous J, Silvestri M et al. Intracoronary stent implantation without ultrasound guidance and with replacement of conventional anticoagulation by antiplatelet therapy: 30 days clinical outcome of the French Multicenter Registry. Circulation 1996; 94:1519-27.

3.) Baumann RE, Henschen AH. Human Fibrinogen Polymorphic Site Analysis by Restriction Endonuclease Digestion and Allele-Specific Polymerase Chain Reaction Amplification: Identification of Polymorphisms at Positions Aa312 and Bß448. Blood 1993; 82: 2117-24.

4.) Beer J, Coller BS. Evidence that platelet glycoprotein IIIa has a large disulfide-bonded loop that is susceptible to proteolytic cleavage. J Biol Chem 1989; 264:17564.

5.) Behauge I, Poirier O, Nicaud V et al. ß Fibrinogen Polymorphisms Are Associated With Plasma Fibrinogen and Coronary Artery Disease in Patients With Myocardial Infarction. Circulation 1996; 93: 440-9.

6.) Bennett JS, Vilaire G, Burch JW. Role for prostaglandins and thromboxanes in the exposure of platelet fibrinogen receptors. J Clin Invest 1981; 68:981-7.

7.) Bennett JS, Vilaire G. Exposure of platelet fibrinogen receptors by ADP and epinephrine. J Clin Invest 1979; 64:1393-1401.

8.) Berndt MC, Phillips DR. Platelet membrane proteins: composition and receptor function. In: Gordon JL, ed. Platelets in Biology and Pathology -2. New York: Elsevier, 1981:43-75.

9.) Block PC. Percutaneous transluminal coronary angioplasty. Am J Roentgenol 1980; 135:955-959.

10.) Block PC. Percutaneous transluminal coronary angioplasty: role in the treatment of coronary artery disease. Circulation 1985. 72:V161-V165.

11.) Bray PF, Rosa JP, Lingappa VR, Kan YW, McEver RP, Shuman MA. Biogenesis of the platelet receptor for fibrinogen: evidence for separate precursors for glycoproteins IIb and IIIa. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83:1480-4.

12.) Bray PF. Inherited Diseases of Platelet Glycoproteins: Considerations for Rapid Molecular Characterization. Throm Haemost 1994; 72: 492-502.

13.) Calvete JJ, Henschen A, Gonzalez-Rodriquez J. Assignment of disuphide bonds in human platelet GPIIIa. A disulphide pattern for the ß-subunits of the integrin family.Biochem J 1991; 273:63.

14.) Calvette JJ, Henschen A, Gonzalez-Rodriquez J. Assignment of disulphide bonds in human platelet GPIIIa. A disuphide pattern for the ß-subunit of the integrin family. Biochem 1991; 273:63.

15.) Carlson LE, Greinacher A, Spitzer C, Walther R, Kessler, C. Polymorphisms of the human platelet antigens HPA-1, HPA-2, HPA-3 and HPA-5 on the platelet receptors for fibrinogen (GPIIb/IIIa), von Willebrandt factor (GPIb/IX) and collagen (GPIa/IIa) are not correlated with an increased risk for stroke. Stroke 1997; 28: 1392-5.

16.) Carter AM, Catto AJ, Bamford JM,. Grant PJ. Gender-specific associations of the fibrinogen Bß448 polymorphism, fibrinogen levels, and acute cerebrovascular disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997; 17:589-94.

17.) Carter AM, Ossei-Gerning N, Grant PJ. Platelet Glycoprotein IIa PlA Polymorphism and Myocardial Infarction. N Engl J Med 1996; 335:1072-3.

18.) Carter AM, Ossei-Gerning N, Wilson IJ, Grant PJ. Association of the Platelet PlA Polymorphism of Glycoprotein IIb/IIIa and the Fibrinogen Bß 448 Polymorphism With Myocardial Infarction and Extent of Coronary Artery Disease. Circulation 1997; 96: 1424-31.

19.) Chronos NA, Goodall AH, Wilson DJ, Sigwart U, Buller NP. Profound platelet degranulation is an important side effect of some types of contrast media used in interventional cardiology. Circulation 1993; 88:2035-44.

20.) Chung DW, Harris JE, Davie EW. Nucleotide sequences of the three genes coding for human fibrinogen. In Liu CY, Chien S: Fibrinogen, Thrombosis, Coagulation and Fibrinolysis 39-48; Plenum Press, New York (1991).

21.) Colombo A, Hall P, Nakamura S et al. Intracoronary stenting without anticoagulation accomplished with intravascular ultrasound guidance. Circulation 1995; 91:1676-88.

22.) Corral J, Gonzalez-Conejero R, Rivera J, Iniesta JA, Lozano ML, Vicente V. HPA-1 genotype in arterial thrombosis - role of HPA-1b polymorphism in platelet function. Blood Coagul Fibrinolysis 1997; 8: 284-90.

23.) Corral J, Rivera J, Gonzalez-Conejero R, Vicente V.The number of platelet glycoprotein Ia molecules is associated with the genetically linked 807 C/T and HPA-5 polymorphisms. Transfusion 1999; 39(4):372-8

24.) De Marco L, Girolami A, Russell S, Ruggeri ZM. Interaction of asialo von Willebrand factor with glycoprotein Ib induxes fibrinogen binding to the glycoprotein IIb/IIIa complex and initiates aggregation. J Clin Invest 1985; 75:1198-1203.

25.) Deranleau DA, Dubler D, Rothen C, Lüscher EF. Transient kinetics of the rapid shape change of unstirred human platelets stimulated with ADP. Proc Natl Acad Sci USA 1982; 79:7297-7301.

26.) Deuel TF, Senior RM, Chang D, Griffin GL, Heinrikson RL, Kaiser ET. Platelet factor 4 is chemotactic for neutrophils and monocytes. Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78:4584-7.

27.) Di Minno G, Thiagarajan P, Perussia B et al. Exposure of platelet fibrinogen-binding sites by collagen, arachidonic acid and ADP: inhibition by a monoclonal antibody to the gl y-coprotein IIb-IIIa complex. Blood 1983; 61:140-8.

28.) Ellis SG, Topol EJ. Intracoronary stents: will they fulfill their promise as an adjunct to angioplasty? J Am Coll Cardiol 1989; 13:1425-30.

29.) Erbel R, Haude M, Dietz U, Rupprecht HJ, Zotz R, Meyer J. New mechanical devices for treatment of coronary artery disease. Z Kardiol 1990; 79 Suppl 3:121-9.

30.) Erbel R, Schatz R, Dietz U et al. Balloon dilatation and coronary vascular stent implantation. Z Kardiol 1989; 78:71-7.

31.) Feder R, Banton V, Sayre D, Costa J, Baldini M, Kim B. Direct imaging of live human platelets by flash X-ray microscopy. Science Wash DC 1985; 227:63-4.

32.) Feng D, Lindpaintner K, Larson MG et al. Increased platelet aggregabilitiy associated with platelet GPIIIa PlA2 polymorphism: the Framingham Offspring Study. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19:1142-7.

33.) Feng D, Lindpaintner K, Larson MG et al. Increased platelet aggregabilitiy associated with platelet GPIIIa PlA2 polymorphism: the Framingham Offspring Study. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19:1142-7.

34.) Fischman DL, Leon MB, Baim DS et al. A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. N Engl J Med 1994; 331:496-501.

35.) Flug F, Espinola R, Liu L-X, SinQuee C et al. A 13-mer peptide straddling the leucine33/proline33 polymorphism in glycoprotein IIIa does not define the PlA1 epitope. Blood 1991; 77:1964.

36.) Fowkes FGR, Connor JM, Smith FB, Wood J, Donnan PT, Lowe GDO. Fibrinogen genotype and risk of peripheral atherosclerosis. Lancet 1992; 339:693-696.

37.) Frihata K, Nugent DJ, Bissonette A, Aster RH, Kunicki TJ. On the association of the platelet-specific alloantigen, Pena, with glycoprotein IIIa. J Clin Invest 1987; 80:1624.

38.) Gawaz M, Neumann FJ, Ott I, May A, Rüdiger S, Schömig A. Role of activation - dependent platelet membrane glycoproteins in development of subacute occlusive coronary stent thrombosis. Coronary Artery Disease 1997; 8: 121-8.

39.) Gawaz M, Neumann FJ, Ott I, May A, Schömig A. Platelet Activation and Coronary Stent Implantation. Effect of antithrombotic therapy. Circulation 1996; 94: 279-85.

40.) Gawaz M, Reininger A, Neumann FJ. Platelet Function and Platelet-Leukocyte Adhesion in Symptomatic Coronary Heart Disease. Effects of Intravenous Magnesium. Thrombosis Research 1996; 83: 341-9.

41.) Gawaz MP, Loftus JC, Bajt ML, Frojmovic MM, Plow EF, Ginsberg MH. Ligand bridging mediates integrin alpha Iib beta 3 (platelet GPIIb-IIIa) dependent homotypic and heterotypic cell-cell interactions. J Clin Invest 1991; 88:1128-34.

42.) George JN, Nurden AT, Phillips DR. Molecular defects in interactions of platelets with the vessel wall. N Engl J Med 1984; 311:1084-98.

43.) Giltay JC,Brinkman HM, von dem Borne AEGK, van Mourik JA. Expression of the alloantigen Zw (or PlA1) on human vascular smooth muscle cells and foreskin fibroblasts: A study on normal individuals and a patient with Glanzmann's thrombasthenia. Blood 1989; 73:965.

44.) Ginsberg MH, Lightsey A, Kunicki TJ, Kaufmann A, Marguerie G, Plow EF. Divalent cation regulation of the surface orientation of platelet mambrane glycoprotein IIb. Correlation with fibrinogen binding function and definition of a novel variant of Glanzmann's thormbasthenia. J Clin Invest 1986; 78:1103-11.

45.) Gogstad GO, Brosstad F, Krutnes MB, Hagen I, Solum NO. Fibrinogen-binding properties of the human platelet glycoprotein IIb-IIIa complex: a study using crossed radioimmunoelectrophoresis. Blood 1982; 60:663-71.

46.) Gogstad GO, Hagen I, Kritnes MB, Solum NO. Dissociation of the glycoprotein IIb-IIIa complex in isolated human platelet membranes. Dependence of pH and divalent cations. Biochem Biophys Acta 1982; 689:21-30.

47.) Goldberger A, Kolodziej M, Poncz M, Bennett JS, Newman PJ: Effect of single amino acid substitutions on the formation of the OlA and Bak Alloantigenic epitopes. Blood 1991; 78:681.

48.) Goldschmidt-Clermont PJ. Weiss EJ, Shear WS et al. Platelets from PlA2 (-) individuals bind more exogeneous fibrinogen than platelets from PlA2 (+) individuals. Blood 1996; 88:26a.

49.) Green F, Humphries S. Genetic determinants of arterial thrombosis. Baillière's Clinical Haematology 1994; 7: 675-92.

50.) Grotendorst GR, Chang T, Seppa HEJ, Kleinman HK, Martin GR. Platelet-derived growth factor is a chemoattractant for vascular smooth muscle cells. J Cell Physiol 1982; 113:261-6.

51.) Hagen I, Bjerrum OJ, Gogstad G, Korsmo R, Solum NO. Involvement of divalent cations in the complex between the platelet glycoproteins IIb and IIIa. Biochem Biophys Acta 1982; 701:1-6.

52.) Halfman-Franey M, Levine S. Intracoronary stents. Crit Care Nurs Clin North Am 1989; 1:327-37.

53.) Handin RI. Platelets and coronary artery disease. N Engl J Med 1996; 334:1126-7.

54.) Harfenist EJ, Guccione MA, Packham MA, Kinlough-Rathbone RL, Mustard JF. Arachidonate-induced fibrinogen binding to thrombin-degranulated rabbit platelets is independent of released ADP. Blood 1982; 59:956-62.

55.) Haude M, Erbel R, Issa H, Straub U, Rupprecht HJ, Treese N, Meyer J. Subacute thrombotic complications after intracoronary implantation of Palmaz-Schatz stents. Am Heart J 1993; 126:15-22.

56.) Hawiger J, Parkinson S, Timmons S. Prostacyclin inhibits mobilisation of fibrinogen-binding sites on human ADP- and thrombin-treated platelets. Nature Lond 1980; 283:195-7.

57.) Heidenreich P, Eisman R, Surrey S, Delgorosso K, Bennet JS, Schwartz E, Poncz M. Organization of the gene for platelet glycoprotein IIb. Biochemistry 1990; 29: 1232-44.

58.) Heldin CH, Westermark B, Wasteson A. Platelet-derived growth factor: purification and partial characterization. Proc Natl Acad Sci USA 1979; 76:3722-6.

59.) Herrman HC, Buchbinder M, Clemen MW et al. Emergent use of balloon-expandable coronary artery stenting for failed percutaneous transluminal coronary angioplasty. Circulation 1992; 86:812-9.

60.) Herrmann SM, Poirier O, Marques-Vidal P et al. The Leu33/Pro Polymorphism (PlA1/PlA2) of the Glycoprotein IIIa (GPIIIa) Receptor Is Not Related to Myocardial Infarction in the ECTIM Study. Thromb Haemost 1997; 77: 1179-81

61.) Holmes DR Jr, Vlietstra RE, Smith HC et al. Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA): a report from the PTCA Registry of the National Heart, Lung and Blood Institute. Am J Cardiol 1984; 53:77C-81C.

62.) Holsteiner A, Walchshofer S, Adler A, Kittl EM, Mayr WR, Panzer S. Human platelet antigen gene frequencies in the Austrian population. Haemostasis 1995; 25: 133-6.

63.) Jin Y, Dietz H, Nurden A, Bray PF. Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis Is a Rapid and Effective Method for the Identification of Mutations and Polymorphisms in the Gene for Glycoprotein IIIa. Blood 1993; 82: 2281-8.

64.) Kalb R, Santoso S, Unkelbach K, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C. Localization of the Br Polymorphism on a 144 bp Exon of the GPIa Gene and its Application in Platelet DNA Typing. Thromb Haemost 1994; 71: 651-4.

65.) Kanell WB, Wolf PA, Castelli WP, D'Agostino RB. Fibrinogen and risk of cardiovascular disease: The Framingham Study. JAMA 1987; 258:1183.

66.) Kastrati A, Schömig A, Elezi S et al. Coronary Stent Vessel Occlusion: Incidence, Timing, Predictors, Management and 1-Year Clinical Outcome. JACC 1998. Abstract.

67.) Kawai Y, Montgomery RR, Furihata K, Kunicki TJ: Expression of platelet alloantigens on human endothelial cells and HEL cells. Thromb Haemost 1987; 58:4.

68.) Kekomaki S, Partanen J, Kekomaki R. Platelet alloantigens HPA-1, -2, -3, -5 and -6b in Finns. Transfus Med 1995; 5:193-8.

69.) Kiefel V, Santoso S, Katzmann B, Mueller-Eckhart C. The Bra/Brb alloantigen system on human platelets. Blood 1989; 74:2219.

70.) Kiefel V, Santoso S, Weisheit M, Mueller-Eckhardt C. Monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA): A new tool for the identification of platelet-reactive antibodies. Blood 1987; 70:1732.

71.) Kim HO, Jin Y, Kickler TS, Blakemore K, Kwon OH, Bray PF. Gene frequencies of the five major human platelet antigens in African American, white and Korean populations. Transfusion 1995; 35: 863-7.

72.) Kloczewiak M, Timmons S, Lukas TJ, Hawiger J. Platelet receptor recognition site on human fibrinogen. Synthesis and structure-function relationship of peptides corresponding to the carboxy-terminal segment of the gamma chain. Biochemistry 1984; 23:1767.

73.) Kloprogge E, Akkerman JWN. Platelet-activating factor (PAF-acether) induces high- and low-affinity binding of fibrinogen to human platelets via independent mechanisms. Biochem J 1986; 240:403-412.

74.) Kloprogge E, Mommersteeg M, Akkerman JWN. Kinetics of platelet-activating factor 1-O-alkyl-2-axetyl-sn-glycero-3-phosphocholine-induced fibrinogen binding to human platelets. J Biol Chem 1986; 261:11071-6.

75.) Kuijpers RWAM, Faber NM, Cuypers HTM, Ouwehand WH, von dem Borne AEGK. NH2-Terminal Globular Domain of Human Platelet Glycoprotein Iba Has a Methionine145/Threonine145 Amino Acid Polymorphism, Which Is Associated with the HPA-2 (Ko) Alloantigens. J Clin Invest 1992; 89: 381-4.

76.) Kunicki TJ, Aster RH. Isolation and immunologic characterization of the human platelet alloantigen, PlA1. Mol immunol 1979; 16:353.

77.) Kunicki TJ, D Pidard, Rosa JP, Nurden AT. The formation of Ca2+ dependent complexes of platelet membrane glycoproteins IIb and IIIa in solution as determined by crossed immunoelectrophoresis. Blood 1981; 58:268-78.

78.) Kunicki TJ, Newman PJ. The Molecular Immunology of Human Platelet Proteins. Blood 1992; 80: 1386-1404.

79.) Lanza Z, Kieffer N, Phillips DR, Fitzgerald LA. Characterization of the human platelet glycoprotein IIIa gene. Comparison with the fibronectin receptor beta-subunit. J Biol Chem 1990; 265: 18098-103.

80.) Legrand C, Dubernard V, Nurden AT. Characteristics of collagen-induced fibrinogen binding to human platelets. Biochem Biophys Acta 1985; 812:802-10.

81.) Leon MD, Baim DS, Gordon P et al. Clinical and angiographic results from the Stent Anticoagulation Regimen Study (STARS). Circulation 1996; 94:I-685.

82.) Levin DC, Boxt LM, Meyerovitz MP. Percutaneous transluminal coronary angioplasty. Radiol Clin North Am 1985; 23:597-611.

83.) Levine S, Ewels CJ, Rosing DR, Kent KM. Coronary angioplasty: clinical and angiographic follow-up. Am J Cardiol 1985; 55:673-6.

84.) Leytin VL, Gorbunova NA, Misselwitz F et al. Step-by-step analysis of adhesion of human platelets to a collagen-coated surface defect in initial attachment and spreading of platelets in von Willebrand's disease. Thromb Res 1984; 34:51-63.

85.) Liu MW, Voorhees WD 3rd, Agrawal S, Dean LS, Roubin GS. Stratification of the risk of thrombosis after intracoronary stenting for threatened of acute closure complicating coronary balloon angioplasty: a Cook registry study. Am Heart J 1995; 130:8-13.

86.) Lopez JA, Leung B, Fox JEB. Expression of functional human glycoprotein Ib-IX complex in hamster cells: Subunit requirements for membrane expression. Circulation 1990; 82:597a.

87.) Marguerie GA, Plow EF, Edgington TS. Human platelets possess an inducible and saturable receptor specific for fibrinogen. J Biol Chem 1979; 254:5357-63.

88.) Marguerie GA, Plow EF. Interaction of fibrinogen with its platelet receptor: kinetics and effect of pH and temperature. Biochemistry 1981; 20:1074-80.

89.) Marian AJ, Brugada R, Kleiman NS. Platelet Glycoprotein IIIa PlA Polymorphism and Myocardial Infarction. N Engl J Med 1996; 335: 1071-2.

90.) Maslanka K, Yassai M, Gorski J. Molecular identification of T cells that respond in a primary bulk culture to a peptide derived from a platelet glycoprotein implicated in neonatal alloimmune thrombocytopenia. J Clin Invest 1996; 98; 1802-88.

91.) McEver RP, Bennett EM, Martin MN. Identification of two structurally and functionally distinct sites on human platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa using monoclonal antibodies. J Biol Chem 1983; 248:5269-75.

92.) Meiklejohn DJ, Urbaniak SJ, Greaves M. Platelet glycoprotein IIIa polymorphism HPA 1b (PlA2): no association with platelet fibrinogen binding. Br J Haematol 1999. 105:664-6.

93.) Miller DD, Karim MA, Edwards WD, Schwartz RS. Relationship of vascular thrombosis and inflammatory leucocyte infiltration to neointimal growth following porcine coronary artery stent placement. Atherosclerosis 1996; 124:145-55.

94.) Miller JL, Cunningham D, Lyle VA, Finch CN. Mutation in the gene encoding the a chain of platelet glycoprotein Ib in platelet-type von Willebrand disease. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88:4761-5.

95.) Miller JL, Lyle VA, Cunningham D. Mutation in the gene encoding the a chain of platelet glycoprotein Ib in platelet-type von Willebrand disease. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88:4761-5.

96.) Milton JG, Frojmovic MM. Adrenaline and adenosine diphosphate-induced platelet aggregation require shape change. Importance of pseudopods. J Lab Clin Med 1984; 104:805-15.

97.) Modderman PW, Admiraal LG, Sonnenberg A, von dem Borne AEGK. Glycoproteins V and Ib-IX form a noncovalent complex in the platelet membrane. J Biol Chem 1992; 267:364-9.

98.) Mohri H, Fujimura Y, Shima M et al. Structure of the von Willebrand factor domain interacting with glycoprotein Ib. J Biol Chem 1988; 263:17901.

99.) Morinelli TA, Niewiarowski S, Kornecki E, Figures WR, Wachtfogel Y, Colman RW. Platelet aggregation and exposure of fibrinogen receptors by prostaglandin endoperoxide analogues. Blood 1983; 61:41-9.

100.) Moroi M, Jung SM, Yoshida N. Genetic polymorphism of platelet glycoprotein Ib. Blood 1984; 64:622-9.

101.) Moussa I, Di Mario C, Reimers B, Akiyama T, Tobis J, Colombo A. Subacute stent thrombosis in the era of intravascular ultrasound-guided coronary stenting without anticoagulation: frequency, predictors and clinical outcome. J Am Coll Cardiol 1997; 29:6-12.

102.) Mustard JF, Kinlough-Rathbone RL, Packham MA, Perry DW, Harfenist EJ, Pai KRM. Comparison of fibrinogen association with normal and thrombasthenic platelets on exposure to ADP or chymotrypsin. Blood 1979; 54:987-993.

103.) Nachman RL, Leung LLK. Complex formation of platelet membrane glycoproeins IIb and IIIa with fibrinogen. J Clin Invest 1982; 69:263-269.

104.) Nakamura S, Hall P, Gaglione A et al. High pressure assisted coronary stent implantation accomplished without intravascular ultrasound guidance and subsequent anticoagulation. J Am Coll Cardiol 1997; 29:21-7.

105.) Narins CR, Topol EJ. Cardiology. Attention shifts to the white clot. Lancet 1997; 350 Suppl 3:III2.

106.) Nath FC, Muller DW, Ellis SG et al. Thrombosis of a flexible coil coronary stent: frequency, predictors and clinical outcome. J Am Coll Cardiol 1993; 21:622-7.

107.) Neumann FJ, Gawaz M, Ott I et al. Prospective Evaluation of Hemostatic Predictors of Subacute Stent Thrombosis After Coronary Palmaz-Schatz Stenting. J Am Coll Cardiol 1996; 27: 15-21.

108.) Newman PJ. Platelet alloantigens: cardiovascular as well as immunological risk factors? Lancet 1997. 349: 370-1.

109.) Newman PJ. Platelet GP IIb/IIIa: Molecular Variations and Alloantigens. Thromb Haemost 1991; 66: 111-8.

110.) Nossel HL, Hurletjen A, LIn CY, Kiehn JA, Canfield RE. Fibrinopeptide release from fibrinogen. Ann NY Acad Sci 1983; 408: 269-278.

111.) Nurden AT, Caen JP. An abnormal platelet glycoprotein pattern in three cases of Glanzmann's thrombasthenia. Br J Haematol 1974; 28:253-60.

112.) Nurden AT. Polymorphisms of Human Platelet Membrane Glycoproteins: Structure and Clinical Significance. Thromb Haemost 1995; 74: 345-51.

113.) Palmaz JC, Sibbitt RR, Tio FO, Reuter SR, Peters JE, Garcia F. Expandable intraluminal vascular graft: a feasibility study. Surgery 1986; 99:199-205.

114.) Peerschke EIB, Zucker MB.Fibrinogen receptor exposure and aggregation of human blood platelets produced by ADP and chilling. Blood 1981; 57:663-70.

115.) Peerschke EIB. Effect of epinephrine on fibrinogen receptor exposure by aspirin-treated platelets and platelets from concentrates in response to ADP and thrombin. Am J Hematol 1985; 22:241-59.

116.) Peerschke EIB. The platelet fibrinogen receptor. Semin Hematol 1985; 22:241-59.

117.) Phillips DR, Agin PP. Platelet membrane defects in Glanzmann's thrombasthenia. Evidence for decreased amounts of two major glycoproteins. J Clin Invest 1977; 60:535-45.

118.) Pidard D, Didry D, Kunicki TJ, Nurden AT. Temperature-dependent effects of EDTA on the membrane glycoprotein IIb-IIIa complex and platelet aggregation. Blood 1986; 67:604-11.

119.) Platelet activation and arterial thrombosis. Report of a meeting of Physicians and Scientists, University of Texas Health Science Center at Houston and Texas Heart Institute, Houson [clinical conference]. Lancet 1994; 344:991-5.

120.) Plow EF, Marguerie GA. Induction of the fibrinogen receptor on human platelets by epinephrine and the combination of epinephrine and ADP. J Biol Chem 1980;250:10971-7.

121.) Plow EF, Marguerie GA. The participation of ADP in the binding of fibrinogen to thrombin-stimulated platelets. Blood 1980; 56:553-5.

122.) Plow EF, Srouji AH, Meyer D, Marguerie G, Ginsberg MH. Evidence, that three adhesive proteins interact with a common recognition site on activated platelets. J Biol Chem 1984; 259:5388-91.

123.) Pyetla R, PierschbacherMD, Ginsberg MH, Plow EF, Ruoslahti E. Platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa: member of a family of Arg-Gly-Asp-specific adhesion receptors. Science Wash DC 1986; 1559-62.

124.) Reuner KH. The Human Platelet Antigen HPA-1a/1b (PlA1/PlA2) Polymorphism and Cerebral Ischaemia. ?

125.) Reznikoff-Etrievant MF, Dangu C, Lobet R. HLA-B8 antigen and anti-PlA1 alloimmunization. Tissue Antigens 1981; 18:66.

126.) Reznikoff-Etrievant MF, Muller JY, Julien F, Patereau C. An immune response gene linked to MHC in man. Tissue Antigens 1983; 22:312.

127.) Ridker PM, Hennekens CH, Schmitz C, Stampfer MJ, Lindpaintner K. PlA1/A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risks of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis. Lancet 1997; 349: 385-8.

128.) Ross R, glomset J, Kariya B, Harker LA. A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth cells in vitro. Proc Natl Acad Sci USA 1974; 71:1207-10.

129.) Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF. The biology of platelet-derived growth factor. Cell 1986; 46:155-69.

130.) Roth GJ. Developing relationships: Arterial platelet adhesion, glycoprotein Ib, and leucine-rich glycoproteins. Blood 1991; 7:5-19.

131.) Roubin GS, Gruentzig AR. Percutaneous transluminal coronary angioplasty: state of the art and future directions. Int J Card Imaging 1985; 1:143-54.

132.) Ruggeri ZM, Zimmerman TS. Von Willebrand factor and von Willebrand disease. Blood 1987; 70:895.

133.) Russell SD, Roth GJ. Pseudo-von Willebrand disease: A mutation in the platelet glycoprotein Ibalpha gene associated with a hyperactive surface receptor. Blood 1993; 81:1787-91.

134.) Samani NJ, Lodwick D. Glycoprotein IIIa polymorphism and risk of myocardial infarction. Cardiovasc Res 1997. 33: 693-7.

135.) Santoso S, Kalb R, Walka M, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C, Newman PJ. The Human Platelet Alloantigens Bra and Brb Are Associated with a Sinlge Amino Acid Polymorphism on Glycoprotein Ia (Integrin Subunit a2). J Clin Invest 1993; 92: 2427-32.

136.) Savage MP, Douglas JS Jr, Fischman D L et al. Stent placement compared with balloon angioplasty for obstructed coronary bypass grafts. Saphenous Vein De Novo Trial Investigators. N Engl J Med 1997; 337:740-7.

137.) Schatz RA, Palmaz JC, Tio FO, Garcia F, Garcia O, Reuter SR. Balloon-expandable intracoronary stents in the adult dog. Circulation 1987; 76:450-7.

138.) Schatz RA. Introduction to intravascular stents. Cardiol Clin 1988; 6:357-72.

139.) Schatz RA. The evolution of antithrombotic therapy in coronary stenting. Am Heart J 1997; 134:S78-S80.

140.) Schömig A, Kastrati A, Mudra H et al. Four-year experience with Palmaz-Schatz stenting in coronary angioplasty complicated by dissection with threatened or present vessel closure. Circulation 1994; 90:2716-24.

141.) Schömig A, Neumann FJ, Kastrati A et al. A randomized comparison of antiplatelet and anticoagulant therapy after the placement of coronary-artery stents. N Engl J Med 1996; 334:1084-9.

142.) Schwartz SM, Gajdusek CM. Growth factors and the vessel wall. Prog Hemost Thromb 1982; 6:85-112.

143.) Serruys PW, de Jaegere P, Kiemenej F et alA comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. N Engl J Med 1994; 331:489-95.

144.) Serruys PW, Di Mario C. Who was thrombogenic: the stent or the doctor? Circulation 1995; 91:1891-3.

145.) Serruys PW, Strauss BH, Beatt KJ et al.Angiographic follow-up after placement of a self-expanding coronary-artery stent. N Engl J Med 1991; 324:13-17.

146.) Shattil SJ, Brass LF, Bennett JS, Pandhi P. Biochemical and functional consequences of dissociation of the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. Blood 1985; 66:92-8.

147.) Shibata Y, Matsuda I, Miyaji T, Ichikawa Y. Yuka, a new platelet antigen involved in two cases of neonatal alloimmune thrombocytopenia. Vox Sang 50:1986; 50:177.

148.) Shigenori T, Atsuko T, Nobuo N et al. Simultaneous DNA Typing of Human Platelet Antigens 2, 3 and 4 by Allele-Specific PCR Method. Vox Sang 1995; 68:225-30.

149.) Siess W. Molecular Mechanisms of Platelet Activation. Physiological Reviews 1989; 69: 58-141.

150.) Sigwart U, Kaufmann U, Goy JJ et al. Prevention of coronary restenosis by stenting. Eur Heart J 1988; Suppl C:31-7.

151.) Sigwart U, Puel J, Mirkovitch V, Joffre F, Kappenberger L. Intravascular stents to prevent occlusion and restenosis after transluminal angioplasty. N Engl J Med 1987; 316:701-6.

152.) Simsek S, Bleeker PMM, van der Schoot CE, von dem Borne AEG Kr. Association of a variable number of tandem repeats (VNTR) in glycoprotein Ißa and HPA-2 alloantigens. Thromb Haemostas 1994; 72:757-61.

153.) Simsek S, Faber NM, Bleeker PM et al. Determination of Human Platelet Antigen Frequencies in the Dutch Population by Immunophenotyping and DNA (allele-specific restriction enzyme) Analysis. Blood 1993; 81: 8335-40.

154.) Takada Y, Hemler ME. The primary structure of the VLA-2/collagen receptor alpha 2 subunit (platelet GPIa): homology to other integrins and the presence of a possible collagen-binding domain. J Cell Biol 1989; 109: 397-407.

155.) Take H, Tomiyama Y, Shibata Y et al. Demonstration of the heterogeneity of epitopes of the platelet-spexifix alloantige, Baka. Br J Haematol 1990; 76:395.

156.) Tanaka S, Ohnoki S, Shibata H, Okobu Y, Yamaguchi H, Shibata Y. Gene frequencies of human platelet antigens on glycoprotein IIIa in Japanese. Transfusion 1996; 36:813-7.

157.) Topol EJ. Toward a new frontier in myocardial reperfusion therapy: emerging platelet preeminence. Circulation 1998; 97:211-8.

158.) Van Leeuwen E, Leeksma O, van Mourik J, Engelfriet C, von dem Borne A. Effect of the binding of anti-Zwa antibodies on platelet function. Vox Sang 1984; 47:280.

159.) Versaci F, Gaspardone A, Tomai F, Crea F, Chiariello L, Gioffre PA. A comparison of coronary-artery stenting with angioplasty for isolated stenosis of the proximal left anterior descending coronary artery. N Engl J Med 1997; 336:817-22.

160.) Vicente V, Houghten RA, Ruggeri ZM. Identification of a site in the a chain of platelet glycoprotein Ib that participates in von Willebrand factor binding. H Biol Chem 100ß; 265:274.

161.) von dem Borne AEGK. Nomenclature of platelet antigen systems. Br J Haematol 1990; 74:239.

162.) Walchshofer S, Ghali D, Fink M, PanzerГGrünmayer ER, Panzer S. A rare leucine40/arginine40 polymorphism on platelet glycoprotein IIIa is linked to the human platelet antigen 1b. Vox Sang 1994; 67:231-4.

163.) Walter DH, Schächinger V, Elsner M, Dimmeler S, Zeiher AM. Platelet glycoprotein IIIa polymorphisms and risk of coronary stent thrombosis. Lancet 1997; 350: 1217-9.

164.) Ware J, Russell SR, Marchese P, Murata M, Mazzucato M, De Marco L, Ruggeri ZM. Point mutation in a leucine-rich repeat of platelet glycoprotein Ibalpha resulting in the Bernard-Soulier syndrome. J Clin Invest 1993; 92:1213-20.

165.) Weiss EJ, Bray PF, Tayback M et al. A Polymorphism of A Platelet Glycoprotein Receptor as An Inherited Risk Factor for Coronary Thrombosis. N Engl J Med 1996; 334:1090-4.

166.) Weiss EJ, Goldschmidt-Clermont PJ, Grigoryev D, Jin Y, Kickler TS, Bray PF. A monoclonal antivody (SZ21) specific for platelet GPIIIa distinguishes PlA1 from PlA2. Tissue Antigens 1995. 46: 374-81.

167.) Wenger RH, Kieffer N, Wicki AN, Clemetson KJ. Structure of the human blood platelet membrane glycoprotein Ib alpha gene. Biochem Biophys Res Commun 1988; 156: 389-95.

168.) Wenger RH, Wicki AN, Kieffer N, Hameister H, Clementson KJ. The 5' flanking region of the gene encoding human platelet membrane glycoprotein Ibalpha. Gene 1989; 85:517.

169.) White JG. Electron microscopic studies of platelet secretion. Prog Hemostasis Thromb 1974; 2:49-98.

170.) White JG. Shape change. Thromb Diath Haemorrh 1974; 60:159-71.

171.) Wu KK. Platelet activation mechanisms and markers in arterial thrombosis. J Intern Med 1996; 239:17-34.