



Technische Universität München

Klinik für Herz- und Kreislauferkrankungen,
Deutsches Herzzentrum München des Freistaates Bayern

**Genetische Determinanten der Clopidogrel-Response –
Untersuchungen zu CYP2C19*2 und CYP2C19*17**

Daniela Franziska Gebhard

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

Vorsitzende(r): Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Dirk Sibbing
2. Prof. Dr. Karl-Ludwig Laugwitz

Die Dissertation wurde am 22.09.2016 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 12.07.2017 angenommen.

Inhalt

Verzeichnis verwendeter Abkürzungen	4
1. Einleitung	7
1.1 Koronare Herzerkrankung.....	7
1.2 Clopidogrel.....	8
1.3 Das Prinzip der DAPT	10
1.4 Stentthromosen.....	11
1.5 Ziele dieser Arbeit.....	12
2. Material und Methoden	13
2.1 Patienten, Auswahlkriterien, Studiendesign.....	13
2.1.1 Patientenkollektiv und Protokoll zur Testung auf CYP2C19*17.....	13
2.1.2 Patientenkollektiv und Protokoll zur Testung auf CYP2C19*17 und CYP2C19*2.....	15
2.2 DNA-Isolierung	16
2.3 Genotypisierung.....	19
2.4 Multiple Electrode Platelet Aggregometry (MEA).....	24
2.5 Studienendpunkte, Definitionen.....	28
2.5.1 Studienendpunkte der Studie zu CYP2C19*17.....	28
2.5.2 Singulärer und wechselseitiger Einfluss von CYP2C19*2 und CYP2C19*17 ..	28
2.5.3 Blutungsereignisse entsprechend der TIMI-Kriterien	29
2.5.4 Definition einer Stentthrombose.....	30
2.6 Statistische Methoden	31
2.6.1 Statistische Methoden für die Studie mit CYP2C19*17	31
2.6.2 Statistische Methoden für die Studie mit CYP2C19*2 und CYP2C19*17	34
3. Ergebnisse	35
3.1 Ergebnisse zu CYP2C19*17	35
3.1.1 Studienkollektiv, Genotypen- und Allelhäufigkeiten.....	35
3.1.2 Vergleiche der Thrombozytenaggregation zwischen den verschiedenen Genotypengruppen	37
3.1.3 Blutungsereignisse als primärer Sicherheitsendpunkt.....	38
3.1.4 Blutungsereignisse und Genotypengruppe	39
3.1.5 Ischämische Ereignisse als primärer Wirksamkeitsendpunkt	42

3.2 Ergebnisse zu CYP2C19*2 und CYP2C19*17.....	43
3.2.1 Studienkollektiv.....	43
3.2.2 Allelhäufigkeiten im Studienkollektiv	45
3.2.3 Zusammenhang von CYP2C19*2 und ADP-induzierter Thrombozytenaggregation.....	45
3.2.4 Zusammenhang von CYP2C19*17 und ADP-induzierter Thrombozytenaggregation.....	49
3.2.5 Interaktion von CYP2C19*2 und CYP2C19*17.....	53
3.2.6 CYP2C19*2 und der Einfluss von Omeprazol.....	54
4. Diskussion	55
4.1 Einfluss von CYP2C19*17 auf die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation.....	55
4.2 Einfluss von CYP2C19*17 und CYP2C19*2 auf die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation	57
4.2.1 Zusammenhang von CYP2C19*2 und Low-Response	57
4.2.2 Zusammenhang von CYP2C19*17 und High-Response.....	58
4.2.3 Interaktion von CYP2C19*2 und CYP2C19*17.....	58
4.3 Einfluss von Omeprazol auf den CYP2C19-Metabolismus.....	59
4.4 Nutzen einer Genotypisierung.....	60
5. Zusammenfassung	63
Abbildungsverzeichnis	65
Tabellenverzeichnis	66
Literaturverzeichnis	68
Danksagung	75

Verzeichnis verwendeter Abkürzungen

ABCB1	Gen, kodiert für eine intestinale Efflux-Pumpe zur Clopidogrel-absorption
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ACS	Acute Coronary Syndrome
ADP	Adenosindiphosphat
ADPtest HS	ADP-Test high sensitivity, ADPTest mit PGE1 zusätzlich
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
AP	Angina Pectoris
ARC	Academic Research Consortium
ASS	Acetylsalicylsäure
AT1	Angiotensin 1
AU	Arbitrary Units
AUC	Area under the curve
BMI	Body Mass Index
BMS	Bare Metal Stent
C	Celsius (°Grad)
CABG	Coronary artery bypass graft
CAD	Coronary artery disease
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CI	Konfidenzintervall
CK-MB	Creatininkinase-MB
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
COX	Cyclooxygenase
CYP	Cytochrom P
DAPT	dual antiplatelet therapy
DES	Drug-eluting Stent (medikamentenbeschichteter Stent)
dl	Deziliter
DNA/DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
EF	Ejection Fraction

EKG	Elektrokardiogramm
FAM TM	Bezeichnung des Herstellers, bindet an das 5'-Ende der DNA-Probe von Allel 1 i. R. der Genotypisierung
G	Gravitation (9,81 m/s ²)
GP-IIb/IIIa	Glykoprotein-IIb/IIIa
h	Stunde
Hb	Hämoglobin
HIV	humanes Immundefizienzvirus
ID	Identifying Data
IQR	Interquartile Range
i. v.	intravenöse Verabreichung eines Medikaments
kg	Kilogramm
KHK	Koronare Herzerkrankung
LTA	Light transmission aggregometry
MBG	Minor Binding Groove, Bezeichnung des Herstellers, bindet an das 3'-Ende der DNA-Probe i. R. der Genotypisierung
MEA	Multiple Electrode Platelet Aggregometry
MI	Myokardinfarkt
min	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
m ²	Quadratmeter
n	Variable für die jeweilige Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
ND	not determined, nicht bestimmt
NSTEMI	non-ST-segment elevation myocardial infarction
NTC	No Template Control, neutrale Probe ohne DNA (entspricht PCR-Wasser)
OR	Odd's Ratio
p	P-Wert
P2Y ₁₂	ADP-Rezeptor auf Thrombozyten, kodiert durch das P2Y ₁₂ -Gen
PCI	Percutaneous Coronary Intervention

PCR	Polymerase chain reaction
PGE1	Prostaglandin 1
pH	pH-Wert
p. o.	per os, orale Verabreichung eines Medikaments
PPI	Protonenpumpeninhibitor
ROC	Receiver Operating curve
RUO	Research Use Only
SE	Standard Error (Standardfehler)
SNP	Single-nucleotide polymorphism
ST	Stentthrombose
STEMI	ST-segment elevation myocardial infarction
TIMI	Thrombolysis in Myocardial Infarction, Blutungskriterien
TIMI-Fluss	Durchblutung im Bereich einer Koronarstenose (0 keine Perfusion, 1 Penetration ohne Perfusion, 2 partielle Perfusion, 3 vollständige Perfusion), Beurteilung i. R. einer Koronarangiographie
UFH	unfraktioniertes Heparin
VASP	Vasodilator-stimuliertes Phosphoprotein
VIC [®]	Bezeichnung des Herstellers, bindet an das 5'-Ende der DNA-Probe von Allel 2 i. R. der Genotypisierung
wt	Wildtyp
Z. n.	Zustand nach

1. Einleitung

Patienten mit koronarer Herzerkrankung, die sich einer perkutanen Koronararterienintervention (PCI) unterziehen, wird routinemäßig eine antithrombozytäre und eine gerinnungshemmende Behandlung während und nach dem Eingriff verabreicht um das Risiko thrombotischer Komplikationen zu reduzieren. Diese Risikoreduktion geht jedoch mit einem erhöhten Risiko für Blutungen sowohl während als auch nach dem Eingriff einher [Iijima et al. 2009, Moscucci et al. 2003, Ndrepepa et al. 2008, Yusuf S 2001].

Clopidogrel ist ein Medikament, das im Rahmen der antithrombozytären Therapie Anwendung findet. Diese Arbeit beschäftigt sich mit CYP2C19*2 und CYP2C19*17 als genetischen Determinanten der Clopidogrel-Response.

1.1 Koronare Herzerkrankung

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind weltweit die häufigste Todesursache. Laut WHO-Daten aus dem Jahr 2012 war weltweit bei 31% aller Verstorbenen eine kardiovaskuläre Erkrankung die Todesursache [World Health Organization 2015].

Bei einer KHK kommt es durch Einlagerungen in die Gefäßwände zur Entstehung von Plaques, die das arterielle Lumen einengen. Die Erosion infolge einer lokalen Entzündungsreaktion oder die Ruptur eines Plaques kann durch die hierdurch ausgelöste Thrombusbildung zu einem vollständigen oder teilweisen Gefäßverschluss führen. Dies wird als Ursache eines akuten Koronarsyndroms angesehen [Giannitsis 2012].

Risikofaktoren einer KHK sind Nikotinkonsum, arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus, Adipositas und Hyperlipidämie [World Health Organization 2015].

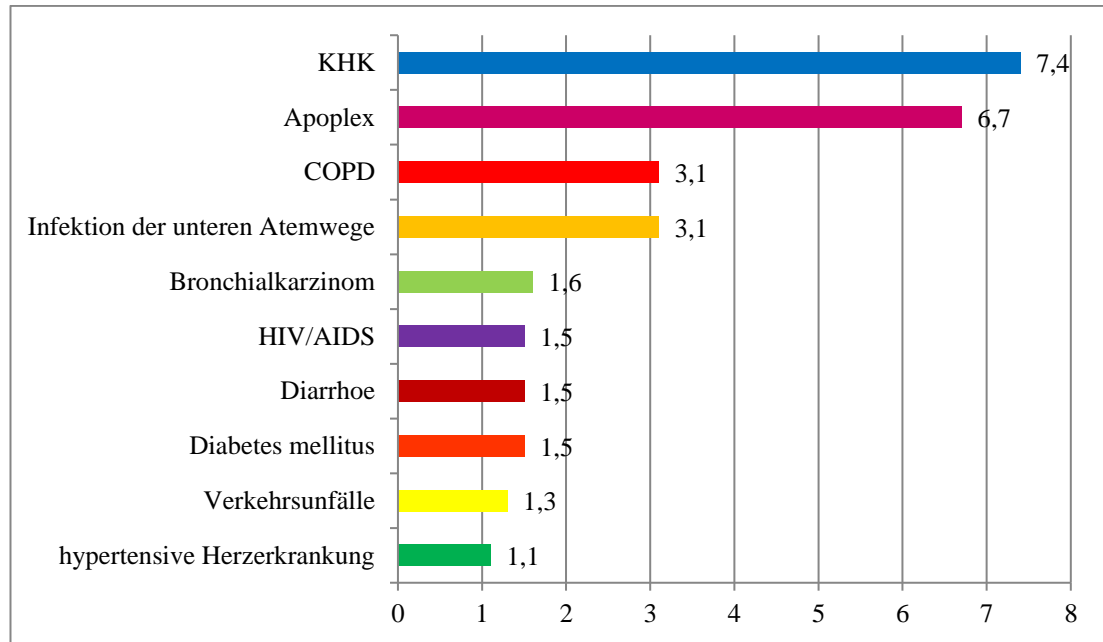


Abbildung 1: Top10 weltweiter Todesursachen, in Millionen, Stand Mai 2014

Die weltweit häufigste Todesursache im Jahr 2012 war bei 31% aller Verstorbenen eine kardiovaskuläre Erkrankung. Von diesen 31% verstarben 7,4 Millionen an den Folgen einer KHK (koronare Herzerkrankung). [World Health Organization 2014]

1.2 Clopidogrel

Clopidogrel ist ein oral verabreichtes, inaktives Prodrug und benötigt die Metabolisierung und Aktivierung durch das in der Leber lokalisierte Cytochrom P450-System (CYP) um in seinen aktiven Thiol-Metaboliten umgewandelt zu werden. Dieser wiederum bindet an den Rezeptor P2Y₁₂ auf der Thrombozytenoberfläche und hemmt diesen irreversibel [Mehili 2015, Savi et al. 2000]. Der P2Y₁₂-Rezeptor wird normalerweise durch ADP aktiviert. Hierdurch kommt es zum Absinken des intrazellulären cAMP-Spiegels, woraus eine Aktivierung des GPIIb/IIIa-Rezeptors resultiert [Gachet 2008, Laine et al. 2016]. Die Aktivierung des GPIIb/IIIa-Rezeptors führt schließlich über Bindung von Fibrinogen zur Thrombozytenaggregation [Kossler et al. 2009].

In die Metabolisierung von Clopidogrel ist eine Vielzahl hepatischer CYP-Isoenzyme involviert, einschließlich CYP2C19, CYP3A4/5, CYP1A2, CYP2B6 und CYP2C9 [Kazui M 2010, Savi et al. 2000, Sibbing et al. 2009c] (Vgl. Abbildung 2).

Das Ansprechen auf eine Therapie mit Clopidogrel ist aber nicht einheitlich. Patienten mit einer niedrigeren Response, nach einigen Studien fast ein Viertel aller Patienten

ten [Gurbel et al. 2003, Lau et al. 2004], sind dementsprechend einem Risiko für ischämische Ereignisse, einschließlich ST, ausgesetzt [Angiolillo et al. 2007, Sibbing et al. 2009a, Siller-Matula et al. 2010]. Patienten mit einer erhöhten Response haben dagegen ein Risiko für Blutungen [Serebruany et al. 2010, Sibbing et al. 2010c].

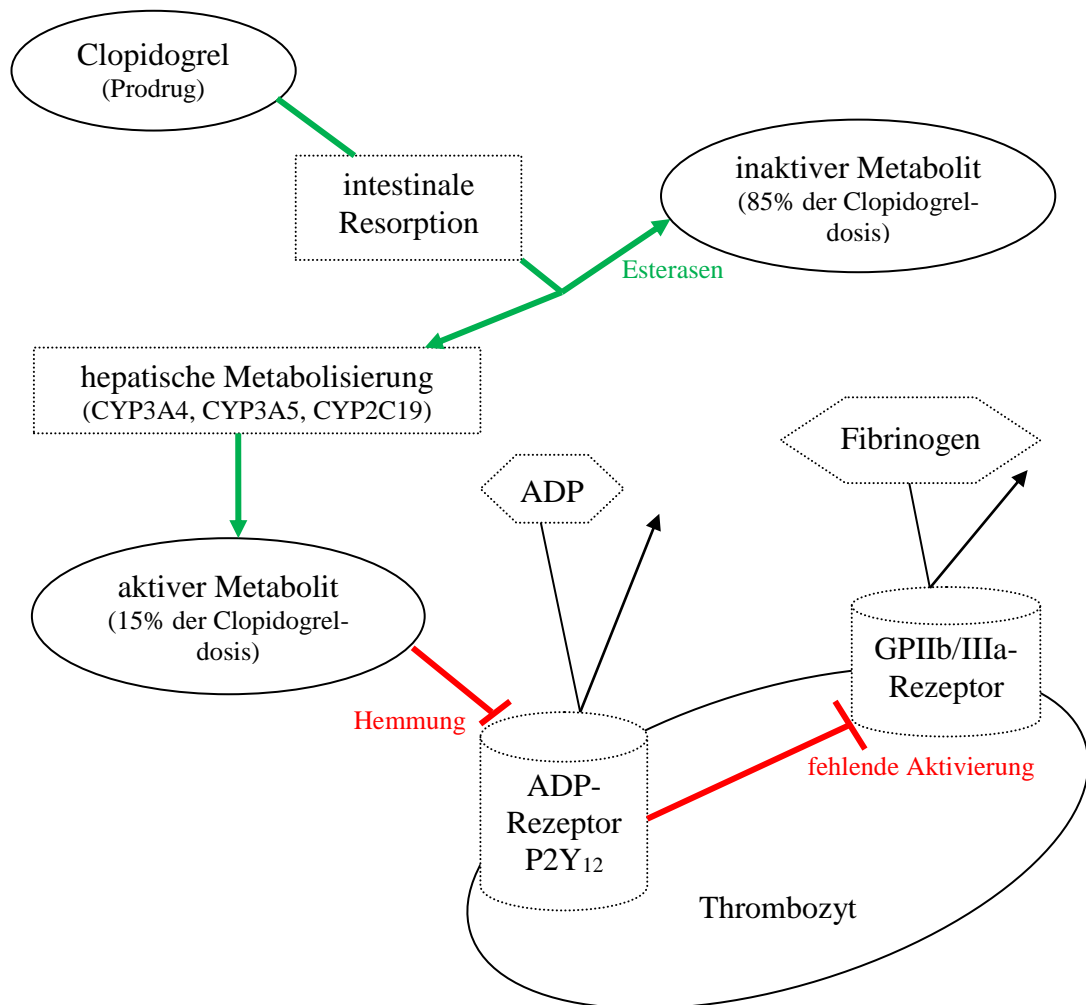


Abbildung 2: Metabolisierung von Clopidogrel durch bisher bekannte genetische Polymorphismen

Die intestinale Absorption des Prodrugs Clopidogrel wird limitiert durch eine intestinale Efflux-Pumpe (P-Glykoprotein, kodiert durch das ABCB1-Gen). Der Großteil des Prodrugs (85%) wird in inaktive Metabolite verstoffwechselt. Der kleinere Anteil (15%) wird durch verschiedene CYP450-Isoenzyme aktiviert. Diese Metabolite hemmen irreversibel den ADP-Rezeptor (kodiert durch das P2Y₁₂-Gen). Hierdurch fehlt die Aktivierung des Fibrinogen- Rezeptors GPIIb/IIIa [nach Simon et al. 2009, Fig. 1].

Immer häufiger zeigt sich in aktuellen Studien, dass das polymorph exprimierte Isoenzym CYP2C19 eine vorherrschende Rolle bei diesem Vorgang besitzt [Collet et al. 2009, Geisler et al. 2008b, Hulot et al. 2006, Mega et al. 2009, Sibbing et al. 2009d, Simon et al. 2009, Trenk et al. 2008]. Es existieren zwei häufige und funktionell relevante Polymorphismen des CYP2C19-Gens: eine loss-of-function-Mutation

(CYP2C19*2), welche eine versteckte Splicing-Stelle kodiert. Diese Mutation bewirkt einen kompletten Verlust der CYP2C19-Enzymaktivität. In der Vergangenheit haben einige Studien gezeigt, dass das Vorhandensein von *2 in Verbindung steht mit einer abgeschwächten Thrombozytenreaktion auf eine Clopidogreltherapie [Geisler et al. 2008b, Giusti B 2007, Mega et al. 2009] und dass diese Variante ein erhöhtes Risiko für ischämische Ereignisse einschließlich ST birgt [Buonamici et al. 2007, Collet et al. 2009, Geisler et al. 2008b, Gurbel et al. 2007, Gurbel et al. 2005, Hochholzer et al. 2006, Mega et al. 2009, Price et al. 2008, Sibbing et al. 2009a, Simon et al. 2009].

Die zweite Allelvariante ist CYP2C19*17. Hierbei handelt es sich um eine Mutation (-808C>T) in der Nähe des Promotors für das CYP2C19-Gen. Diese Mutation führt zu einer erhöhten Transkriptionsrate von CYP2C19 und dadurch zu einer gesteigerten Enzymfunktion [Sim et al. 2006]. Eine in solchen Maßen erhöhte Transkriptionsaktivität kann eine stark gesteigerte Aktivierung von CYP2C19-Substraten bewirken, was wiederum zu einem gesteigerten Ansprechen auf eine antithrombozytäre Therapie mit Clopidogrel führen kann. Obwohl ein erhöhtes Ansprechen einerseits die Prävention thrombotischer Ereignisse verbessern könnte, könnte es andererseits das Blutungsrisiko steigern.

Das Auftreten dieser periprozeduralen Blutungsereignisse ist eine der häufigsten Komplikationen nach PCI [Feit et al. 2007, Kinnaird et al. 2003, Manoukian et al. 2007, Mehran et al. 2009, Ndrepepa et al. 2008]. Neuere Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass Blutungen nach einer PCI einen ähnlichen Einfluss auf die 1-Jahres-Sterblichkeitsrate haben wie das Auftreten eines post-PCI-Myokardinfarkts [Mehran et al. 2009, Ndrepepa et al. 2008].

1.3 Das Prinzip der DAPT

Die Aktivierung der Thrombozyten erfolgt sowohl über den ADP-abhängigen Weg (Vgl. Abbildung 2) als auch über Thromboxan: Aus Arachidonsäure wird durch das Enzym COX-1 (Cyclooxygenase-1) Prostaglandin G2/H2 gebildet, aus dem durch die Thromboxansynthase Thromboxan A2 entsteht. Thromboxan bindet an den entsprechenden Rezeptor auf der Oberfläche der Thrombozyten. Hierdurch kommt es zur Verstärkung des Signals zur Thrombozytenaggregation. Acetylsalicylsäure blo-

ckiert irreversibel das Enzym COX-1 und hiermit die Thrombozytenaggregation über den Thromboxan-Weg [Kossler et al. 2009].

Eine Blockade dieser beiden Wege wird als duale Thrombozytenhemmung (DAPT, dual antiplatelet therapy) bezeichnet. Studien haben gezeigt, dass eine DAPT nach Koronarintervention das Risiko für Blutungen oder subakute Stentthrombosen signifikant reduziert im Vergleich zur konventionellen Antikoagulation [Bertrand et al. 1998, Schomig et al. 1996]. Die DAPT entspricht nach aktuellen Leitlinien einer dauerhaften Therapie mit ASS kombiniert mit einem P2Y₁₂-Rezeptor-Antagonisten (Ticagrelor, Prasugrel, Clopidogrel) für 12 Monate [Mehili 2015].

Die Dauer der Gabe eines P2Y₁₂-Rezeptor-Antagonisten kann bei vermutetem hohem Blutungsrisiko auf 3-6 Monate nach Implantation eines Drug-eluting Stents reduziert werden [Mehili 2015]. Studien haben aber gezeigt, dass eine Unterbrechung dieser Therapie innerhalb der ersten 12 Monate nach PCI ein signifikantes Risiko für eine ST nach DES-Implantation darstellt [Airoldi et al. 2007, Grines et al. 2007, Iakovou et al. 2005, Jochem W. van Werkum, Park et al. 2008].

Bei Patienten mit hohem ischämischem Risiko (z. B. Stentthrombose) und niedrigem Blutungsrisiko kann entsprechend der aktuellen Leitlinien eine DAPT auch für mehr als 1 Jahr erwogen werden [Mehili 2015].

1.4 Stentthrombosen

Stentthrombosen gehören zu den meist gefürchteten Komplikationen nach Stentimplantation. Sie sind oft ursächlich für Tod (20-40%), Myokardinfarkt (50-70%) und benötigen oft eine sofortige Wiederholung der Koronarintervention [Daemen et al. 2007, Doyle et al. 2007, Holmes et al. 2010, Iakovou et al. 2005, Kereiakes 2012]. Als Ursache einer ST gelten viele Faktoren, oft auch in Kombination [Kereiakes 2012]. Die individuelle Clopidogrel-Response ist einer dieser Faktoren und ist Gegenstand dieser Arbeit.

Die meisten Patienten erleiden eine ST nicht, weil die DAPT frühzeitig beendet wurde (<1% aller ST bei Patienten mit frühzeitigem Therapieende), sondern unter laufender DAPT [Airoldi et al. 2007, Kuchulakanti et al. 2006].

1.5 Ziele dieser Arbeit

Sowohl der isolierte Einfluss von *17 als auch der wechselseitige von *2 und *17 (einzeln und kombiniert) auf eine Clopidogrel-Erhaltungstherapie sind noch unbekannt. Aus diesem Grund wurden zwei Studien durchgeführt, die Gegenstand dieser Arbeit sind.

Ziel der ersten Studie war es den Einfluss von CYP2C19*17 auf die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation sowie auf das Risiko für Blutungsereignisse und Stentthrombosen in Abhängigkeit von diesem Polymorphismus bei Patienten mit Clopidogrel-Therapie nach koronarer Intervention zu untersuchen.

Die zweite Studie befasste sich mit dem isolierten sowie wechselseitigem Einfluss der Allelvarianten *2 und *17 des CYP2C19-Gens auf das Ansprechen auf Clopidogrel bei Patienten unter Erhaltungstherapie nach PCI.

Neben den genetischen Einflussfaktoren auf die hepatische Metabolisation von Clopidogrel gibt es auch weitere Ursachen für ein verändertes Ansprechen. Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten wie z. B. Omeprazol zeigten Sim et al [Sim et al. 2006]. Es gibt aber auch Studien, in denen keine klinische Relevanz von Omeprazol für den Metabolismus von CYP2C19-Substraten nachgewiesen werden konnte [Ohlsson Rosenborg et al. 2008, Simon et al. 2009]. Im Rahmen der zweiten Studie wurde auch der Einfluss von Omeprazol auf die Clopidogrel-Wirkung untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Patienten, Auswahlkriterien, Studiendesign

Beide Studien richteten sich nach der Deklaration von Helsinki und wurden von der zuständigen Ethikkommission bewilligt. Alle Patienten wurden über die PCI, die Thrombozytenfunktionstestungen und die Genotypisierung aufgeklärt und gaben schriftlich ihre Einwilligung („informed consent“) vor Einschluss in die Studien.

Die Bestimmung der Genotypen bzw. der Werte der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation wurde von verschiedenen Personen durchgeführt und erfolgte ohne Kenntnisse der jeweils anderen Ergebnisse oder des klinischen Outcomes.

2.1.1 Patientenkollektiv und Protokoll zur Testung auf CYP2C19*17

Im Zeitraum Februar 2007 bis April 2008 wurden 1608 Patienten für eine prospektiven Studie zur Thrombozytenfunktionstestung mittels Multiplate Analyser eingeschlossen (Deutsches Herzzentrum München und I. Medizinischen Klinik am Klinikum Rechts der Isar, TU München) [Sibbing et al. 2009a].

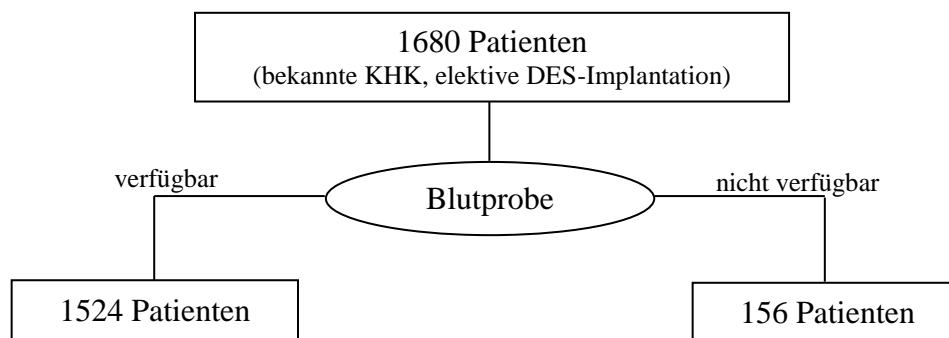


Abbildung 3: Patientenkollektiv zu CYP2C19*17

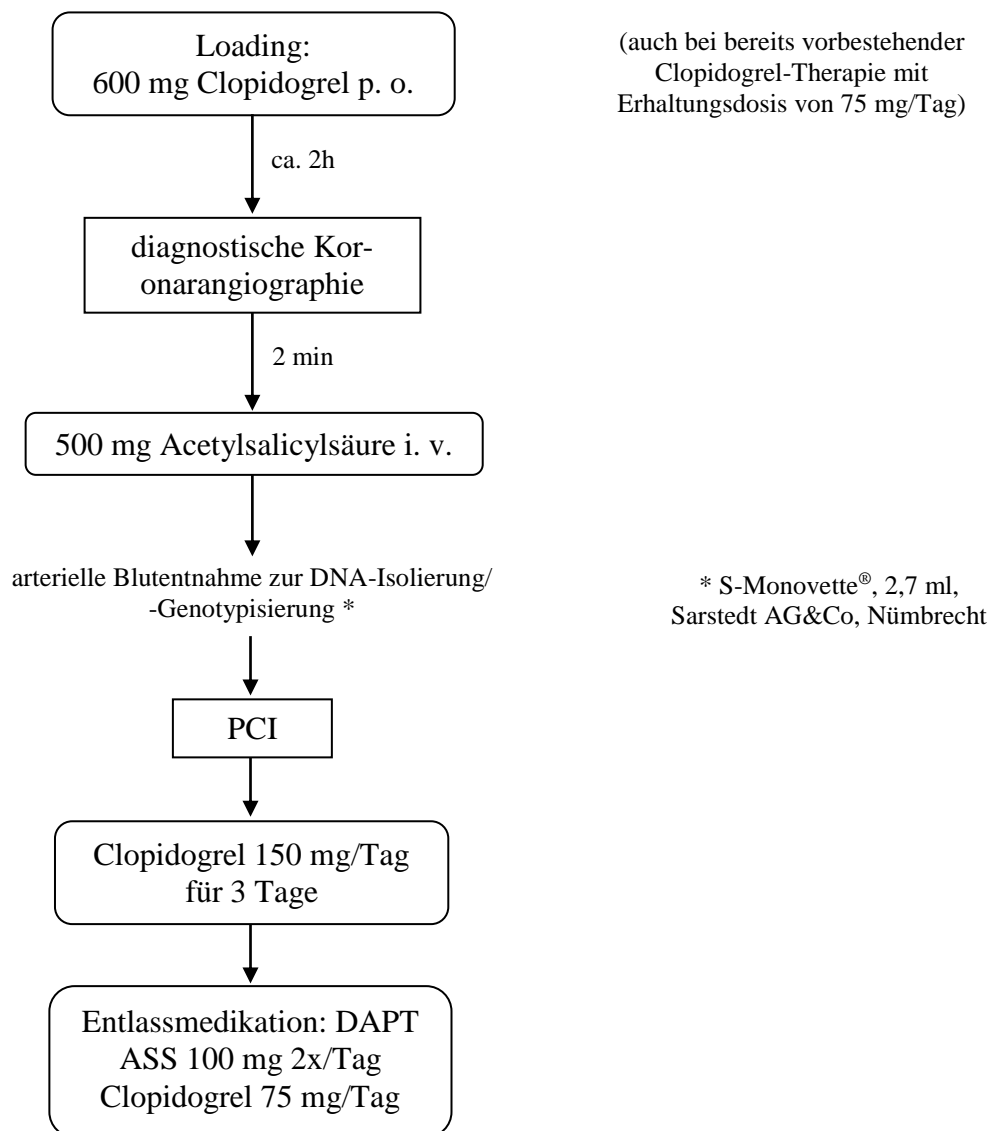
1680 Patienten stellten sich zur elektiven DES-Implantation bei vorbekannter KHK vor. Diese wurden für das erste Studienkollektiv eingeschlossen. Von diesen 1680 Patienten gaben 1524 Patienten ihre Einwilligung zur Thrombozytenfunktionstestung und zur Genotypisierung [Sibbing et al. 2009a].

Tabelle 1: Ein- und Ausschlusskriterien für die CYP2C19*17-Studie

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
<ul style="list-style-type: none"> – Unabhängig vom klinischen Zustand (stabile/instabile AP, NSTEMI, STEMI) zum Zeitpunkt des Eingriffs 	<ul style="list-style-type: none"> – Kontraindikation für ASS oder Clopidogrel – Therapie mit GPIIb/IIIa-Inhibitoren innerhalb der letzten 10 Tage vor der geplanten PCI

Legende zu Tabelle 1: Die Tabelle zeigt die Kriterien, nach denen die Patienten der *17-Studie ausgewählt wurden [Sibbing et al. 2009a].

Die Studie wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

**Abbildung 4: Studienprotokoll zu CYP2C19*17**

Diese Abbildung zeigt das Vorgehen im Rahmen dieser Studie vom Loading vor PCI bis hin zur Entlassung des Patienten. Direkt vor der PCI erfolgte jeweils die Blutentnahme zur Genotypisierung [Sibbing et al. 2009a].

2.1.2 Patientenkollektiv und Protokoll zur Testung auf CYP2C19*17 und CYP2C19*2

Zwischen August 2007 und September 2008 wurden im Rahmen dieser Studie am Deutschen Herzzentrum München (Technische Universität München) 1000 Patienten eingeschlossen [Sibbing et al. 2009c]. Diese Patienten unterzogen sich nach durchschnittlich 7 Monaten (IQR 6-8 Monate) einer koronarangiographischen Verlaufskontrolle. Zum Zeitpunkt dieser Kontrolle erhielten alle Patienten eine DAPT mit 100 mg Aspirin und 75 mg Clopidogrel täglich.

Tabelle 2: Ein- und Ausschlusskriterien für die CYP2C19*2 und *17-Studie

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
<ul style="list-style-type: none"> – stabiler klinischer Zustand – bestehende DAPT (100 mg Aspirin + 75 mg Clopidogrel) 	<ul style="list-style-type: none"> – ACS bei Aufnahme – Therapie mit GPIIb/IIIa-Inhibitoren innerhalb der letzten 10 Tage vor geplanter Thrombozytenfunktionstestung

Legende zu Tabelle 2: In dieser Tabelle werden die Kriterien Patientenauswahl für die *2/*17-Studie gezeigt [Sibbing et al. 2010a].

Bei Aufnahme erfolgte eine venöse Blutentnahme (1000 Patienten). An diesen gewonnenen Proben wurden die Genotypisierung (Einverständnis von 986 Patienten) und die Thrombozytenfunktionstestung durchgeführt.

2.2 DNA-Isolierung

2.2.1 Verbrauchsmaterialien

- Sarstedt AG & Co., Nümbrecht:
 - S-Monovette[®] 2,7 ml, 1,6 mg Kalium-EDTA/ml Blut
- Eppendorf, Hamburg:
 - Pipettenspitzen für 10, 100, 1000 µl Eppendorf-Pipetten
 - Pipettenspitzen für Multipette
 - Reaktionsgefäße (1,5 ml)
- Marchery-Nagel, Düren, NucleoSpin[®] Blood Quick Pure-Set:
 - NucleoSpin[®] Blood QuickPure Columns
 - Collection Tubes (2 ml)
 - Microcentrifuge Tubes (1,5 ml)

2.2.2 Chemikalien, Enzyme, Lösungen

- Marchery-Nagel, Düren, NucleoSpin[®] Blood Quick Pure-Set:
 - Lysis Buffer BQ1 (62,5 ml, Lyse-Puffer)
 - Wash Buffer BQ2 (Konzentrat, 20 ml)
(vor Verwendung Verdünnung mit 80 ml 100%igem Ethanol)
 - Elution Buffer BE (5 mM Tris/HCl, pH 8.5, 60 ml,
Auswaschungs-Puffer)
(vor Verwendung auf 70°C erwärmen)
 - Proteinase K (lyophilisiert, 75 mg)
(vor Verwendung Hinzufügen von 3,35 ml Proteinase Buffer)
 - Proteinase Buffer PB (8 ml)
- Ethanol 100%

2.2.3 Geräte

- Eppendorf, Hamburg:
 - Eppendorf Pipetten 10, 100, 1000 µl
 - Multipette[®] plus
 - Eppendorf Thermomixer 5436

- Scientific Industries, Bohemia, New York, USA:
 - Vortex-Genie 2™
- Jouan, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA:
 - Zentrifuge A14

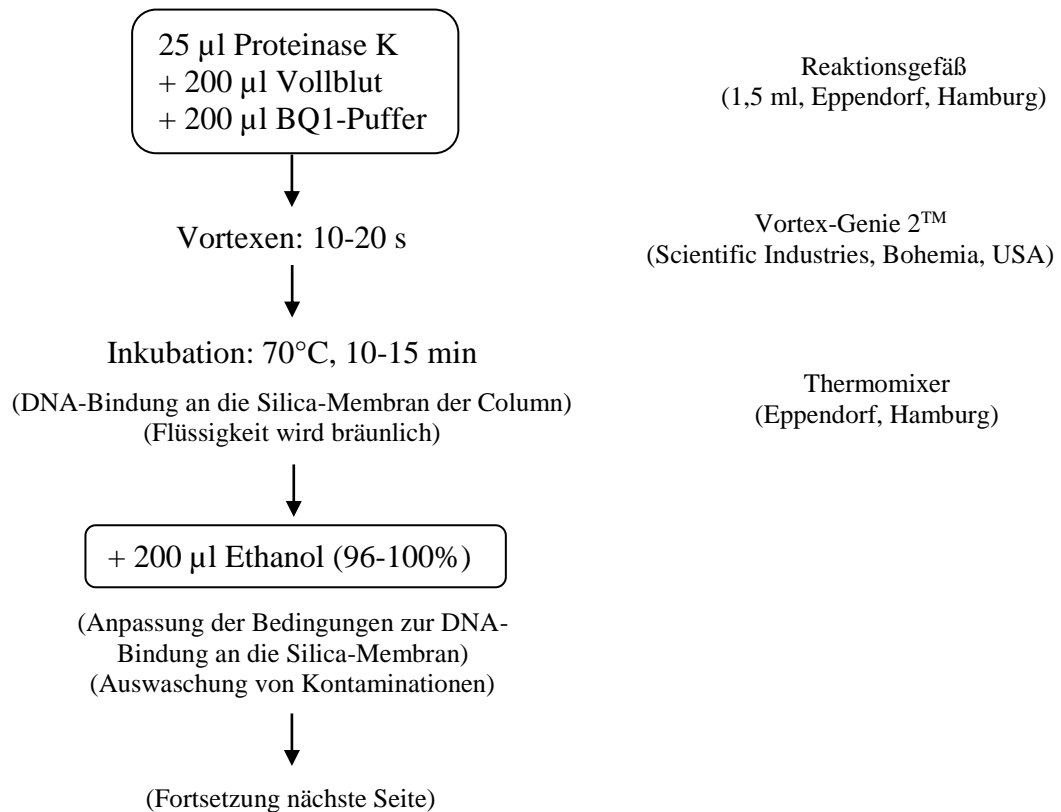
2.2.4 Durchführung

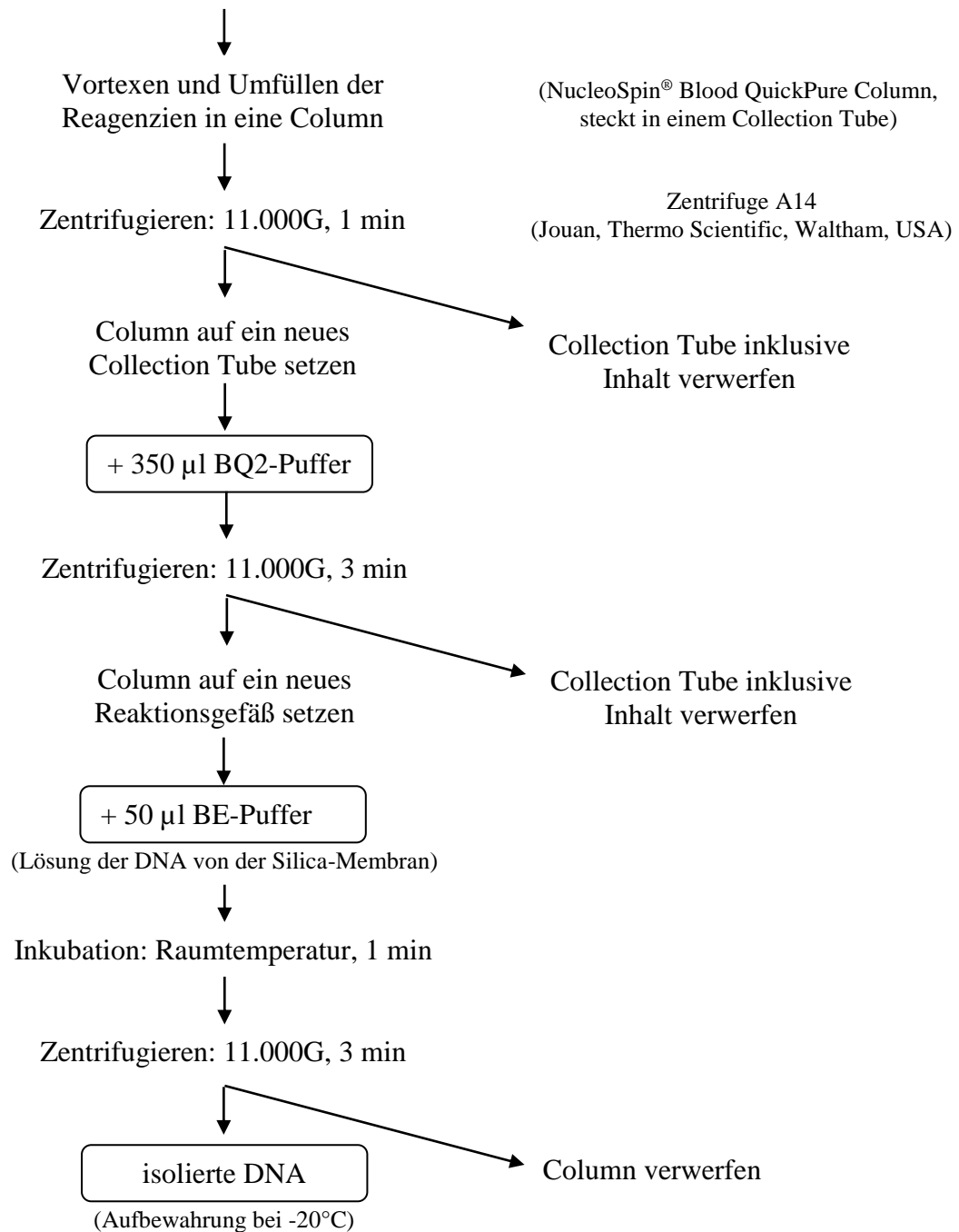
Mittels des NucleoSpin® Blood Quick Pure-Sets für 200 µl Vollblut erfolgte die Durchführung entsprechend des Protokolls [Machery-Nagel 2012]:

Vorbereitung der Reagenzien

- Proteinase K: in 3,35 ml Proteinase Buffer auflösen
- Wash Buffer BQ2: mit 80 ml Ethanol (100%) verdünnen
- Elution Buffer BE: auf 70°C erwärmen (Thermomixer, Eppendorf, Hamburg)

Lyse



**Abbildung 5: Lyse-Protokoll**

DNA wurde aus 200 µl Vollblut isoliert. Dies erfolgte entsprechend des Protokolls dieser Abbildung. Die verwendeten Reagenzien werden unter 2.2.2 beschrieben [Machery-Nagel 2012].

Die DNA-Isolierung erfolgte pro Blutprobe jeweils zweimal („Original“ und „Duplikat“) zur Qualitätskontrolle der Ergebnisse im Anschluss durch einen anderen Labormitarbeiter.

2.3 Genotypisierung

2.3.1 Verbrauchsmaterialien

- Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt:
 - Quali-PCR-Platten, 96-Well mit Halbrahmen
 - PCR-Sealing Film (78x120 + 10 mm Griffleiste)
- Eppendorf, Hamburg:
 - Pipettenspitzen für 2, 100, 1000 µl Eppendorf-Pipetten
 - Reaktionsgefäß (2,0 ml)

2.3.2 Chemikalien, Enzyme, Lösungen

- Corning Incorporated, Corning, NY, USA:
 - PCR-Wasser, gefiltert mittels Millipore-Anlage
- Thermo Scientific, Waltham, MA, USA:
 - ABsolute™ QPCR ROX Mix („Mastermix“)
 - enthält: Thermo-Start™ DNA-Polymerase, Reaktionspuffer, dNTPs, einschließlich dTTP, ROX (passiver Referenz-Farbstoff)
- Primer, Sonden und Pipettierschema (s. Tabelle 3)

Tabelle 3: Pipettierschema

	PCR-Wasser	Master-mix	Primer		Sonden	
			FORward	REVerse	FAM	VIC
CYP200-Mix	565 µl	850 µl	25,5 µl	25,5 µl	17µl	17µl
CYP210-Mix	565 µl	850 µl	25,5 µl	25,5 µl	17µl	17µl

Legende zu Tabelle 3: Anhand dieses Schemas wurde der jeweilige Mix mit Primern und Sonden zur Genotypisierung für die einzelnen Polymorphismen hergestellt. Mit dem CYP200-Mix lässt sich das *2-Allel genotypisieren, mit dem CYP210-Mix das *17-Allel. Die Reagenzien werden für den jeweiligen Mix von links nach rechts (innerhalb einer Zeile) zusammengefügt.

Primer	CYP200:	FORward	CYP201: 5'-GATATGCAATAATTTTCCCACTATCATTG-3'
		REVerse	CYP202: 5'-GGTGTCTTTTACTTTCTCCAAAATATCAC-3'
Primer	CYP210	FORward	CYP211: 5'-GTTTGGGAAGTTGTTTTGTTTTGCTAAA-3'
		REVerse	CYP212: 5'-ACTGGGATTTGAGCTGAGGTCTT-3'
Sonden	CYP200	FAM-CYP200:	5'-FAM-TTATTTCCCGGGAACC-3'
		VIC-CYP200:	5'-VIC-ATTATTTCCCAAGGAACC-3'
Sonden	CYP210	FAM-CYP210:	5'-FAM-TTCTCAAAGCATCTCTGAT-3'
		VIC-CYP210:	5'-VIC-TGTTCTCAAAGTATCTCTGAT-3'

2.3.3 Geräte

- Scientific Industries, Bohemia, NY, USA:
 - Vortex-Genie 2™

- Eppendorf, Hamburg:
 - Eppendorf-Pipetten 10, 100, 1000 µl
 - Multipette® plus
 - Centrifuge 5430

- Applied Biosystems, Foster City, CA, USA:
 - ABI GeneAmp® PCR-System 9700 und PCR-System 9600 Thermal Cycler
 - Taqman® ANP Genotyping Assays
 - ABI Prism Sequence Detector 7000
 - ABI Prism 7000 SDS Software, Version 1.0, ©2001-2002

2.3.4 Durchführung

Die Genotypisierung erfolgte mit einem TaqMan[®] SNP Genotyping Assay mittels ABI Prism Sequence Detector 7000 entsprechend der Standardprotokolle [Applied Biosystems 2003, 2006] und ohne Wissen um die Messergebnisse der Aggregationsmessungen der entsprechenden Patienten. Das Verfahren für CYP200 und CYP210 erfolgte mit dem jeweils entsprechenden Mix analog. Für die PCR wurde das Protokoll entsprechend der Abbildung 6 verwendet [Applied Biosystems 2010a].

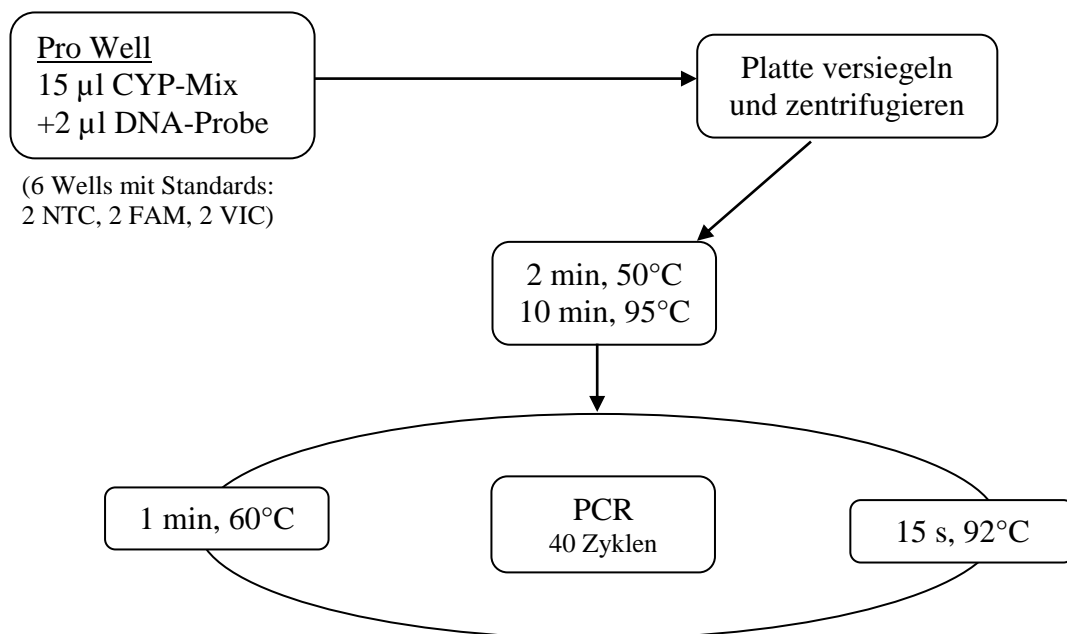


Abbildung 6: PCR-Protokoll

Die Abbildung zeigt die einzelnen Schritte des PCR-Programmes, die die DNA-Proben im PCR-Gerät durchlaufen [Applied Biosystems 2010a].

Im Anschluss erfolgte der 5' Nuclease Assay (Vgl. Abbildung 7): Jede TaqMan MGB Sonde bindet spezifisch an die entsprechende, komplementäre DNA-Stelle zwischen der forward- und der reverse-Primerstelle (Hybridisierung). Auf der Sonde befinden sich zwei Farbstoffe: Ein Reporter-Farbstoff (reporter dye, je nach Allel FAM oder VIC) und ein auslöschender Farbstoff (quencher dye). Dieser Quencher unterdrückt die Fluoreszenz des Reporters solange die Oligonukleotid-Sonde intakt ist und er sich deshalb in der Nachbarschaft des Reporters befindet. Die AmpliTaq Gold DNA[®] verlängert die an die Proben-DNA gebundenen Primer und spaltete von den hybridisierten Sonden den Quencher ab. Durch diese Spaltung wird der Reporter-Farbstoff vom Quencher räumlich getrennt. Dies zeigt sich durch eine Steigerung der Fluoreszenz des Reporter-

Farbstoffes. Auf diese Weise ist nachweisbar welche Allele in der jeweiligen DNA-Probe exprimiert waren [Applied Biosystems 2010b].

Zur Qualitätskontrolle erfolgte bei 20% der DNA-Proben eine Wiederholung der Genotypisierung durch einen zweiten Labormitarbeiter (Vgl. „Duplikat“ unter 2.2.4). Die Wiederholung zeigte identische Ergebnisse zur ersten Genotypisierung.

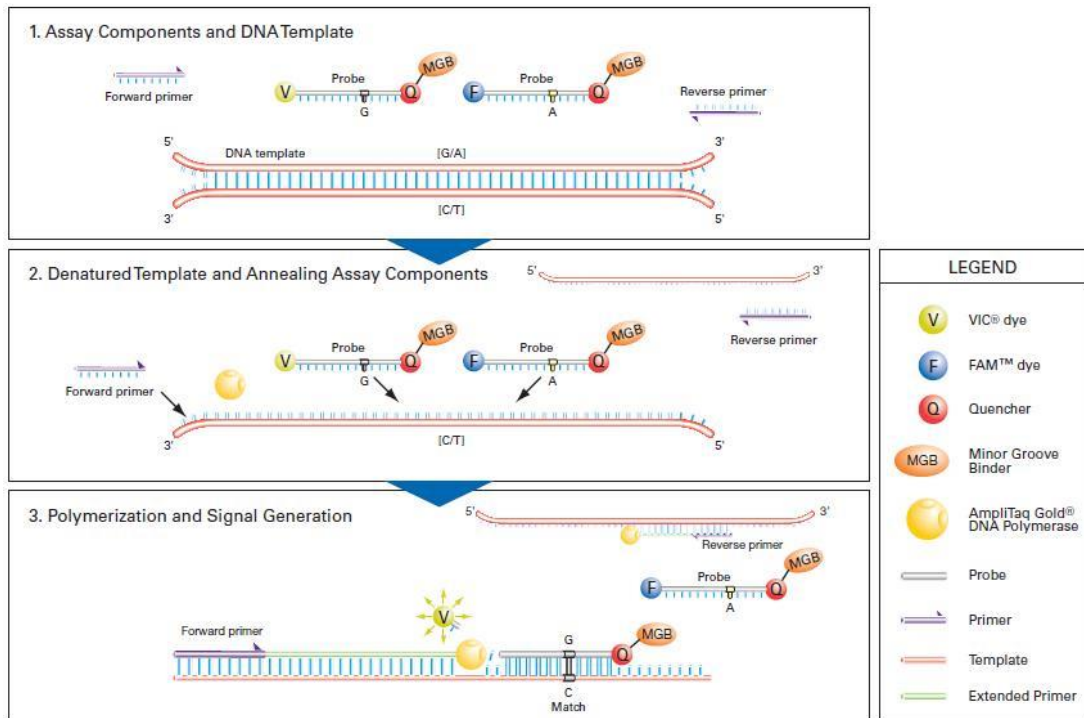


Abbildung 7: 5' Nuclease Assay

- 1. Assay-Komponenten (Primer, Sonden) und DNA-Probe:**
Auf jeder Sonde befindet sich ein Reporter-Farbstoff (FAM/VIC dye) und ein Quencher, ein Farbstoff, der das Signal des Reporters unterdrückt.
- 2. Denaturierte DNA und Hybridisierung:**
Anlagerung von Primern und Sonden an den jeweils passenden Abschnitten der Ziel-DNA.
- 3. DNA-Polymerisation und Signalgenerierung:**
Die angelagerten Primer werden durch die Polymerase verlängert. Hierbei wird von angelagerten Sonden der Quencher abgespalten, der somit das Signal des Reporter-Farbstoffes (Fluoreszenz) nicht mehr unterdrückt [Applied Biosystems 2006, Fig. 1].

Die Auslesung der Fluoreszenzen der einzelnen Wells erfolgte mittels ABI Prism 7000 SDS (Vgl. Abbildung 8).

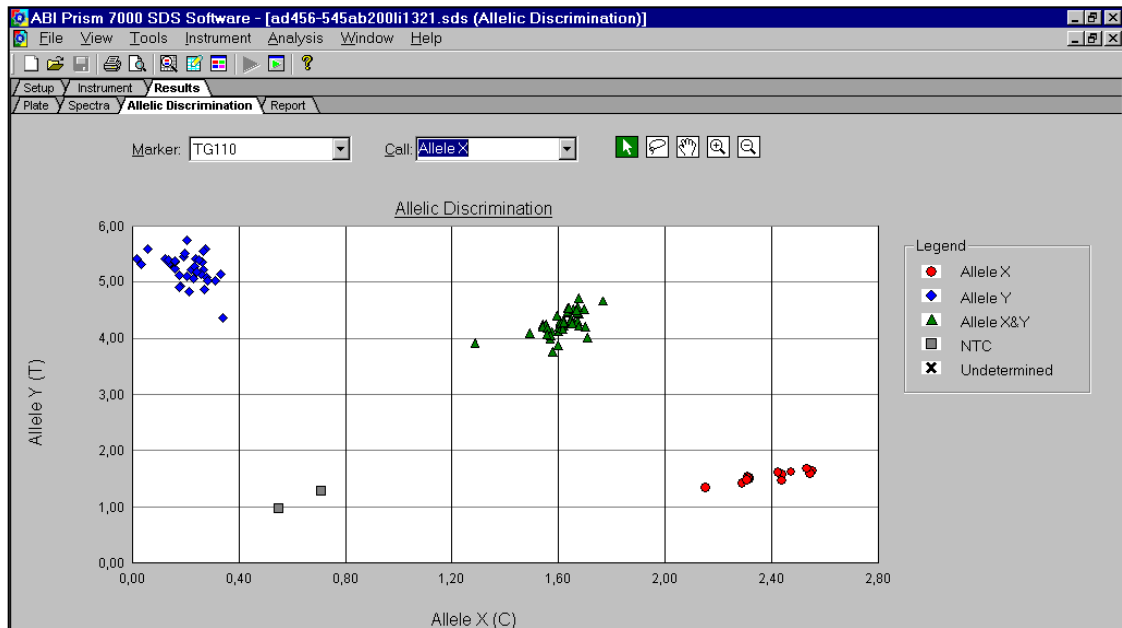


Abbildung 8: Beispiel einer Allel-Bestimmung mittels ABI Prism 7000 SDS aus einer eigenen Messung

◆ = FAMTM-Allel (wt)

● = VIC[®]-Allel (mutiertes Allel, *2 bzw. *17)

▲ = heterozygot

■ = NTC (no template control, neutrale Probe ohne DNA)

Die Abbildung zeigt die Auslesung der Fluoreszenzen von 96 Proben: 6 Proben sind Standard-Proben (2x NTC, 2x FAMTM-Allel, 2xVIC[®]-Allel), so lassen sich die anderen 90 Proben eindeutig einem der beiden Allele oder auch beiden Allelen (heterozygot) zuordnen.

2.4 Multiple Electrode Platelet Aggregometry (MEA)

2.4.1 Verbrauchsmaterialien

- Dynabyte medical, Dynabyte GmbH, München:
 - 4,5 ml-Röhrchen mit Lepirudin beschichtet (25 µg/ml, Refludan[®])
 - Multiplate[®] Messzellen
 - Pipettenspitzen 5-350 µl für die elektronische Biohit Pipette
 - NaCl-Vorwärmröhrchen
 - Aliquotiergefäße für ADPtest, ADP HStest
- Eppendorf, Hamburg:
 - Pipettenspitzen für 200 µl, 1000 µl-Pipetten
 - Reaktionsgefäße (1,5 ml)

2.4.2 Chemikalien, Enzyme, Lösungen

- DeltaSelect GmbH, Dreieich:
 - Isotonische Natriumchlorid-Lösung (0,9%, erwärmt auf 37°C)
- destilliertes Wasser
- Dynabyte medical, Dynabyte GmbH, München:
 - ADPtest: 1,0 ml ADP (trockenes Reagenz), lyophilisiert (0,2 mM)
(anlösen mit 1,0 ml destilliertem Wasser, bei Raumtemperatur 10 min leicht schwenken, auf die Aliquotiergefäße mit je 200 µl verteilen)
 - PGE1: 1,0 ml Prostaglandin E1 (trockenes Reagenz),
lyophilisiert (0,3 µM)
(anlösen mit 1,0 ml destilliertem Wasser, bei Raumtemperatur 10 min leicht schwenken, auf die Aliquotiergefäße mit je 200 µl verteilen)

2.4.3 Geräte

- Dynabyte medical, Dynabyte GmbH, München:
 - Multiplate[®] Analyzer
 - Elektronische Pipette
- Eppendorf, Hamburg:
 - Eppendorf-Pipetten 200 µl, 1000 µl

- IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen:
 - IKA[®] MS1 Minishaker

2.4.4 Durchführung

MEA ist eine schnelle (ca. 10 Minuten) und standardisierte Messmethode zur Bestimmung der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation. Es wird Vollblut verwendet, eine Zentrifugierung vor der Messung zur Plasmagewinnung - wie bei der LTA - entfällt [Dynabyte medical 2009, Sibbing et al. 2009a].

Die Messungen wurden ohne Kenntnis der Ergebnisse der Genotypisierung durchgeführt. Arteriellcs Vollblut wurde innerhalb von 30-180 min nach Blutentnahme analysiert (s. Abbildung 9). Als Behältnisse für die Messung dienten die entsprechenden Messzellen mit Rührstäben.

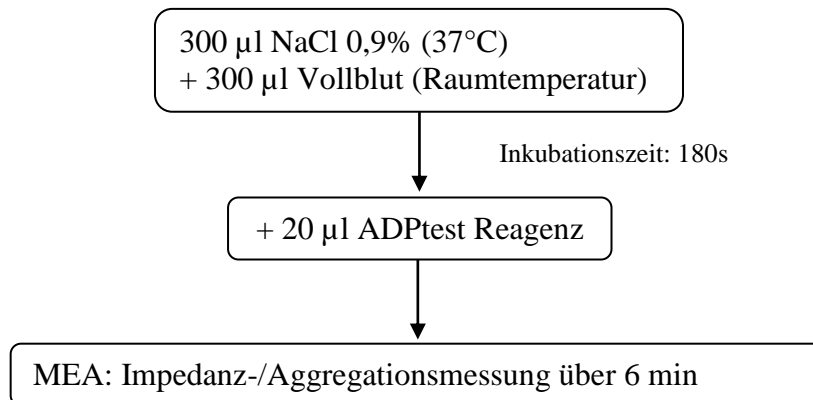


Abbildung 9: Protokoll zur Durchführung der Multiplatelet Aggregometrie

Die Abbildung zeigt das Pipettierschema für eine Aggregationsmessung mittels MEA [Dynabyte medical 2009, Sibbing et al. 2008a, Sibbing et al. 2009a]

Die Messung der Aggregometrie beruht auf einer Messung der Impedanzänderung. In den Messzellen befinden sich je zwei Elektroden, die in die Mischung aus Vollblut und Reagenzien eintauchen. An diesen Elektroden kommt es durch die Akkumulation der Thrombozyten zu einer Änderung des elektrischen Widerstandes zwischen beiden Elektroden. Diese wird pro Messzelle zweimal aufgezeichnet und als Aggregationskurven (Mittelwert der Doppelmessung, Vgl. Abbildung 10 und Abbildung 11) bzw. als Fläche (AUC) dargestellt [Dynabyte medical 2006].

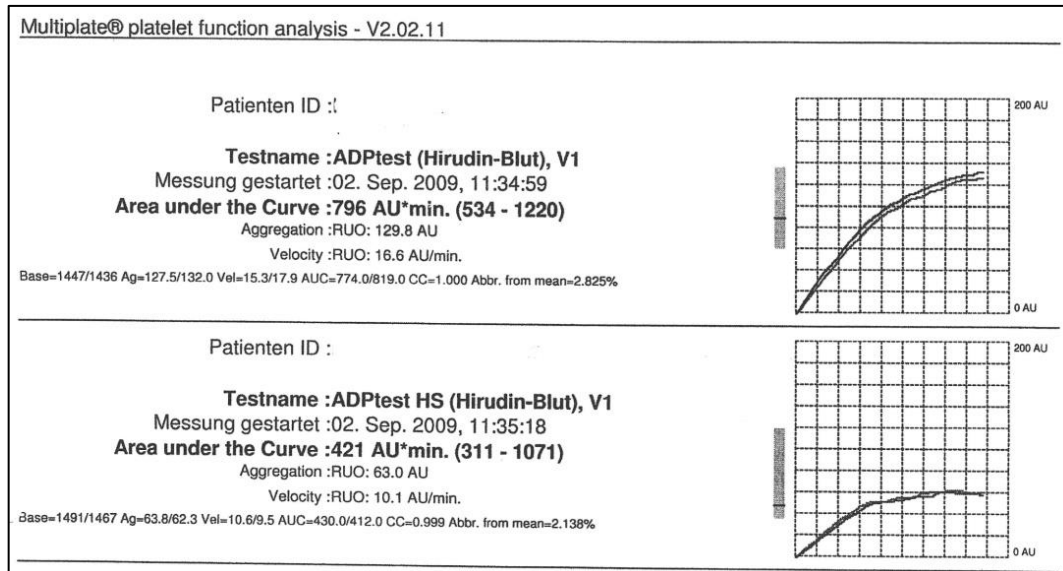


Abbildung 10: Beispiel einer Low-Response bei einer eigenen Multiplatemessung

Die Abbildung zeigt die Zunahme des elektrischen Widerstandes an den Elektroden (y-Achse) in Bezug auf die Zeit (x-Achse). Je höher der Widerstand und damit die Gerinnung ist, desto geringer ist das Ansprechen auf Clopidogrel. Die Fläche unter den Kurven (AUC, Area under the Curve) ist ein Maß für die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation. Der ADPtest HS unterscheidet sich vom ADPtest nur durch die Zugabe von Prostaglandin E1. Hierdurch kann die Aggregation sensitiver erfasst werden als mit dem ADPtest.

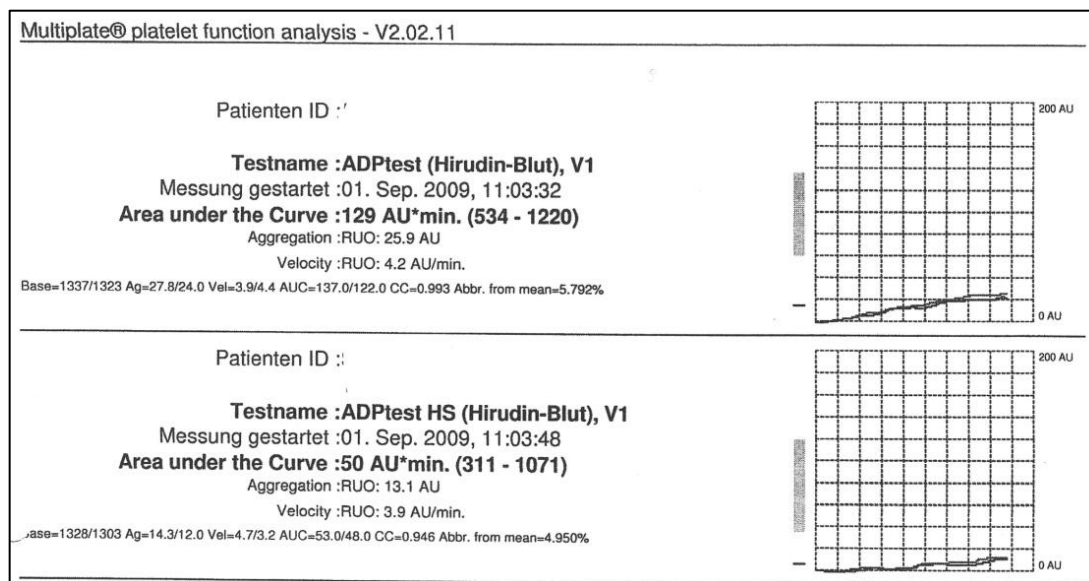


Abbildung 11: Beispiel einer High-Response bei einer eigenen Multiplatemessung

Im Vergleich zu Abbildung 10 zeigt diese Abbildung eine High-Response. Die AUC fällt deutlich geringer aus, da aufgrund der erhöhten Response auf Clopidogrel die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation stärker reduziert ist. Auch hier wurde als Kontrolle ein ADPtest HS durchgeführt.

Der ADPtest ist sensitiv gegenüber einer ADP-Rezeptor-Blockade durch direkte ADP-Rezeptor-Antagonisten sowie Thienopyridine, der Anwesenheit von GP IIb/IIIa-Antagonisten in der Probe oder einem Mangel an GP IIb/IIIa-Rezeptoren. Nicht oder

gering sensitiv ist dieser Test gegenüber einer COX-Hemmung z. B. durch Acetylsalicylsäure [Dynabyte medical 2009].

ADP führt zu einer Stimulation der Thrombozyten-ADP-Rezeptoren, als wichtigster sei hier P2Y₁₂ erwähnt, der durch Thienopyridine wie Clopidogrel blockiert wird. Diese Blockade führt zu einer Hemmung der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation. Eine reduzierte ADP-induzierte Thrombozytenaggregation zeigt sich hierbei auch bei Patienten mit einer Therapie mit GP IIb/IIIa-Antagonisten oder anderen Thienopyridinen [Dynabyte medical 2009].

Um eine sensitivere Erfassung des Effektes von Clopidogrel zu ermöglichen, gibt es zusätzlich den ADPtest HS (kombinierte Aktivierung der Thrombozyten durch ADP und Prostaglandin E1). Hierbei erfolgt nach der Inkubation und vor der Gabe des ADP-Reagenz die Zugabe von 20 µl PGE1 Reagenz [Dynabyte medical 2009].

Prostaglandin E1 ist ein natürlicher Thrombozytenhemmer. Die Bindung an einen Prostaglandin-Rezeptor auf der Thrombozytenoberfläche führt zu einer intrazellulären Steigerung des cAMP-Spiegels (second messenger). Ein abfallender cAMP-Spiegel aktiviert die Thrombozyten. Kommt es jedoch zu einem Anstieg des cAMP-Spiegels werden die Thrombozyten gehemmt. Somit kommt es in Blutproben von Patienten ohne antithrombozytäre Therapie durch Prostaglandin E1 zu einer moderaten Hemmung. Bei Patienten mit z. B. einer Clopidogrel-Therapie wird die Sensitivität des ADPtests für die hemmende Wirkung von Clopidogrel deutlich gesteigert [Dynabyte medical 2009].

2.5 Studienendpunkte, Definitionen

2.5.1 Studienendpunkte der Studie zu CYP2C19*17

Betrachtet wurde ein postinterventioneller Zeitraum von 30 Tagen. Als primärer Sicherheitsendpunkt (clinical safety endpoint) wurde die Inzidenz von großen und kleinen Blutungen entsprechend der TIMI-Kriterien gesehen (s. 2.5.3) [Mehran et al. 2011]. Der primäre Wirksamkeitsendpunkt (clinical efficacy endpoint) dieser Studie war die kumulative Inzidenz einer Stentthrombose (nachweisbar oder wahrscheinlich). Als eindeutige ST wurde ein ACS mit Nachweis einer Thrombose (angiographisch oder pathologisch) entsprechend der ARC-Kriterien definiert (s. 2.5.4) [Cutlip et al. 2007]. Jeglicher ungeklärter Tod oder Myokardinfarkt im Bereich des entsprechenden Stromgebietes ohne angiographischen Nachweis einer ST oder einer verantwortlichen Läsion innerhalb des Beobachtungszeitraumes wurde im Rahmen einer wahrscheinlichen ST gewertet [Cutlip et al. 2007]. Zusätzlich wurde die allgemeine Inzidenz von Tod und Myokardinfarkt entsprechend der TIMI-Kriterien (neue pathologische Q-Zacke im EKG, Anstieg des CK-MB-Serumspiegels mindestens dreifach über dem normalen Referenzbereich) erhoben.

2.5.2 Singulärer und wechselseitiger Einfluss von CYP2C19*2 und CYP2C19*17

Als cut-off-Wert im Sinne einer Low-Response für Clopidogrel wurde 468 AU*min definiert. Patienten mit höheren Aggregationswerten haben entsprechend vorhergehender Studien [Sibbing et al. 2009a, Sibbing et al. 2010c] ein deutlich erhöhtes Risiko für Stentthrombosen.

Als Cut-off-Wert für eine High-Response wurde ein Wert von 188 AU*min festgesetzt, da niedrigere Aggregationswerte in Zusammenhang mit einem erhöhten Blutungsrisiko stehen [Sibbing et al. 2010c].

Zweiter Aspekt dieser Studie war der wechselseitige Einfluss beider Allelvarianten auf die Aggregationswerte. Zur Auswertung wurden die Patienten in 4 Gruppen aufgeteilt entsprechend der Abwesenheit (-) oder Anwesenheit (+) dieser Varianten:

Tabelle 4: Gruppeneinteilung nach Genotypen

Gruppe	Genotyp
1	(+)*17/(-)*2
2	(-)*17/(-)*2
3	(+)*17/(+)*2
4	(-)*17/(+)*2

Legende zu Tabelle 4: Die Tabelle zeigt die Einteilung der vier Studiengruppen entsprechend der Anwesenheit (+) oder Abwesenheit (-) der zwei Polymorphismen *2 und *17 [Sibbing et al. 2010a].

Zusätzlich wurde auch der Einfluss einer Komedikation mit Omeprazol (im Sinne einer erworbenen *2-Fehlfunktion) im Vergleich zu einer angeborenen *2-loss-of-function-Mutation ausgewertet.

2.5.3 Blutungsereignisse entsprechend der TIMI-Kriterien

Die Blutungsereignisse wurden entsprechend der TIMI-Kriterien (s. Tabelle 5) registriert.

Tabelle 5: TIMI-Kriterien für Blutungsereignisse

Groß <i>„Major Bleeding“</i>	<ul style="list-style-type: none"> – jegliche intrakranielle Blutung (ausgeschlossen: Mikrohämorragien < 10mm) – offenkundige Hinweise auf Hb-relevante Blutungen (Hb-Abfall \geq 5g/dl) – tödliche Blutung (innerhalb von 7 Tagen)
Klein <i>„Minor Bleeding“</i>	<ul style="list-style-type: none"> – offenkundig, inkl. Bildgebung, mit Hb-Abfall von 3-5g/dl – Blutung mit erforderlicher ärztlicher Aufmerksamkeit – Blutungszeichen mit erforderlicher ärztliche Handlung (chirurgische Intervention, Pausieren, Absetzen oder Abänderung der Medikation bzw. Dosis) – Blutungszeichen mit sofort nötiger ärztlicher Evaluierung der klinischen Situation mit anschließend benötigter Diagnostik (Laborchemie, Bildgebung)

Legende zu Tabelle 5: ST, die innerhalb von 30 Tagen nach erfolgter PCI auftraten, wurden in unseren Studien nach den Kriterien dieser Tabelle erfasst [Mehran et al. 2011].

2.5.4 Definition einer Stentthrombose

Für die o.g. Studien wurde die ARC-Definition für ST verwendet (s. Tabelle 6).

Tabelle 6: ARC-Definitionen für Stentthrombosen

eindeutig	<ul style="list-style-type: none"> – Angiographische Bestätigung und zusätzlich eines der folgenden Kriterien innerhalb von 48 Stunden: <ul style="list-style-type: none"> • Plötzlicher Beginn ischämischer Symptome in Ruhe • Neue ischämiebedingte EKG-Veränderungen • typische laborchemische Veränderungen kardialer Biomarker • nichtokkludierender Thrombus (nicht kalzifizierter Füllungsdefekt/Aufhellung umgeben von Kontrastmittel auf 3 Seiten oder innerhalb der Stenose, sichtbar in mehreren Projektionen <u>oder</u> Verbleib von Kontrastmittel im Lumen <u>oder</u> sichtbare Embolisation endoluminalen Materials nach distal) • Okkludierender Thrombus TIMI 0 oder TIMI 1 Fluss innerhalb des Stents oder proximal des Stents bis zum nächsthöher gelegenen Seiten- oder Hauptast – Bestätigung einer frischen Stentthrombose im Rahmen einer Obduktion oder Gewebeuntersuchung nach Thrombektomie
wahrscheinlich	<ul style="list-style-type: none"> – jeglicher ungeklärter Tod innerhalb von 30 Tagen nach PCI (Bei Studien mit STEMI-Patienten kann der Ausschluss von ungeklärten Todesfällen innerhalb von 30 Tagen als Beweis einer Wahrscheinlichen ST erachtet werden.) – Jeglicher MI mit akuter Ischämie im Versorgungsgebiet des zuvor implantierten Stents, unabhängig vom zeitlichen Abstand zur Implantation, ohne notwendigen angiographischen ST-Nachweis, bei fehlender alternativer Ischämieursache
möglich	<ul style="list-style-type: none"> – jeglicher ungeklärter Todesfall im Zeitraum von 30 Tagen nach Koronarintervention bis zum Ende des Follow-ups
frühe ST	<ul style="list-style-type: none"> – akut: bis 24 Stunden nach Intervention – subakut: innerhalb von 24 Stunden bis 30 Tagen
späte ST	<ul style="list-style-type: none"> – mehr als 30 Tage bis 1 Jahr nach Intervention
sehr späte ST	<ul style="list-style-type: none"> – mehr als 1 Jahr nach Intervention

Legende zu Tabelle 6: Das Auftreten von ST innerhalb von 30 Tagen nach erfolgter PCI fand Eingang in unsere Studie. Ihre Einteilung erfolgt mittels den ARC-Definitionen [Cutlip et al. 2007, Kereiakes 2012].

2.6 Statistische Methoden

Alle Analysen wurden mit dem Software Package S-PLUS (Insightful Corp, Seattle, Wash.) ausgeführt. Für alle statistischen Analysen wurde ein p-Wert $<0,05$ als statistisch signifikant erachtet.

Aufgrund des doppelten Chromosomensatzes eines jeden Menschen (Ausnahme X- und Y-Chromosom) liegen immer zwei Ausführungen des gleichen Genes vor. Diese zwei Ausführungen können jedoch unabhängig voneinander mutieren. Aus diesem Grund müssen jeweils 3 Gruppen untersucht werden:

- Wildtyp (wt/wt, beide Gene unverändert)
- heterozygot mutiert (wt/*2 oder wt/*17)
- homozygot mutiert (*2/*2 oder *17/*17)

2.6.1 Statistische Methoden für die Studie mit CYP2C19*17

In dieser Studie wurden als Methoden der χ^2 -Test, der Kolmogorov-Smirnov-Test, der Kruskal-Wallis-Test, der Wilcoxon-Test, die Bootstrap-Methode, die Odd's Ratio sowie die lineare und logistische Regressionsanalyse (einfach und multivariat) verwendet. Deren Anwendung wird im Folgenden einzeln erläutert.

Daten wie Geschlecht, Diabetes mellitus, Rauchen, etc. (nominalskalierte Daten) oder z. B. der Status der Gefäßerkrankung (ordinalskalierte Daten) sind kategoriale Variablen. Diese wurden mittels χ^2 -Test verglichen um die Unabhängigkeit dieser Merkmale von den Genotypen zu überprüfen [Weiß 2013, S. 200 ff.].

Der Kolmogorov-Smirnov-Test ist eine Alternative zum χ^2 -Test (besonders bei kleinen Stichproben) und überprüft die statistische Verteilung in einer Gruppe mit der Wahrscheinlichkeitsverteilung in einer anderen Gruppe auf Übereinstimmung [Weiß 2013, S. 210]. In dieser Studie wurde er verwendet um zu überprüfen ob bei den erhobenen kontinuierlichen Daten (z. B. Werte der ADP-induzierten Gerinnung) eine Normalverteilung vorliegt.

Bei normalverteilten, stetigen Daten erfolgte ein Vergleich unter den einzelnen Gruppen mittels einer einseitigen Varianzanalyse. Hiermit wird die Abweichung der erhobenen Werte vom Mittelwert bestimmt [Weiß 2013, S. 195].

Die Werte der ADP-induzierten Gerinnung jedoch sind nicht normalverteilt. Deshalb wurden die Mediane der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation miteinander verglichen: Beim Vergleich zwischen drei Genotypengruppen wurde der Kruskal-Wallis-Test angewendet [Weiß 2013, S. 195, 283]. Für den Vergleich der Mediane zweier Gruppen wurde der Wilcoxon-Test verwendet [Weiß 2013, S. 189].

Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht beschreibt die Genotypenverteilung eines autosomalen Gens mit den Allelhäufigkeiten p und q ($q=1-p$). Es wird u.a. angewendet um bei dominant-rezessiven Erbgängen den Anteil der heterozygoten Genotypen zu berechnen bzw. vorherzusagen [Mayo 2008]. In dieser Arbeit wurde mittels Pearson's χ^2 -Test geprüft, ob die beobachteten Häufigkeiten denen des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts entsprechen [Mayo 2008, Weiß 2013, S. 206].

Wegen der nichtparametrischen Verteilungsfunktion wurde die Bootstrap-Methode verwendet um die Konfidenzintervalle für die Differenzen der Mediane der Thrombozytenaggregation für die voneinander unabhängigen Patientengruppen zu erhalten. Hierzu werden aus ein und derselben Gruppe wiederholt Stichproben gezogen und hieraus dann das Konfidenzintervall berechnet [Efron 1979].

Das 95%-Konfidenzintervall (CI) gibt bei der Auswertung von Stichproben ein Intervall an, das mit 95% Wahrscheinlichkeit einen zu erwartenden Messwert bei zukünftigen Messungen enthält. Die fehlenden 5% geben die Irrtumswahrscheinlichkeit an, mit der ein Messwert außerhalb des CI liegt [Weiß 2013, S. 151].

Ein Odd ist das Verhältnis sich ergänzender Häufigkeiten q und $(1-q)$ [Weiß 2013, S. 48]. Der Quotient zweier Odds wird als Odd's Ratio bezeichnet. Die Odd's Ratio (OR) beschreibt die Stärke des statistischen Zusammenhangs zweier verschiedener Merkmale [Weiß 2013, S. 48, 51, 250].

Tabelle 7 zeigt beispielhaft die in die Berechnung der OR eingehenden Daten für das relative Risiko eines *17-Trägers eine Blutungskomplikation zu erleiden. Die Größen a, b, c und d entsprechen dabei beobachteten Fallzahlen.

Tabelle 7: Beispiel für die Berechnung einer OR

	Blutung	keine Blutung
*17	a	b
wt	c	d

$$OR = \frac{a}{c} \div \frac{b}{d} = \frac{a \cdot d}{c \cdot b}$$

Legende zu Tabelle 7:

Hier wird mit allgemeinen Zahlen die Berechnung der OR für das relative Risiko eines *17-Trägers für Blutungskomplikationen gezeigt. Die Größen a, b, c und d entsprechen beobachteten Fallzahlen.

Für die OR gilt:

OR = 1 kein Zusammenhang zwischen beiden Merkmalen
 OR deutlich >1 das relative Risiko einer Blutung für *17 Träger ist erhöht
 OR deutlich <1 *17 ist protektiv für Blutungen

Zusätzlich sollte aber immer das Konfidenzintervall und der p-Wert bestimmt werden um die Signifikanz des Zusammenhanges vollständig beurteilen zu können [Weiß 2013, S. 251].

Mit einer Regressionsanalyse wird ein mathematischer Zusammenhang zwischen zwei Merkmalen statistisch hergeleitet. Überprüft werden können sowohl lineare als auch logistische Zusammenhänge. Im Rahmen dieser Arbeit wird bei linearen Regressionsanalysen der Buchstabe β für die Steigung der Regressionsgerade verwendet (β -Koeffizient) und stellt somit einen Gewichtungsfaktor für die unabhängige Variable dar. Der statistisch berechnete Standardfehler SE gibt die Schwankungsbreite um die berechnete Regressionsgerade an. Diese Schwankungsbreite beschreibt die Streuungen sowohl der beobachteten als auch weiterer zu erwartender Messwerte [Weiß 2013, S. 81 ff., 215].

Bestimmen mehrere unabhängige Variablen x_i die Zielgröße bzw. abhängige Variable y , so spricht man von einer multiplen oder multivariaten Regressionsanalyse [Weiß 2013, S. 81 ff.].

Der Einfluss des *17-Trägerstatus und weiterer unabhängiger Variablen auf Blutungskomplikationen (abhängige Variable) wurde mit einem multivariaten, logistischen Regressionsmodell nachgewiesen. Mit dieser Art der Regressionsanalyse lassen sich anhand qualitativer Merkmale Wahrscheinlichkeiten für Zusammenhänge schätzen [Weiß

2013, S. 215 ff.]. Aus diesen Wahrscheinlichkeiten wurden Odd's Ratios berechnet (s. Tabelle 15).

Die einfaktorielle Varianzanalyse wird zum Vergleich mehrerer Gruppen mit normalverteilten Werten verwendet. Sie vergleicht die Varianz der Mittelwerte zwischen diesen Gruppen und die Varianz innerhalb jeder einzelnen Gruppe [Weiß 2013, S. 195]. Die Varianz beschreibt die Abweichung vom Mittelwert und ist definiert als das mittlere Quadrat der Abweichung vom Mittelwert. Die Summe aller Abstandsquadrate dividiert durch die Anzahl der Abstandsquadrate ergibt die Varianz der Stichprobe [Weiß 2013, S. 61].

2.6.2 Statistische Methoden für die Studie mit CYP2C19*2 und CYP2C19*17

Auch für diese Studie wurden folgende statistische Methoden verwendet, die bereits unter 2.6.1 erklärt wurden: χ^2 -Test, Kolmogorov-Smirnov Test, Kruskal-Wallis-Test, zweiseitiger Wilcoxon, Bootstrap-Analyse, Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, logistische Regressionsanalyse, einfaktorielle Varianzanalyse.

Die Clopidogrel-Response wurde als abhängige Variable gewertet. Neben dem Genotypen-Trägerstatus fanden als weitere, unabhängige Variablen Alter, Geschlecht, BMI [Sibbing D 2007] und CVRF Eingang in die Analysen.

In früheren Studien konnte ein signifikanter Einfluss folgender weiterer Faktoren auf die Clopidogrel-Response nachgewiesen werden:

- Therapie mit Omeprazol/Pantoprazol [Gilard et al. 2008, Sibbing et al. 2009c]
- Therapie mit Ca²⁺-Kanal-Hemmern [Siller-Matula et al. 2008]
- Therapie mit Phenprocoumon [Sibbing et al. 2010d])
- Niereninsuffizienz [Geisler et al. 2008a]
- Fibrinogenspiegel [Ang et al. 2008]

Diese und weitere Faktoren (Vgl. 3.2.4) wurden zusätzlich als unabhängige Variablen in einer multivariaten Regressionsanalyse berücksichtigt.

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse zu CYP2C19*17

3.1.1 Studienkollektiv, Genotypen- und Allelhäufigkeiten

Insgesamt wurden 1524 Patienten in diese Studie eingeschlossen. Es werden 3 Genotypengruppen miteinander verglichen: wt/wt, wt/*17 und *17/*17.

Tabelle 8: Genotypenhäufigkeiten im Studienkollektiv CYP2C19*17

Genotyp	wt/wt	wt/*17	*17/*17
Anzahl	902	546	76
Anteil	59%	36%	5%

Legende zu Tabelle 8: Es werden der absolute und relative Anteil der drei Genotypen am gesamten Studienkollektiv mit insgesamt 1524 Patienten gezeigt [Sibbing et al. 2010b].

Im untersuchten Studienkollektiv sind 622 Patienten (41% des Studienkollektivs) Träger von mindestens einem mutierten Allel. Es zeigten sich folgende Anteile der Allele: 77,1% für das wt-Allel und 22,9% für das mutierte *17-Allel. Damit entspricht das Kollektiv dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ($p=0,77$, Vgl. 2.6.1).

Die Tabelle 9 zeigt die Grundeigenschaften der einzelnen Genotypengruppen. Man erkennt, dass sich die Gruppen hinsichtlich dieser Eigenschaften sehr gleichen. Der mit statistischen Methoden ermittelte p-Wert (Vgl. Tabelle 9, letzte Spalte) ist bei allen untersuchten Merkmalen größer als 0,05. Dies zeigt, dass die Allelverteilung statistisch unabhängig von diesen Merkmalen ist.

Tabelle 9: Grundlegende Eigenschaften der Studienpopulation

Variable		CYP2C19 wt/wt	CYP2C19 wt/*17	CYP2C19 *17/*17	p
Alter	<i>Jahre</i>	67,5 ± 10,7	67,2 ± 10,4	67,4 ± 9,6	0,82
weibliches Geschlecht	<i>n (%)</i>	194 (21,5)	130 (23,8)	20 (26,3)	0,43
BMI	<i>kg/m²</i>	27,4 ± 4,4	27,7 ± 4,0	27,9 ± 5,1	0,21
EF	<i>%</i>	54,6 ± 11,3	54,9 ± 11,0	55,2 ± 10,1	0,98
Serumkreatinin	<i>mg/dl</i>	1,03 ± 0,5	1,02 ± 0,4	1,02 ± 0,6	0,39
Diabetes mellitus	<i>n (%)</i>	239 (26,5)	170 (31,1)	21 (27,6)	0,16
Raucher	<i>n (%)</i>	131 (14,5)	61 (11,2)	15 (19,7)	0,05
arterieller Hypertonus	<i>n (%)</i>	824 (91,4)	499 (91,4)	69 (90,8)	0,98
Hypercholesterinämie	<i>n (%)</i>	633 (70,2)	380 (69,6)	55 (72,4)	0,88
Familienanamnese positiv für KHK	<i>n (%)</i>	376 (41,7)	227 (41,6)	39 (51,3)	0,25
Z. n. MI	<i>n (%)</i>	286 (31,7)	179 (32,8)	21 (27,6)	0,65
Z. n. Bypass-Operation	<i>n (%)</i>	129 (14,3)	84 (15,4)	10 (13,2)	0,79
Mehrgefäßerkrankung	<i>n (%)</i>	766 (84,9)	464 (84,9)	62 (81,6)	0,72
NSTEMI/STEMI	<i>n (%)</i>	106 (11,8)	59 (10,8)	4 (5,3)	0,22
Thrombozytenzahl	<i>10³/μl</i>	217 ± 63	218 ± 65	219 ± 54	0,71
Clopidogrel Loading Intervall	<i>h</i>	3,5 (2,0-13,5)	3,5 (2,0-15,0)	5,3 (2,4-16,2)	0,14
Verwendung von Abciximab	<i>n (%)</i>	22 (2,4)	11 (2,0)	1 (1,3)	0,75
Medikation bei Aufnahme	<i>n (%)</i>				
Aspirin		680 (75,4)	418 (76,6)	57 (75,0)	0,87
Thienopyridine		391 (43,3)	229 (41,9)	24 (31,6)	0,13
β-Blocker		650 (72,1)	418 (76,6)	62 (81,6)	0,05
ACE-Hemmer		520 (57,6)	302 (55,3)	42 (55,3)	0,66
AT1-Hemmer		167 (18,5)	115 (21,1)	15 (19,7)	0,49
Coumarin-Derivate		99 (11,0)	59 (10,8)	6 (7,9)	0,71
Statine		620 (68,7)	391 (71,6)	51 (67,1)	0,45
PPI		170 (18,9)	96 (17,6)	10 (13,2)	0,43

Legende zu Tabelle 9: Die Eigenschaften der Studienteilnehmer werden entsprechend des jeweiligen Genotyps dargestellt. Die Daten werden wenn möglich als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. Clopidogrel Loading Intervall entspricht der Zeit vom Loading mit Clopidogrel bis zur Thrombozytenfunktionstestung und wird als Median (IQR) angegeben [Sibbing et al. 2010b, Tabelle 1].

3.1.2 Vergleiche der Thrombozytenaggregation zwischen den verschiedenen Genotypengruppen

Der Median der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation in der gesamten Studienpopulation beträgt 226 AU*min (IQR 141-364AU*min). Vergleicht man jedoch die drei o. g. Genotypengruppen untereinander (Vgl. Abbildung 12 und Tabelle 10), so zeigt sich ein signifikanter Unterschied bezüglich der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation ($p=0,007$).

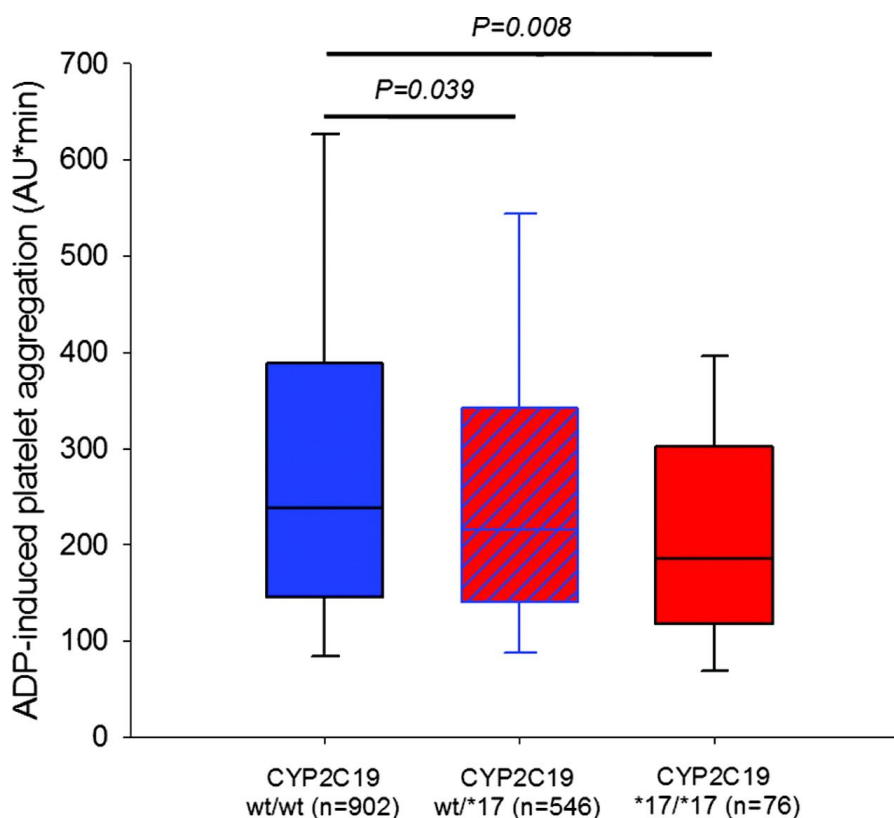


Abbildung 12: ADP-induzierte Thrombozytenaggregation in Bezug zu den CYP2C19-Genotypen. Die Abbildung zeigt die Werte der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation aufgeteilt in die drei untersuchten Genotypengruppen [Sibbing et al. 2010b, Fig. 1].

Tabelle 10: ADP-induzierte Aggregationswerte nach *17-Genotypengruppen

Genotyp	Median (AU*min)	IQR (AU*min)
wt/wt	238	146-388
wt/*17	215	140-342
*17/*17	186	119-301

Legende zu Tabelle 10: Aufgeteilt nach den drei Genotypengruppen werden hier die Mediane der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation mit der zugehörigen IQR aufgelistet. Diese entsprechen der graphischen Darstellung in Abbildung 12 [Sibbing et al. 2010b].

Wie die Abbildung 12 zeigt, wurden die niedrigsten Werte für die ADP-induzierte Aggregation in der Gruppe der Patienten mit homozygoter Mutation (*17/*17) gemessen (Vergleich mittels Kruskal-Wallis-Test, $p=0,007$).

Vergleicht man die Gruppe der Träger von mindestens einem mutierten Allel (wt/*17 und *17/*17, 622 Patienten) mit der Gruppe der homozygoten Wildtypen (wt/wt, 902 Patienten), so zeigt sich auch hier, dass die ADP-induzierte Aggregation der ersten Gruppe (wt/*17 und *17/*17) signifikant niedriger ist als die der Wildtyp-Gruppe (Werte s. Tabelle 11, Vergleich mittels unpaarigem, zweiseitigem Wilcoxon-Test, $P=0,009$).

Tabelle 11: ADP-induzierte Thrombozytenaggregation bei Trägern von mindestens einem mutierten Allel im Vergleich zum homozygoten Wildtyp-Status

Genotyp	Median (AU*min)	IQR (AU*min)
wt/wt	238	146-388
wt/*17 und *17/*17	213	136-329

Legende zu Tabelle 11: Die Tabelle zeigt die Mediane der ADP-induzierten Aggregation mit der jeweiligen IQR aufgeteilt nach dem Vorhandensein mindestens eines *17-Allels bzw. dem homozygoten Wildtypen [Sibbing et al. 2010b].

Somit ergibt sich aus Tabelle 11 als Differenz (Δ AU*min) zwischen diesen zwei Gruppen ein Wert von 25 AU*min. Zur Kontrolle erfolgte eine Bootstrap-Analyse, welche eine mittlere Differenz von 24 AU*min (95% CI 12-36) ergibt und somit das o. g. Ergebnis bestätigt.

3.1.3 Blutungsereignisse als primärer Sicherheitsendpunkt

Als primärer Sicherheitsendpunkt wurde das Eintreten einer TIMI-Blutung (Vgl. 2.5.3) innerhalb von 30 Tagen definiert. Dieser Endpunkt trat bei 51 Patienten (3,3%) der Studienpopulation ein. Von diesen erlitten 12 Patienten (0,8%) eine große und 39 Patienten (2,5%) eine kleine TIMI-Blutung. 45 dieser Ereignisse (88%) ereigneten sich postinterventionell während der ersten 24 Stunden.

3.1.4 Blutungsereignisse und Genotypengruppe

Die Abbildung 13 zeigt das Auftreten von Blutungskomplikationen (TIMI-Blutungen) in Bezug auf die Genotypengruppen innerhalb von 30 Tagen nach einer Koronarintervention. 55% dieser Blutungen traten bei Trägern von mindestens einem *17-Allel auf.

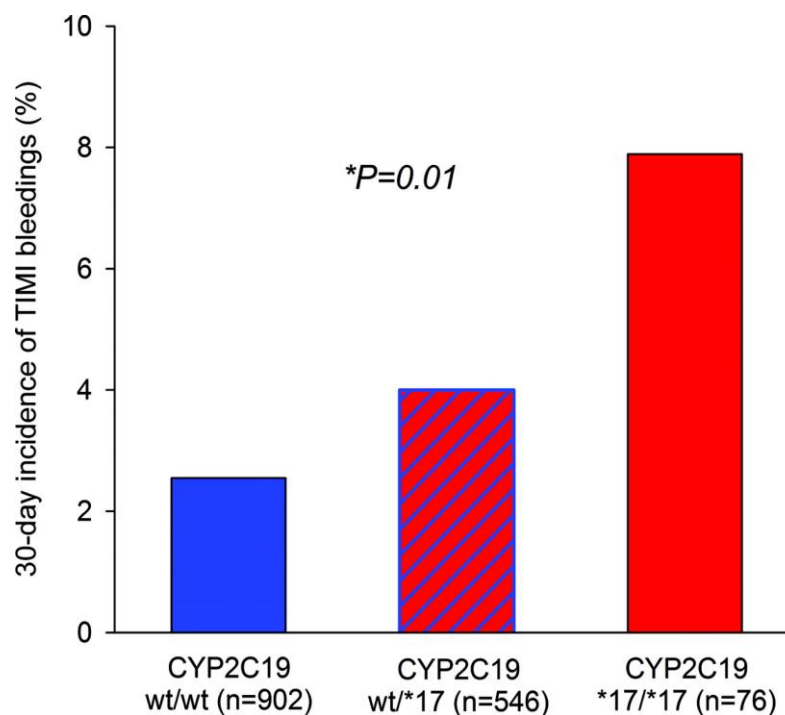


Abbildung 13: 30-Tage-Inzidenz von TIMI-Blutungen in Bezug auf den CYP2C19-Genotypen
Statistisch signifikant am höchsten ist das Blutungsrisiko für Patienten mit 2 mutierten Allelen (*17/*17) im Vergleich zu wt/wt: OR 3,27, 95% CI 1,33-8,10; p=0,01 [Sibbing et al. 2010b, Fig. 2].

Die Tabelle 12 zeigt diese Inzidenzen aufgeschlüsselt nach großen und kleinen Blutungskomplikationen.

Tabelle 12: Inzidenzen von TIMI-Blutungen in Bezug auf den Genotypen

Genotyp	Inzidenz der TIMI-Blutungen	
	groß	klein
wt/wt	5 (0,6%)	18 (2,0%)
wt/*17	6 (1,1%)	16 (2,9%)
*17/*17	1 (1,3%)	5 (6,6%)

Legende zu Tabelle 12: Die Tabelle zeigt die Inzidenzen von Blutungskomplikationen aufgeteilt nach den drei untersuchten Genotypengruppen von *17 [Sibbing et al. 2010b].

Bereits diese beiden Darstellungen (Abbildung 13 und Tabelle 12) zeigen anschaulich, dass Träger eines *17-Allels ein höheres Blutungsrisiko aufweisen. Dies wurde statistisch noch genauer überprüft (s. Tabelle 13).

Tabelle 13: Statistischer Zusammenhang zwischen *17 und einem Blutungsrisiko

	mit wt/wt verglichene Gruppe	OR	95%-CI	p-Wert (χ^2 -Test)
Große Blutungen	mind. ein *17-Allel	2,04	0,68-6,12	0,22
	*17/*17	2,39	0,95-2,10	
Kleine Blutungen	mind. ein *17-Allel	1,72	0,92-3,22	0,025
	*17/*17	3,46	1,30-9,27	

Legende zu Tabelle 13: Das Auftreten von großen und kleinen Blutungskomplikationen wird hier verglichen. Der Vergleich erfolgt jeweils zwischen der Gruppe wt/wt und den Trägern von mindestens einem *17-Allel bzw. zwischen den zwei homozygoten Gruppen wt/wt und *17/*17 [Sibbing et al. 2010b].

Unter den großen TIMI-Blutungen traten zwei tödliche intrakranielle Blutungen auf. Beide Patienten waren Träger des CYP2C19*17-Allels und wiesen eine ADP-induzierte Aggregation unterhalb des unteren Grenzwertes von 188 AU*min auf (s. Tabelle 14, Vgl. 2.5.2).

Tabelle 14: Aggregationswerte der zwei Patienten mit einer tödlichen Blutungskomplikation

Patient	Genotyp	Aggregation (AU*min)
1	wt/*17	168
2	*17/*17	152

Legende zu Tabelle 14: Bei zwei Patienten kam es zu tödlichen Blutungskomplikationen. Ihr Genotyp und der Wert der bei ihnen gemessenen ADP-induzierten Thrombozytenaggregation wird in dieser Tabelle dargestellt [Sibbing et al. 2010b].

Weiterhin konnte mittels einer logistischen Regressionsanalyse gezeigt werden, dass der Trägerstatus des *17-Allels ein unabhängiger und signifikanter Prädiktor ist für das Auftreten einer Blutungskomplikation innerhalb der ersten 30 postinterventionellen Tage. Die Tabelle 15 zeigt die entsprechenden Ergebnisse nicht nur für den CYP2C19-Trägerstatus, sondern auch für andere Variablen, die als mögliche Störgrößen in dieser Regressionsanalyse Eingang fanden. Von den untersuchten Variablen zeigen neben dem *17-Trägerstatus nur die Gabe von Abciximab und das Alter einen signifikanten Einfluss auf das Blutungsrisiko.

Tabelle 15: Ergebnisse der multivariaten, logistischen Regressionsanalyse für das kombinierte Risiko von großen und kleinen TIMI-Blutungen

Variable		OR (95% CI)	p-Wert
CYP2C19*17-Allel-Trägerstatus		1,85 (1,19-2,86)	0,006
Alter	je 10-Jahres-Inkrement	1,57 (1,13-2,17)	0,006
Geschlecht		1,31 (0,68-2,54)	0,42
BMI	je 5-kg/m ² -Inkrement	0,87 (0,61-1,25)	0,46
Serumkreatinin	je 0,1-mg/dl-Inkrement	0,97 (0,88-1,06)	0,49
PPI-Einsatz		1,21 (0,60-2,45)	0,59
Abciximab-Einsatz		5,12 (1,83-14,31)	0,002
Clopidogrel Loading Intervall	je 1h-Inkrement	1,00 (0,99-1,02)	0,70

Legende zu Tabelle 15: Hier werden die Ergebnisse einer multivariaten, logistischen Regressionsanalyse für das Blutungsrisiko gezeigt. Als unabhängige Variablen fanden die Werte der ersten Spalte Eingang in die Analyse. Für homozygote CYP2C19*17-Allelträger gegenüber Nicht-Trägern ergeben sich in einer entsprechend variierten Analyse folgende Werte: OR 3,41; 95% CI 1,42-8,17; p=0,006.

Das Clopidogrel Loading Intervall entspricht der Zeit vom Loading mit Clopidogrel (in Stunden) bis zur Thrombozytenfunktionstestung [Sibbing et al. 2010b, Tab. 3].

3.1.5 Ischämische Ereignisse als primärer Wirksamkeitsendpunkt

Stentthrombosen (eindeutige und wahrscheinliche) innerhalb von 30 Tagen nach Intervention wurden als primärer Wirksamkeitsendpunkt definiert. Dies trat bei 14 Patienten (3,3%) der Studienkohorte auf: 10 eindeutige STs und 4 wahrscheinliche STs gemäß den ARC-Kriterien (Vgl. 2.5.4). Die Tabelle 16 zeigt die Aufteilung der Ereignisse entsprechend der Genotypen.

Tabelle 16: Ischämieereignisse in den drei verschiedenen Genotypengruppen

Ereignis	Genotypen			Statistik		
	wt/wt	wt/*17	*17/*17	p	OR	95% CI
ST	8 (0,9%)	5 (0,9%)	1 (1,3%)	0,79	1,09	0,39-3,02
MI	29 (3,2%)	17 (3,1%)	4 (5,3%)	0,61	1,05	0,59-1,85
Tod	5 (0,6%)	2 (0,4%)	1 (1,3%)	0,84	0,87	0,23-3,31
kombiniert	34 (3,7%)	18 (3,2%)	4 (5,3%)	0,94	0,94	0,55-1,61

Legende zu Tabelle 16: Diese Tabelle zeigt Auswertung der Inzidenzen von ischämischen Ereignissen (einzeln und kombiniert). Als kombiniertes Ereignis galt das gleichzeitige Eintreten mehrerer ischämischer Ereignisse (Tod, Myokardinfarkt, notfallmäßig notwendige Koronarintervention). Die OR vergleicht in dieser Tabelle Träger von mindestens einem *17-Allel mit dem homozygoten Wildtyp. Für *17 konnte kein signifikanter Zusammenhang zu ischämischen Ereignissen gezeigt werden [Sibbing et al. 2010b].

Aus Tabelle 16 ist ersichtlich, dass es bei allen drei Arten der ischämischen Ereignisse sowie aus der Kombination mehrerer dieser Ereignisse im Rahmen dieser Studie keinen signifikanten Zusammenhang mit dem *17-Trägerstatus gibt.

3.2 Ergebnisse zu CYP2C19*2 und CYP2C19*17

3.2.1 Studienkollektiv

Grundcharakteristiken der Studienpopulation sind in der Tabelle 17 zusammengefasst. Wie die Tabelle zeigt, ähneln sich die drei untersuchten Genotypengruppen hinsichtlich der klinischen Variablen und der Komedikation.

Tabelle 17: Grundlegende Eigenschaften der Studienpopulation in Bezug auf den Genotypen CYP2C19*2

Variable		wt/wt (n=738)	wt/*2 (n=229)	*2/*2 (n=19)	p
Alter	<i>Jahre</i>	67,3 ± 10,3	67,6 ± 10,4	65,7 ± 8,5	0,73
Frauen	<i>n (%)</i>	161 (21,8)	57 (24,9)	7 (36,8)	0,21
BMI	<i>kg/m²</i>	27,0 (24,6-29,9)	27,1 (24,8-29,7)	26,4 (24,7-30,3)	0,99
Serumkreatinin	<i>mg/dl</i>	1,0 ± 0,4	1,0 ± 0,3	1,0 ± 0,5	0,84
Diabetes mellitus	<i>n (%)</i>	195 (26,4)	56 (24,4)	4 (21,1)	0,75
Raucher (aktiv)	<i>n (%)</i>	82 (11,1)	23 (10,0)	3 (15,8)	0,72
arterieller Hypertonus	<i>n (%)</i>	505 (68,4)	154 (67,3)	12 (63,2)	0,85
Hypercholesterinämie	<i>n (%)</i>	572 (77,5)	176 (76,9)	17 (89,5)	0,45
Mehrf Gefäßkrankung	<i>n (%)</i>	642 (86,9)	191 (83,4)	14 (73,7)	0,12
Z. n. Myokardinfarkt	<i>n (%)</i>	287 (38,9)	100 (43,7)	9 (47,4)	0,35
Z. n. Bypass-Operation	<i>n (%)</i>	120 (16,3)	45 (19,7)	3 (15,8)	0,49
Fibrinogen	<i>mg/dl</i>	403 ± 111	396 ± 111	439 ± 152	0,24
Komedikation	<i>n (%)</i>				
Aspirin		738 (100,0)	229 (100,0)	19 (100,0)	ND
β-Blocker		705 (95,5)	211 (92,1)	18 (94,7)	0,13
ACE-Hemmer		571 (77,4)	182 (79,5)	15 (79,0)	0,79
Statin		689 (93,4)	208 (90,8)	17 (89,5)	0,38
Omeprazol		48 (6,5)	14 (6,1)	0 (0,0)	0,51
Pantoprazol		120 (16,3)	36 (15,7)	5 (26,3)	0,48
Phenprocoumon		69 (9,4)	24 (10,5)	4 (21,1)	0,22
Ca ²⁺ -Kanal-Blocker		109 (14,8)	26 (11,4)	2 (10,5)	0,39

Legende zu Tabelle 17: Hier werden die Eigenschaften der Studienpopulation hinsichtlich ihres Genotypen gezeigt. Zusätzlich wird ein eventueller Zusammenhang zwischen Merkmal und Genotyp statistisch untersucht bzw. ausgeschlossen falls $p > 0,05$ [Sibbing et al. 2010a, Tab. 1].

Tabelle 18: Grundlegende Eigenschaften der Studienpopulation in Bezug auf den Genotypen CYP2C19*17

Variable		wt/wt (n=608)	wt/*17 (n=335)	*17/*17 (n=43)	p
Alter	<i>Jahre</i>	67,8 ± 10,5	67,0 ± 9,8	64,5 ± 10,0	0,09
Frauen	<i>n (%)</i>	138 (22,7)	79 (23,6)	8 (18,6)	0,76
BMI	<i>kg/m²</i>	27,0 (24,7-29,8)	27,1 (24,8-30,0)	28,4 (25,4-31,0)	0,28
Serumkreatinin	<i>mg/dl</i>	1,0 ± 0,3	1,0 ± 0,4	1,0 ± 0,4	0,63
Diabetes mellitus	<i>n (%)</i>	156 (25,7)	86 (25,7)	13 (30,2)	0,80
Raucher (aktiv)	<i>n (%)</i>	60 (9,9)	41 (12,2)	7 (16,3)	0,28
arterieller Hypertonus	<i>n (%)</i>	417 (68,6)	231 (69,0)	23 (53,5)	0,11
Hypercholesterinämie	<i>n (%)</i>	476 (78,3)	257 (76,7)	32 (74,4)	0,75
Mehrfäßkrankung	<i>n (%)</i>	526 (86,5)	285 (85,1)	36 (83,7)	0,76
Z. n. Myokardinfarkt	<i>n (%)</i>	254 (41,8)	126 (37,6)	16 (37,2)	0,42
Z. n. Bypass-Operation	<i>n (%)</i>	100 (16,5)	62 (18,5)	6 (14,0)	0,62
Fibrinogen	<i>mg/dl</i>	399 ± 107	410 ± 120	389 ± 121	0,22
Komedikation	<i>n (%)</i>				
Aspirin		608 (100,0)	335 (100,0)	43 (100,0)	ND
β-Blocker		573 (94,2)	319 (95,2)	42 (97,7)	0,55
ACE-Hemmer		484 (79,6)	250 (74,6)	34 (79,1)	0,21
Statin		559 (91,9)	314 (93,7)	41 (95,3)	0,47
Omeprazol		45 (7,4)	16 (4,8)	1 (2,3)	0,16
Pantoprazol		106 (17,4)	52 (15,5)	3 (7,0)	0,18
Phenprocoumon		55 (9,0)	41 (12,2)	1 (2,3)	0,07
Ca ²⁺ -Kanal-Blocker		81 (13,3)	49 (14,6)	7 (16,3)	0,77

Legende zu Tabelle 18: Diese Tabelle listet die Eigenschaften der Studienpopulation auf. Hier wird ein eventueller Zusammenhang zwischen Merkmal und Genotyp statistisch untersucht bzw. ausgeschlossen falls $p > 0,05$ [Sibbing et al. 2010a, Tab. 1].

3.2.2 Allelhäufigkeiten im Studienkollektiv

Trägerstatus CYP2C19*2 im Studienkollektiv

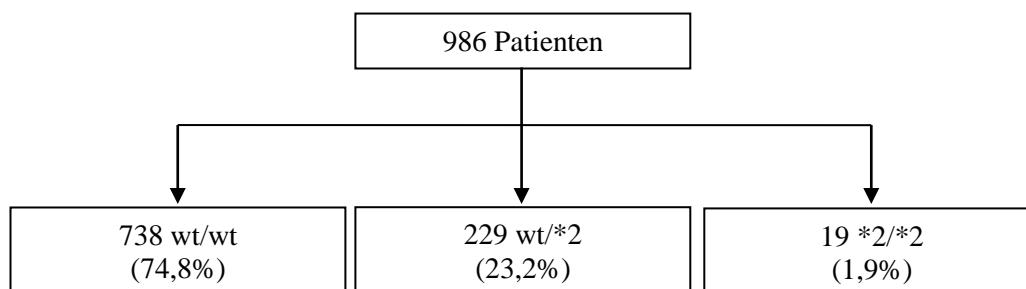


Abbildung 14: *2-Trägerstatus Studienkollektiv

Diese Abbildung zeigt den Anteil der jeweiligen Genotypen am Studienkollektiv mit insgesamt 986 Patienten hinsichtlich des *2-Allels [Sibbing et al. 2010a].

Träger von mindestens einem *2-Allel sind somit 248 Patienten (25%). Die Allelhäufigkeit beträgt 86,5% für das Wildtyp-Allel im Vergleich zu 13,5% für *2.

Trägerstatus CYP2C19*17 im Studienkollektiv

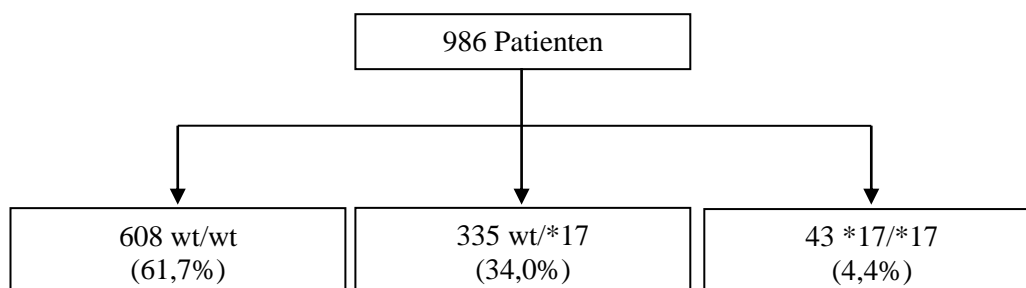


Abbildung 15: *17-Trägerstatus im Studienkollektiv

Diese Abbildung zeigt den Anteil der jeweiligen Genotypen am Studienkollektiv mit insgesamt 986 Patienten hinsichtlich des *17-Allels [Sibbing et al. 2010a].

378 Patienten (38,4%) sind Träger von mindestens einem *17-Allel. Die Allelhäufigkeit beträgt 78,7% für das Wildtyp-Allel im Vergleich zu 21,3% für *17.

Es wurden keine signifikanten Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht beobachtet ($p=0,08$ für *2; $p=0,71$ für *17).

3.2.3 Zusammenhang von CYP2C19*2 und ADP-induzierter

Thrombozytenaggregation

Für die Thrombozytenaggregation zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den drei Genotypgruppen ($p<0,001$). Der Median der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation in der Studienpopulation betrug 226 AU*min (IQR 146-401

AU*min). Die Werte der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation der einzelnen *2-Genotypen können der Tabelle 19 entnommen werden.

Tabelle 19: ADP-induzierte Thrombozytenaggregation in Bezug auf den *2-Trägerstatus

Genotyp	Median (AU*min)	IQR (AU*min)
wt/wt	212	141-351
wt/*2	305	162-482
*2/*2	475	387-575

Legende zu Tabelle 19: Hier werden die Mediane der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation je nach *2-Genotyp mit der jeweiligen IQR dargestellt [Sibbing et al. 2010a].

Es zeigt sich, dass Patienten mit dem Genotyp *2/*2 die höchsten Aggregationswerte hatten. Patienten mit heterozygotem Genotyp (wt/*2) wiesen ebenfalls signifikant höhere Aggregationswerte auf als der homozygote Wildtyp (s. Abbildung 16).

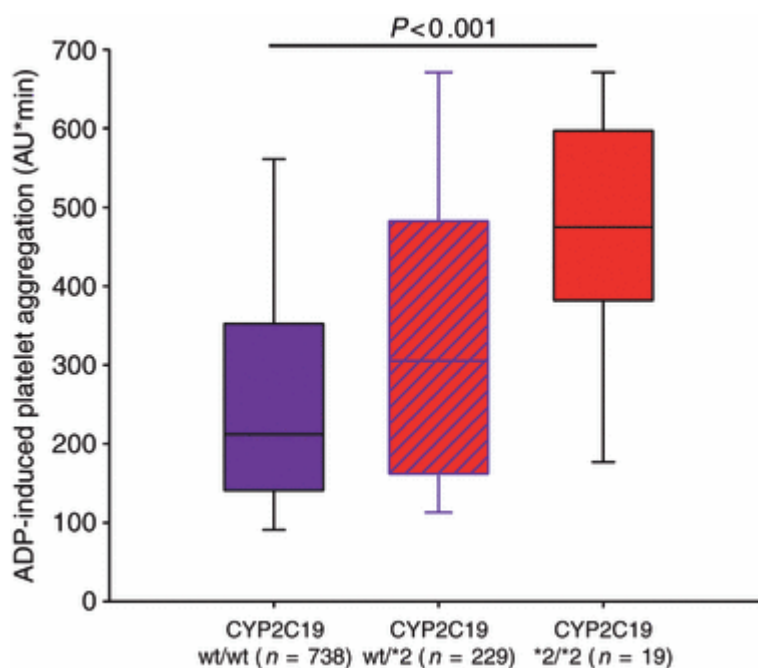


Abbildung 16: ADP-induzierte Thrombozytenaggregation (AU*min) in Bezug zu den CYP2C19*2-Genotypen (wt/wt, wt/*2, *2/*2)

Patienten mit *2/*2-Genotyp weisen einen statistisch signifikant höheren Aggregationswert im Vergleich zu Patienten mit wt/*2-Genotyp ($p=0,01$) oder zum homozygoten Wildtyp ($p=0,0001$) auf [Sibbing et al. 2010a, Fig. 1].

Mittels Bootstrap-Analyse konnte bestätigt werden, dass das Tragen von mindestens einem *2-Allel zu signifikant höheren Aggregationswerten führt (Werte s. Tabelle 20, $p<0,001$).

Tabelle 20: ADP-induzierte Aggregation bei Trägern von mindestens einem *2-Allel im Vergleich zum homozygoten Wildtyp

Genotyp	n	Median (AU*min)	IQR (AU*min)
wt/*2 und *2/*2	248	308	164-487
wt/wt	738	212	141-351

Legende zu Tabelle 20: Hier werden die Mediane und die zugehörige IQR der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation von Trägern von mindestens einem *2-Allel und Patienten mit homozygotem Wildtyp gezeigt [Sibbing et al. 2010a].

Die Abbildung 17A zeigt die Ergebnisse der o. g. Bootstrap-Analyse für die Differenz der Mediane der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation sowohl für *2-Träger (wt/*2 und *2/*2) im Vergleich zu Nicht-Trägern als auch für *2/*2-Patienten im Vergleich zu wt/wt-Patienten. Es zeigt sich, dass die Differenz der homozygoten Gruppen deutlich größer ist als die Differenz unter Einbezug der heterozygoten Genotypengruppe. Mittels χ^2 -Test konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Aggregation (AU*min) und dem *2-Genotyp gezeigt werden ($\chi^2=22,9$; CC=0,152, $p<0,001$).

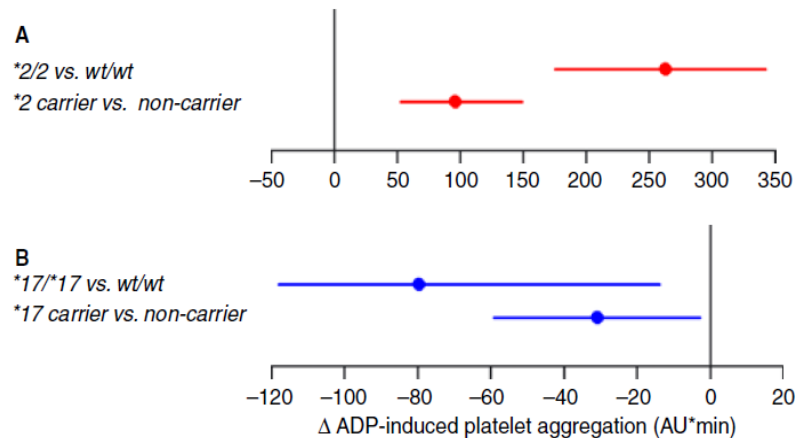


Abbildung 17: Bootstrap-Analyse für die CYP2C19*2-Genotypen (A) und für die CYP2C19*17-Genotypen (B)

Die Abbildung zeigt jeweils den Vergleich zwischen dem homozygoten Wildtyp und den Trägern von mindestens einem mutierten Allel (A für *2 und B für *17). Verglichen wurde mittels Bootstrap-Analyse jeweils die Differenz der Mediane der ADP-induzierten Aggregation. Der Punkt stellt den Median der Median-Differenzen dar. Als Linie dargestellt ist das entsprechende 95%-Konfidenzintervall [Sibbing et al. 2010a, Fig. 2].

Betrachtet man die Gruppe der Low-Responder (Thrombozytenaggregation > 468 AU*min) mit 188 Patienten (19,4%), so zeigt sich ein signifikant erhöhtes Risiko einer Low-Response für heterozygote Patienten (wt/*2, unangepasste OR 2,0; 95%

CI 1,5-2,8) und für die Träger zweier mutierter Allele (*2/*2, unangepasste OR 4,2; 95% CI 2,3-7,5) im Vergleich zu Nicht-Trägern von CYP2C19*2.

Die Tabelle 21 zeigt den Anteil der Low-Responder an der jeweiligen Genotypengruppe.

Tabelle 21: Prozentualer Anteil der Low-Responder an den Genotypengruppen (χ^2 , $p < 0,001$)

Genotyp	wt/wt	wt/*2	*2/*2
Low-Responder	16%	26%	53%

Legende zu Tabelle 21: Diese Tabelle zeigt den prozentualen Anteil der Low-Responder an den jeweiligen *2-Genotypengruppen. Der größte Anteil wurde in der *2/*2-Gruppe beobachtet [Sibbing et al. 2010a].

Durch eine multivariate, logistische Regressionsanalyse konnte bestätigt werden, dass der Trägerstatus des *2-Allels ein unabhängiger Prädiktor für eine Low-Response auf Clopidogrel ist (Vgl. die großen OR-Werte in Tabelle 22). Als weitere unabhängige Variable wurden mögliche Störgrößen berücksichtigt (z. B. Alter, Geschlecht, CVRF, Komedikation mit Einfluss auf die Response). Entsprechend dieser Störgrößen wurde die OR angepasst.

Tabelle 22: *2-Trägerstatus als Prädiktor einer Low-Response

Genotyp	angepasste OR	95% CI
wt/*2	2,2	1,6-3,0
*2/*2	4,8	2,5-9,1

Legende zu Tabelle 22: Diese Tabelle zeigt das relative Risiko einer Low-Response abhängig vom *2-Trägerstatus. Verglichen wird jeweils der Genotyp wt/*2 bzw. *2/*2 mit dem homozygoten Wildtyp wt/wt. Aufgeführt ist die jeweilige angepasste OR mit dem zugehörigen CI. Die Anpassung der OR erfolgte entsprechend der möglichen Störgrößen, z. B. Alter, Geschlecht, CVRF, Komedikation [Sibbing et al. 2010a].

Dabei haben sich als weitere unabhängige Prädiktoren für eine Low-Response gezeigt:

- Diabetes mellitus
- hoher BMI
- weibliches Geschlecht
- hoher Serum-Creatininspiegel
- hoher Fibrinogen-Wert
- Komedikation mit Omeprazol oder Phenprocoumon

3.2.4 Zusammenhang von CYP2C19*17 und ADP-induzierter Thrombozytenaggregation

Auch für CYP2C19*17 zeigen sich für die drei Genotypengruppen signifikante Unterschiede bezüglich der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation ($p=0,007$). Die Werte der Aggregation aufgeteilt nach Genotypengruppen können der Tabelle 23 entnommen werden.

Tabelle 23: ADP-induzierte Aggregation entsprechend der Genotypengruppen von CYP2C19*17

Genotyp	Median (AU*min)	IQR (AU*min)
wt/wt	243	151-416
wt/*17	217	141-375
*17/*17	164	120-273

Legende zu Tabelle 23: Diese Tabelle zeigt die Mediane der ADP-induzierte Thrombozytenaggregation sowie deren IQR aufgeteilt nach den untersuchten *17-Genotypengruppen [Sibbing et al. 2010a].

Die Abbildung 18 zeigt die Aggregationswerte entsprechend der drei untersuchten Genotypen (wt/wt, wt/*17 und *17/*17). Statistisch signifikant niedrigere Werte zeigen sich für Patienten mit 2 mutierten Allelen (*17/*17) nicht nur gegenüber dem homozygoten Wildtyp (wt/wt, $p=0,007$) sondern auch gegenüber dem heterozygoten Genotyp (wt/*17, $p=0,06$).

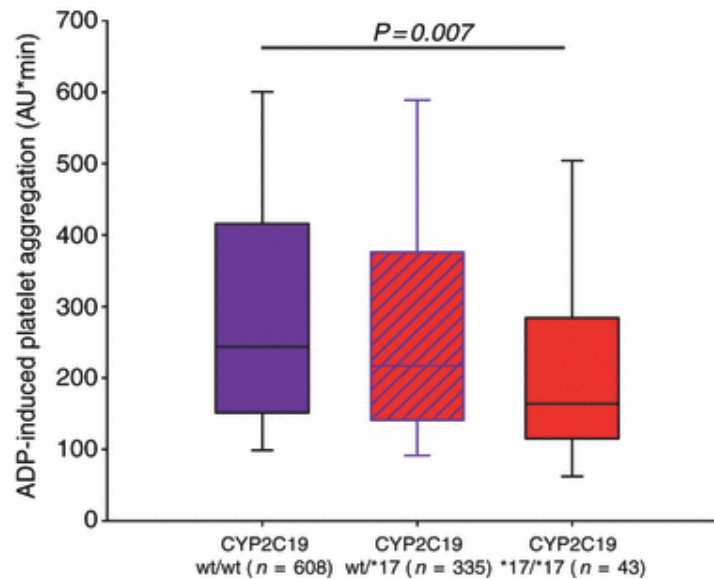


Abbildung 18: ADP-induzierte Thrombozytenaggregation (AU*min) in Bezug auf die CYP2C19*17-Genotypen (wt/wt, wt/*17, *17/*17)

Die niedrigsten Aggregationswerte weisen Patienten mit dem Genotypen *17/*17 auf. Der homozygote Wildtyp zeigt die höchsten Aggregationswerte [Sibbing et al. 2010a, Fig. 3].

Vergleicht man Träger von mindestens einem *17-Allel (n=378, wt/*17 oder *17/*17) mit dem homozygoten Wildtyp (n=608, wt/wt, Vgl. Tabelle 24), so zeigen sich signifikant niedrigere Thrombozytenaggregationswerte für Träger von mindestens einem *17-Allel (p=0,01).

Tabelle 24: ADP-induzierte Thrombozytenaggregation bei Trägern von mindestens einem *17-Allel im Vergleich zum homozygoten Wildtyp

Genotyp	Median (AU*min)	IQR (AU*min)
wt/*17 und *17/*17	212	134-371
wt/wt	243	151-416

Legende zu Tabelle 24: Der Median der ADP-induzierten Aggregation bei Trägern von mindestens einem *17-Allel ist niedriger als bei Wildtypen. Die zugehörigen IQRs werden ebenfalls angegeben [Sibbing et al. 2010a].

Mittels Bootstrap-Analyse wurden die Differenzen der Mediane der ADP-induzierten Aggregation sowohl für Träger von *17 im Vergleich zu Nicht-Trägern als auch für *17/*17-Patienten im Vergleich zu wt/wt-Patienten berechnet. Hierbei bestätigt sich, dass die Differenz zwischen den zwei homozygoten Genotypen größer ist, als zwischen Trägern von *17 und Nicht-Trägern von *17. Die Abbildung 17B stellt dies bildlich dar.

Anhand des χ^2 -Tests konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation (AU*min) und dem *17-Genotypen ($\chi^2=6,75$; CC=0,082; $p=0,009$) festgestellt werden.

Als High-Responder galten 396 Patienten (40% des Studienkollektivs), da die bei ihnen gemessene ADP-induzierte Thrombozytenaggregation unterhalb des Cut-off-Wertes von 188 AU*min lag. Die Wahrscheinlichkeit einer High-Response war signifikant erhöht für Träger von mindestens einem *17-Allel (Vgl. Tabelle 25).

Tabelle 25: Wahrscheinlichkeit einer High-Response für Clopidogrel abhängig vom *17-Trägerstatus

Genotyp	unangepasste OR	95% CI
wt/*17	1,3	1,1-1,6
*17/*17	1,7	1,1-2,7

Legende zu Tabelle 25: Hier wird das relative Risiko (OR) einer High-Response entsprechend des *17-Trägerstatus im Vergleich zum homozygoten Wild (wt/wt) gezeigt [Sibbing et al. 2010a].

Die Anteile der High-Responder an den Genotypgruppen zeigt Tabelle 26.

Tabelle 26: Prozentualer Anteil der High-Responder in den Genotypengruppen. ($p=0,01$; χ^2)

Genotyp	wt/wt	wt/*17	*17/*17
High-Responder	38%	42%	61%

Legende zu Tabelle 26: Der prozentuale Anteil der High-Responder an den untersuchten Genotypengruppen wird hier dargestellt [Sibbing et al. 2010a].

Anhand einer multivariaten, logistischen Regressionsanalyse konnte gezeigt werden, dass der *17-Trägerstatus ein unabhängiger Prädiktor einer Clopidogrel-High-Response ist. Als abhängige Variable galt die erhöhte Response auf Clopidogrel. Mögliche Störgrößen (z. B. Alter, Geschlecht, CVRF, Komedikation mit Einfluss auf die Response) fanden als unabhängige Variablen Eingang in die Berechnungen.

Tabelle 27: Abhängigkeit einer erhöhten Clopidogrel- Response vom *17-Trägerstatus

Genotyp	angepasste OR	95% CI
wt/*17	1,4	1,1-1,7
*17/*17	1,9	1,2-3,0

Legende zu Tabelle 27: Diese Tabelle zeigt das relative Risiko (OR) einer High-Response in Abhängigkeit vom *17-Trägerstatus. Verglichen wurde jeweils mit dem Wildtyp wt/wt unter Berücksichtigung und im Vergleich zu Tabelle 25 wurden mögliche Störgrößen berücksichtigt [Sibbing et al. 2010a].

Ein weiteres Ergebnis dieser Analyse waren weitere unabhängige Prädiktoren ($p < 0,05$) einer erhöhten Response:

- niedriger BMI
- niedrige Fibrinogen-Werte
- Nichtraucher
- männliches Geschlecht
- keine Komedikation mit Omeprazol oder Phenprocoumon

3.2.5 Interaktion von CYP2C19*2 und CYP2C19*17

Um die Interaktion von *2- und *17-Genotypen zu beurteilen, werden vier Gruppen entsprechend der Allelkombinationen betrachtet. Die Abbildung 19 zeigt die Aggregationswerte dieser vier Gruppen, die Legende zeigt die Gruppeneinteilung.

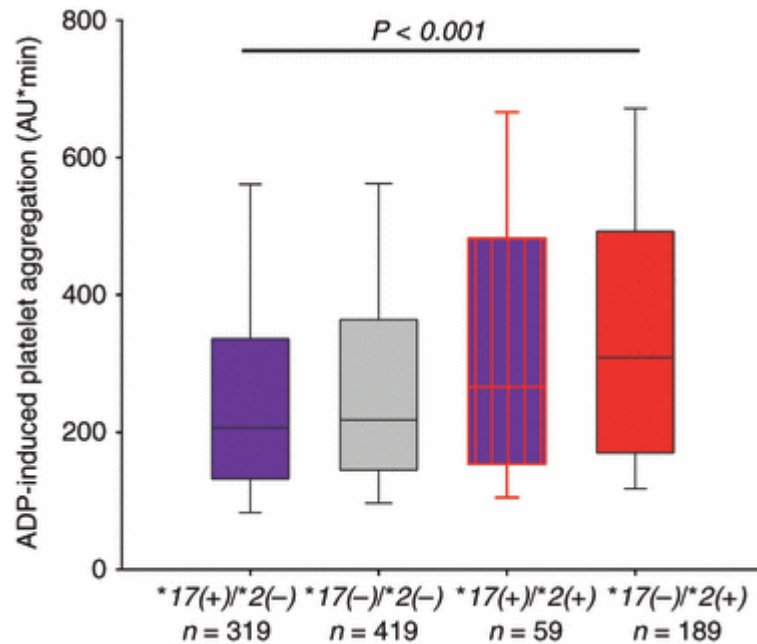


Abbildung 19: ADP-induzierte Thrombozytenaggregation (AU*min) in Bezug auf die CYP2C19*2/CYP2C19*17-Genotypengruppen

Gruppe 1: Patienten mit mind. einem *17-Allel und keinem *2-Allel.

Gruppe 2: Patienten mit weder *17-Allel noch *2-Allel.

Gruppe 3: Patienten mit mind. einem *17-Allel und mind. einem *2-Allel.

Gruppe 4: Patienten mit keinem *17-Allel und mind. einem *2-Allel [Sibbing et al. 2010a, Fig. 4].

Die höchsten Werte ADP-induzierter Thrombozytenaggregation wiesen Patienten der Gruppe 4 auf (309 AU*min, IQR 172-490 AU*min). Patienten der Gruppe 1 zeigten dagegen die niedrigsten Werte (207 AU*min, IQR 132-332 AU*min, $p < 0,001$). Die Differenz der Mediane zwischen diesen beiden Gruppen beträgt 102 AU*min. Durch eine lineare Regressionsanalyse konnte gezeigt werden, dass der kombinierte *2/*17-Trägerstatus (kodierte mit den Gruppennummern 1 bis 4) eine unabhängige Variable für den Median der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation ist (β -Koeffizient=33,4; Standard Fehler = 6,1; $p < 0,001$).

Allerdings ist die Streubreite der ADP-Messwerte allgemein sehr groß (s. Abstand der Whiskers der Boxplots in Abbildung 19).

3.2.6 CYP2C19*2 und der Einfluss von Omeprazol

Vom gesamten Studienkollektiv nahmen 62 Patienten (6,3%) Omeprazol als Komedikation ein. Von diesen Patienten sind 14 Träger von *2 und 48 sind wt/wt-Patienten. Wie die Abbildung 20 zeigt, war die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation höher unter Therapie mit Omeprazol sowohl bei *2-Trägern (Abbildung 20A) als auch bei Patienten mit Wildtyp (Abbildung 20B).

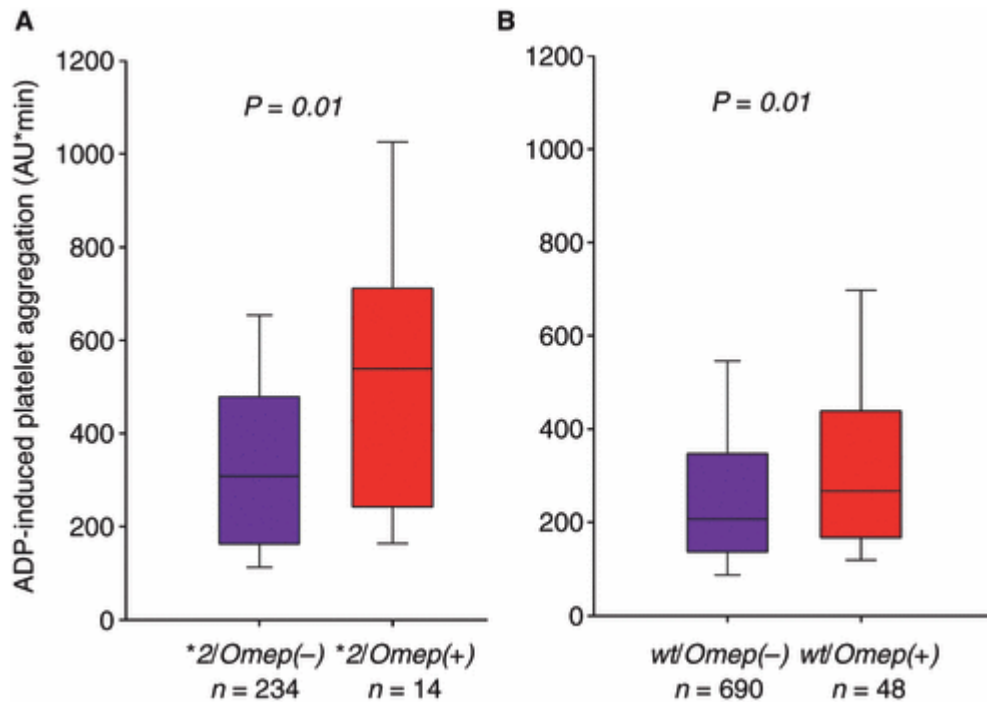


Abbildung 20: ADP-induzierte Thrombozytenaggregation (AU*min) in Bezug auf CYP2C19*2 bei Patienten mit und ohne Komedikation mit Omeprazol

Sowohl bei *2-Trägern (A) als auch bei Patienten mit Wildtyp (B) zeigen sich höhere Thrombozytenaggregationswerte unter Komedikation mit Omeprazol im Vergleich zu Patienten ohne Omeprazol-Therapie [Sibbing et al. 2010a, Fig. 5].

4. Diskussion

Die Entwicklung im Bereich der Pharmakogenetik und des Next-Generation Sequencing (NGS) schreitet stark voran. So ist z. B. mit der Weiterentwicklung zur 3. Generation (Nanopore Sequencing) eine Sequenzierung der DNA in Echtzeit möglich [Mardis 2008, Shi 2001, van Dijk et al. 2014]. Damit scheint eine „personalisierte Medizin“ immer näher zu rücken. Ziel dieser ist es auf die metabolischen Besonderheiten jedes Einzelnen eingehen zu können und dementsprechend z. B. die Dosierung von Medikamenten anzupassen. Hierzu ist es allerdings notwendig die genaue Zuordnung von Gen und Wirkung im Organismus zu kennen.

4.1 Einfluss von CYP2C19*17 auf die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation

CYP2C19*17 ist definiert als die Mutation an Position 806 (-806C>T) des CYP2C19-Gens. Diese Mutation führt zu einer erhöhten Transkriptionsaktivität [Sim et al. 2006] und damit zu einem gesteigertem Metabolismus der CYP2C19-Substrate [Ohlsson Rosenborg et al. 2008, Sim et al. 2006, Wang et al. 2009, Weiss et al. 2009].

Bisherige Forschungsarbeiten [Heestermans AACM 2006, Sibbing et al. 2008b, Taubert et al. 2004] haben gezeigt, dass hohe Spiegel des aktiven Thiol-Metaboliten von Clopidogrel zu niedrigen Thrombozytenaggregationswerten führen. Diese sind wiederum wahrscheinlich ursächlich für ein erhöhtes postinterventionelles Blutungsrisiko.

Die Forschungsdaten, die den Einfluss von CYP2C19*17 auf den Clopidogrelmetabolismus nachweisen, sind bislang noch nicht ausreichend. Bisher konnten Tendenzen zu erniedrigten Aggregationswerten in Abhängigkeit des *17-Trägerstatus gezeigt werden [Geisler et al. 2008b]. Aufgrund des relativ kleinen Studienkollektivs war allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypengruppen nachweisbar (OR 0,62; 95% CI 0,34-1,14; p=0,14).

Unsere Studie befasst sich deshalb mit einem größeren Patientenkollektiv und zeigt eine signifikant erhöhte Bildung des aktiven Thiol-Metaboliten bei CYP2C19*17-Trägern [Sibbing et al. 2010b].

Anhand dieser Studie [Sibbing et al. 2010b] konnte auch gezeigt werden, dass es einen ausgeprägten Gen-Dosis-Effekt für CYP2C19*17 gibt: Patienten mit dem Genotypen *17/*17 zeigten ein deutlich gesteigertes Ansprechen auf Clopidogrel, resultierend in den statistisch signifikant niedrigsten Aggregationswerten aller drei Genotypengruppen (Vgl. Abbildung 12). Diese Patientengruppe trägt außerdem das höchste Risiko für Blutungskomplikationen im Vergleich zu den anderen zwei Gruppen (wt/wt und wt/*17, Vgl. Abbildung 13). Mehr als die Hälfte der Blutungskomplikationen traten bei Trägern von mindestens einem mutierten Allel auf. Es zeigt sich eine deutliche Zunahme des Blutungsrisikos mit Zunahme der Anzahl der mutierten *17-Allele mit dem höchsten Risiko für den homozygoten Genotypen (*17/*17). Auch nach Anpassung der Analysen, d. h. unter Berücksichtigung anderer Risikofaktoren (Vgl. Tabelle 15) für eine postinterventionelle Blutungskomplikation, bleibt der Einfluss des *17-Allels hierfür statistisch signifikant bestehen.

Vorherige Studien [Simon et al. 2009] konnten bisher keinen Einfluss von CYP2C19*17 auf ischämische Ereignisse (nichttödlicher Apoplex oder Myokardinfarkt) nachweisen. Auch in unserer Studie zeigt sich kein signifikanter Zusammenhang für den *17-Trägerstatus und das Eintreten einer ST. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine vergleichsweise niedrige Inzidenz für ST (14 im Studienkollektiv) im Vergleich zu 51 Blutungen. Eine weitere mögliche Erklärung für einen fehlenden Zusammenhang zwischen ST und dem *17-Trägerstatus ist, dass *17 zwar die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation deutlich verringert. Die Reduktion des Aggregationswertes führt jedoch nicht immer zu einem Wert unterhalb des cut-off-Wertes für eine ST (Vgl. 2.5.2). Somit kann aktuell nicht von einer protektiven Wirkung des *17-Allels gegenüber ST ausgegangen werden.

4.2 Einfluss von CYP2C19*17 und CYP2C19*2 auf die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation

Für die meisten Studien, die sich mit dem Clopidogrelmetabolismus befassen, wird die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation kurz nach dem Loading mit Clopidogrel gemessen. Im Gegensatz dazu wurden in unserer zweiten Studie ausschließlich Patienten eingeschlossen, die nach einer Koronarintervention unter einer dauerhaften Therapie mit Clopidogrel standen. Hierdurch wird ein Einfluss der Zeitspanne zwischen Loading und Thrombozytenfunktionsmessung auf die Ergebnisse ausgeschlossen.

4.2.1 Zusammenhang von CYP2C19*2 und Low-Response

CYP2C19*2 ist eine bereits in vielen vorausgegangenen Studien sowohl hinsichtlich der Thrombozytenfunktion [Geisler et al. 2008b, Giusti B 2007, Mega et al. 2009, Shuldiner et al. 2009] als auch hinsichtlich des klinischen Outcomes [Collet et al. 2009, Mega et al. 2009, Shuldiner et al. 2009, Sibbing et al. 2009a, Simon et al. 2009] untersuchte Mutation. Auch hier gibt es Widersprüche in Bezug auf einen Gen-Dosis-Effekt von *2, d.h. einige Studien weisen darauf hin, dass homozygote Träger von *2 signifikant erhöhte Aggregationswerte und hierdurch bedingt ein schlechteres klinisches Outcome haben als heterozygote *2-Träger [Giusti B 2007]. Andere Studien hingegen finden keinen signifikanten Unterschied in der Clopidogrel-Response zwischen heterozygoten und homozygoten Trägern des mutierten Allels [Geisler et al. 2008b, Shuldiner et al. 2009].

Unsere Ergebnisse [Sibbing et al. 2010a] zeigen jedoch ebenfalls einen starken Gen-Dosis-Effekt für *2-Träger, abhängig von der Anzahl der mutierten Allele: die Aggregationswerte für homozygote *2-Träger (475 AU*min) waren mehr als doppelt so hoch als bei homozygoten Wildtypen (212 AU*min). Außerdem lag der Aggregationswert fast aller *2/*2-Patienten oberhalb oder nahe am cut-off-Wert für eine Low-Response (468 AU*min, Vgl. 2.5.2). Mehr als ein Viertel der heterozygoten *2-Träger und mehr als die Hälfte der *2/*2-Genotypen sind Low-Responder.

Auch frühere Studien zeigen diesen Zusammenhang: Im Rahmen einer Koronarintervention wurden 2485 Patienten untersucht. Das höchste ST-Risiko wurde in die-

sem Kollektiv bei homozygoten Patienten (*2/*2) beobachtet [Sibbing et al. 2009d]. Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch eine große Metaanalyse mit mehr als 9000 Patienten [Mega et al. 2010].

4.2.2 Zusammenhang von CYP2C19*17 und High-Response

Eine andere untersuchte Mutation ist CYP2C19*17: Die bisherige Studienlage ist widersprüchlich in Bezug auf den Einfluss auf die Clopidogrel-Response.

Die Gruppe um Shuldiner konnte in einem Kollektiv von 268 Patienten und Thrombozytenfunktionsmessungen mittels LTA keinen signifikanten Einfluss ($p=0,83$) von CYP2C19*17 auf die Thrombozytenaggregationswerte feststellen [Shuldiner et al. 2009].

Wie bereits unter 4.1 beschrieben, konnten hingegen Geisler et al. einen Trend zu erniedrigten Aggregationswerten bei *17-Trägern zeigen. Die Messung erfolgte mittels LTA, eine statistische Signifikanz konnte leider nicht erreicht werden ($p=0,14$) [Geisler et al. 2008b].

In einer späteren Studie wurden Messungen nach dem Loading mit 600 mg Clopidogrel zum Vergleich sowohl mittels LTA als auch mittels P2Y₁₂-spezifischen VASP Assay durchgeführt [Frere et al. 2009]. Hierbei zeigte sich ein signifikanter Einfluss von *17 nur unter Berücksichtigung der VASP-Messungen ($p=0,007$). Die Auswertung der LTA-Messungen alleine ergab – ohne ersichtliche Erklärung - keinen statistisch signifikanten Einfluss ($p=0,21$). Im Rahmen unserer ersten Studie (1534 Patienten, Messung mittels MEA nach Loading mit 600 mg Clopidogrel im Rahmen einer Koronarintervention) konnten wir jedoch einen signifikanten Einfluss von *17 auf die Clopidogrel-Response nachweisen [Sibbing et al. 2010b]. Auch hier konnte ein deutlicher Gen-Dosis-Effekt beobachtet werden: die niedrigsten Aggregationswerte zeigten sich bei homozygoten *17-Trägern. Anhand unserer Daten zeigte sich, dass mehr als 40% der heterozygoten *17-Träger und mehr als 60% der homozygoten *17-Träger High-Responder sind.

4.2.3 Interaktion von CYP2C19*2 und CYP2C19*17

CYP2C19*2 und *17 sind häufige Varianten innerhalb des CYP2C19-Gens. Dennoch ist bisher eine Interaktion dieser beiden Mutationen nicht untersucht worden

und ist somit ein neuer Aspekt. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die steigernde Wirkung von *2 auf die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation teilweise durch die Gegenwart von *17 reduziert wird. Insgesamt ist aber der Einfluss von *2 auf die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation viel größer als die Wirkung von *17. Dies ist auch an den ansteigenden Aggregationswerten (Abbildung 19) zwischen den Genotypengruppen zu sehen: von (+)*17/(-)*2-Patienten mit den niedrigsten Aggregationswerten bis hin zu (-)*17/(+)*2-Patienten mit den höchsten Aggregationswerten. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Mutation *2 einen vollständigen Verlust der Enzymfunktion bedeutet, wohingegen CYP2C19*17 nur eine bereits bestehende Enzymkapazität erhöht [Sim et al. 2006].

4.3 Einfluss von Omeprazol auf den CYP2C19-Metabolismus

Die Messungen hierfür erfolgten mittels MEA. Etabliert wurde diese Methode bereits in früheren Studien sowohl für ischämische Ereignisse (einschließlich ST) [Sibbing et al. 2009a, Siller-Matula et al. 2010] als auch für Blutungsereignisse nach PCI [Sibbing et al. 2010c]. Nachdem bei dieser Methode der zeitliche Aufwand deutlich geringer ist, konnte somit ein größeres Studienkollektiv untersucht werden als in den bisherigen Studien.

Obwohl aktuell von einem negativen Einfluss auf die Clopidogrel-Response ausgegangen wird [Gilard et al. 2008, Sibbing et al. 2009c], wird über die klinische Relevanz weiterhin diskutiert [Sibbing et al. 2009b].

Die erste Studie, die über einen signifikanten negativen Einfluss von Omeprazol auf den Clopidogrelmetabolismus berichtet, war die OCLA-Studie (Omeprazol Clopidogrel Aspirin Studie) [Gilard et al. 2008]. Anhand dieser Daten war jedoch keine eindeutige Aussage möglich, ob dieser negative Einfluss von Omeprazol abhängig ist von einem gleichzeitig existierendem *2-Allel [Gurbel et al. 2008].

Mit unseren Ergebnissen konnten wir jedoch zeigen, dass Omeprazol einen relevanten Einfluss auf die Clopidogrel-Response hat, unabhängig vom *2-Trägerstatus: Sowohl bei *2-Trägern als auch beim homozygoten Wildtypen (wt/wt) waren die Aggregationswerte höher unter Therapie mit Omeprazol (Vgl. Abbildung 20).

4.4 Nutzen einer Genotypisierung

Im klinischen Alltag kommt es immer wieder zu Ereignissen oder Komplikationen, die das Outcome eines Patienten verschlechtern. Im Rahmen von klinischen Studien versucht man deshalb Ursachen für diese Ereignisse zu finden um letztendlich das Outcome zu verbessern. Ziel ist es, wenn möglich, die Ursachen zu beheben oder sogar zu umgehen.

Das Auftreten von postinterventionellen ischämischen Ereignissen ist u.a. abhängig von der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation. Einige Studien haben gezeigt, dass das Risiko hierfür deutlich steigt mit Überschreiten eines Grenzwertes der ADP-induzierten Aggregation (Vgl. 2.5.2) [Buonamici et al. 2007, Hochholzer et al. 2006, Price et al. 2008, Sibbing et al. 2009a].

Andere Studien wiederum befassen sich mit dem Auftreten periprozeduraler Blutungskomplikationen im Rahmen von Koronarinterventionen. Einige Studien zeigen, dass sich das Auftreten dieser Komplikationen sowohl auf die frühzeitige [Feit et al. 2007, Kinnaird et al. 2003, Mehran et al. 2009, Moscucci et al. 2003] als auch auf die langfristige Sterblichkeit [Feit et al. 2007, Kinnaird et al. 2003, Mehran et al. 2009, Ndrepepa et al. 2008] von Patienten auswirkt. Eine Vielzahl von Studien hat bereits einige sog. Prädiktoren für Blutungskomplikationen identifiziert: z. B. Alter, Geschlecht, BMI [Feit et al. 2007, Iijima et al. 2009, Kinnaird et al. 2003, Ndrepepa et al. 2008].

Bislang weniger erforscht ist die Wirkung von Clopidogrel auf die Thrombozytenreaktion, insbesondere hinsichtlich des gleichzeitigen Vorhandensein genetischer Varianten und deren Eingreifen in den Clopidogrelmetabolismus. Um das periprozedurale Blutungsrisiko oder postinterventionelle Ischämierisiko eines Patienten besser einschätzen zu können ist es deshalb wichtig, diejenigen Patienten mit erhöhter Wahrscheinlichkeit für eine Komplikation vor Beginn einer Therapie identifizieren zu können. Abhängig von der Höhe dieses Risikos kann der behandelnde Arzt dann ggf. eine andere Therapie wählen. Zum Beispiel ist dann zu diskutieren, ob ein Patient mit einer erhöhten Blutungsneigung aufgrund seines *17-Trägerstatus eine intensivierte Therapie mit Clopidogrel im Rahmen einer Koronarintervention trotzdem erhalten sollte oder ob ein anderes Präparat gewählt wird.

Clopidogrel ist ein Prodrug, das von hepatischen Enzymen aktiviert werden muss. Eine Mutation in einem hierfür zuständigen Gen wirkt sich somit auf den Clopidogrelmetabolismus aus [Kazui M 2010]. Die Genotypisierung auf relevante Polymorphismen des hepatischen CYP-Systems [Hulot et al. 2006, Sim et al. 2006] könnte also helfen eine individualisierte antithrombozytäre Therapie zu etablieren.

Außer angeborenen Faktoren können auch aber erworbene Faktoren einen Einfluss ausüben. So können z. B. Medikamente, die über die gleichen Enzyme verstoffwechselt werden, aufgrund höherer oder länger dauernder Affinität die Kapazitäten für Clopidogrel an den verstoffwechselnden Enzymen reduzieren und somit zu einer nicht ausreichenden Wirkung von Clopidogrel führen.

In vivo beeinflusst also das Zusammenspiel einer Vielzahl von Faktoren (Umwelteinflüsse, genetische Variablen) den Clopidogrelmetabolismus und damit die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation.

Aktuell sind noch nicht alle Einflussfaktoren bekannt. In dieser Arbeit werden exemplarisch zwei häufige genetische Varianten betrachtet. Geht man von den Ergebnissen dieser Arbeit z. B. hinsichtlich des *2-Allels aus, so ist das Risiko einer Low-Response für einen Träger dieser Mutation deutlich erhöht.

Allerdings ist die Wahrscheinlichkeit, ein Träger dieser Mutation zu sein, relativ gering. Außerdem kann selbst bei einer positiven Genotypisierung für diese Mutation nicht automatisch von einer Low-Response ausgegangen werden, da eine Vielzahl anderer, teilweise noch unbekannter oder unvollständig erforschter Faktoren und deren Zusammenspiel ebenfalls einen Einfluss besitzen. Betrachtet man nämlich die Werte der ADP-induzierten Aggregation hinsichtlich des Genotypen, so zeigt sich, dass sich Mediane und IQR zwar statistisch signifikant unterscheiden (Vgl. Abbildung 16), allerdings unterscheiden sich die Bereiche außerhalb der IQR nicht so stark zwischen den drei Genotypengruppen. Hier muss der Einfluss anderer Faktoren angenommen werden.

Man muss sich also fragen, ob aktuell eine generelle, präinterventionelle Genotypisierung indiziert ist, da bei noch unvollständigem Wissen über den Clopidogrelmetabolismus eine Therapieentscheidung nicht alleine vom Genotypen abhängig gemacht werden kann. Es empfiehlt sich eher nach Therapiebeginn mit Clopidogrel die ADP-

induzierte Thrombozytenaggregation zu messen und im Falle einer Low- oder High-Response eine Änderung der Dosis oder des Präparates zu erwägen.

Um die Sicherheit für die Patienten weiter zu steigern, ist es deshalb wichtig die Forschung fortzuführen und mit neuen Studien weitere Aspekte zu ergänzen. Hierzu zählen mögliche ebenfalls relevante Polymorphismen oder weitere Einflussfaktoren auf den Clopidogrelmetabolismus außerhalb des hepatischen CYP-Systems. So könnte in Zukunft bereits präinterventionell eine Therapieentscheidung anhand des Genotypen getroffen werden.

Die bisherigen Entwicklungen in der Pharmakogenetik haben bereits zu einer schnelleren Sequenzierung der DNA und zu einer Abnahme der Kosten hierfür geführt und eine weitere positive Kosten-Nutzen-Entwicklung ist zu erwarten. Es bleibt aber noch ein großes unerforschtes Feld in Bezug auf die Zuordnung einzelner Gene zu bestimmten Wirkungen, bzw. zu deren Einfluss auf den Metabolismus applizierter Medikamente. Weitere Forschung im Bereich der Pharmakogenetik und eine weitere positive Kosten-Nutzen-Entwicklung könnte, z. B. in Hinblick auf die Wirkung von Clopidogrel, beitragen das therapeutische Fenster für P2Y₁₂-Rezeptor-Antagonisten weiter anzupassen und hierdurch den Patienten zu einer individualisierteren Therapie und damit zu einem verbesserten Outcome zu verhelfen.

5. Zusammenfassung

Während und nach einer perkutanen Koronararterienintervention wird eine duale Therapie mit ASS und Clopidogrel verabreicht um das Risiko thrombotischer Komplikationen zu reduzieren. Vor allem für Clopidogrel ist das individuelle Ansprechen auf die Behandlung nicht einheitlich. Zuletzt zeigte sich in mehreren Studien, dass vor allem das polymorph exprimierte Leberenzym CYP2C19 einen Einfluss auf die in vivo Wirkung von Clopidogrel hat.

Ziel dieser Arbeit war es den isolierten und wechselseitigen Einfluss von zwei häufigen CYP-Allelen (CYP2C19*2 und CYP2C19*17) auf die Metabolisierung und damit auf die Aktivierung von Clopidogrel zu untersuchen und einen Zusammenhang mit ischämischen Ereignissen (*2) oder Blutungskomplikationen (*17) aufzuzeigen. Ein dritter Punkt der Untersuchung war die Wechselwirkung mit Omeprazol auf die Werte der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation.

Das Kollektiv der ersten Studie bestand aus Patienten, die sich einer elektiven Koronarintervention unterzogen. Für die zweite Studie wurden nur Patienten eingeschlossen, die sich zur elektiven koronarangiographischen Verlaufskontrolle nach erfolgter Stentimplantation vorstellten. Es erfolgten jeweils Genotypisierungen auf die o. g. Isoenzyme sowie Messungen der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation mittels Multiplate Analyzer.

Die Auswertung zeigte ein signifikant erhöhtes Blutungsrisiko bei Patienten mit *17-Trägerstatus aufgrund eines gesteigerten Ansprechens auf die Clopidogrel-Therapie, ein protektiver Effekt in Bezug auf ischämische Ereignisse im Zusammenhang mit dieser Allelvariante zeigte sich nicht. Die Allelvariante *2 wies einen signifikanten Gen-Dosis-Effekt auf in Bezug zu ischämischen Komplikationen wie Stentthrombosen. Ursache dafür ist eine reduzierte Ansprechrate auf Clopidogrel.

Betrachtet man die kombinierte Wirkung beider Isoenzyme zusammen mit Clopidogrel, so wurden die höchsten Werte einer ADP-induzierten Thrombozytenaggregation bei Patienten mit *2- und ohne *17-Allel beobachtet.

Unter Therapie mit Omeprazol zeigten sich sowohl bei *2-Trägern als auch bei Patienten mit Wildtyp erhöhte Aggregationswerte. Somit kann von einer allelunabhängigen, hemmenden Wirkung von Omeprazol auf den Clopidogrelmetabolismus ausgegangen werden.

Die Aktivierung von Clopidogrel hängt jedoch nicht nur von den hier untersuchten Isoenzymen ab. Neben genetischen Faktoren bestehen noch andere Einflüsse, die sich auf den Clopidogrelmetabolismus auswirken. Somit trägt eine präinterventionelle Genotypisierung hinsichtlich dieser beiden Allele zwar zu einer verbesserten Risikoabschätzung bei. Allerdings kann zur Zeit allein von dieser Genotypisierung keine allumfassende Entscheidung über das zu wählende Therapieregime getroffen werden.

Durch die Fortschritte beim Next-Generation Sequencing werden die Methoden der DNA-Sequenzierung schneller und damit auch günstiger. Wenn im Rahmen weiterer Forschung hinsichtlich des Clopidogrelmetabolismus endogene und exogene Einflüsse vollständig erforscht werden, ist es vorstellbar, dass aufgrund einer präinterventionellen Genotypisierung eine individualisierte medikamentöse Therapie erstellt werden kann. Da diese Voraussetzungen zur Zeit aber noch nicht erfüllt sind, ist es dienlicher unter Therapie mit Clopidogrel die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation zu messen und im Falle einer High- oder Low-Response die Dosis anzupassen bzw. ein anderes Präparat zu wählen.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Top10 weltweiter Todesursachen, in Millionen, Stand Mai 2014	8
Abbildung 2:	Metabolisierung von Clopidogrel durch bisher bekannte genetische Polymorphismen.....	9
Abbildung 3:	Patientenkollektiv zu CYP2C19*17.....	13
Abbildung 4:	Studienprotokoll zu CYP2C19*17	14
Abbildung 5:	Lyse-Protokoll.....	18
Abbildung 6:	PCR-Protokoll	21
Abbildung 7:	5' Nuclease Assay.....	22
Abbildung 8:	Beispiel einer Allel-Bestimmung mittels ABI Prism 7000 SDS aus einer eigenen Messung.....	23
Abbildung 9:	Protokoll zur Durchführung der Multiplatelet Aggregometrie	25
Abbildung 10:	Beispiel einer Low-Response bei einer eigenen Multiplatemessung	26
Abbildung 11:	Beispiel einer High-Response bei einer eigenen Multiplatemessung	26
Abbildung 12:	ADP-induzierte Thrombozytenaggregation in Bezug zu den CYP2C19-Genotypen.	37
Abbildung 13:	30-Tage-Inzidenz von TIMI-Blutungen in Bezug auf den CYP2C19-Genotypen	39
Abbildung 14:	*2-Trägerstatus Studienkollektiv	45
Abbildung 15:	*17-Trägerstatus im Studienkollektiv	45
Abbildung 16:	ADP-induzierte Thrombozytenaggregation (AU*min) in Bezug zu den CYP2C19*2-Genotypen (wt/wt, wt/*2, *2/*2).....	46
Abbildung 17:	Bootstrap-Analyse für die CYP2C19*2-Genotypen (A) und für die CYP2C19*17-Genotypen (B)	47
Abbildung 18:	ADP-induzierte Thrombozytenaggregation (AU*min) in Bezug auf die CYP2C19*17-Genotypen (wt/wt, wt/*17, *17/*17).....	50
Abbildung 19:	ADP-induzierte Thrombozytenaggregation (AU*min) in Bezug auf die CYP2C19*2/ CYP2C19*17-Genotypengruppen	53
Abbildung 20:	ADP-induzierte Thrombozytenaggregation (AU*min) in Bezug auf CYP2C19*2 bei Patienten mit und ohne Komedikation mit Omeprazol	54

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Ein- und Ausschlusskriterien für die CYP2C19*17-Studie	14
Tabelle 2:	Ein- und Ausschlusskriterien für die CYP2C19*2 und *17-Studie	15
Tabelle 3:	Pipettierschema	19
Tabelle 4:	Gruppeneinteilung nach Genotypen	29
Tabelle 5:	TIMI-Kriterien für Blutungsereignisse	29
Tabelle 6:	ARC-Definitionen für Stentthrombosen	30
Tabelle 7:	Beispiel für die Berechnung einer OR	33
Tabelle 8:	Genotypenhäufigkeiten im Studienkollektiv CYP2C19*17	35
Tabelle 9:	Grundlegende Eigenschaften der Studienpopulation	36
Tabelle 10:	ADP-induzierte Aggregationswerte nach *17-Genotypengruppen.....	37
Tabelle 11:	ADP-induzierte Thrombozytenaggregation bei Trägern von mindestens einem mutierten Allel im Vergleich zum homozygoten Wildtyp-Status	38
Tabelle 12:	Inzidenzen von TIMI-Blutungen in Bezug auf den Genotypen	39
Tabelle 13:	Statistischer Zusammenhang zwischen *17 und einem Blutungsrisiko	40
Tabelle 14:	Aggregationswerte der zwei Patienten mit einer tödlichen Blutungskomplikation	40
Tabelle 15:	Ergebnisse der multivariaten, logistischen Regressionsanalyse für das kombinierte Risiko von großen und kleinen TIMI-Blutungen.....	41
Tabelle 16:	Ischämieereignisse in den drei verschiedenen Genotypengruppen	42
Tabelle 17:	Grundlegende Eigenschaften der Studienpopulation in Bezug auf den Genotypen CYP2C19*2.....	43
Tabelle 18:	Grundlegende Eigenschaften der Studienpopulation in Bezug auf den Genotypen CYP2C19*17.....	44
Tabelle 19:	ADP-induzierte Thrombozytenaggregation in Bezug auf den *2-Trägerstatus	46
Tabelle 20:	ADP-induzierte Aggregation bei Trägern von mindestens einem *2-Allel im Vergleich zum homozygoten Wildtyp	47
Tabelle 21:	Prozentualer Anteil der Low-Responder an den Genotypengruppen (χ^2 , p<0,001)	48
Tabelle 22:	*2-Trägerstatus als Prädiktor einer Low- Response.....	48
Tabelle 23:	ADP-induzierte Aggregation entsprechend der Genotypengruppen von CYP2C19*17	49
Tabelle 24:	ADP-induzierte Thrombozytenaggregation bei Trägern von mindestens einem *17-Allel im Vergleich zum homozygoten Wildtyp	50
Tabelle 25:	Wahrscheinlichkeit einer High-Response für Clopidogrel abhängig vom *17- Trägerstatus	51

Tabelle 26:	Prozentualer Anteil der High-Responder in den Genotypengruppen. ($p=0,01$; χ^2)	51
Tabelle 27:	Abhängigkeit einer erhöhten Clopidogrel- Response vom *17-Trägerstatus	51

Literaturverzeichnis

- Airoldi, F., A. Colombo, N. Morici, A. Latib, J. Cosgrave, L. Buellesfeld, E. Bonizzoni, M. Carlino, U. Gerckens, C. Godino, G. Melzi, I. Michev, M. Montorfano, G. M. Sangiorgi, A. Qasim, A. Chieffo, C. Briguori, and E. Grube. 2007. "Incidence and predictors of drug-eluting stent thrombosis during and after discontinuation of thienopyridine treatment." *Circulation* 116 (7):745-54. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.686048.
- Ang, L., V. Palakodeti, A. Khalid, S. Tsimikas, Z. Idrees, P. Tran, P. Clopton, N. Zafar, G. Bromberg-Marin, S. Keramati, and E. Mahmud. 2008. "Elevated plasma fibrinogen and diabetes mellitus are associated with lower inhibition of platelet reactivity with clopidogrel." *J Am Coll Cardiol* 52 (13):1052-9. doi: 10.1016/j.jacc.2008.05.054.
- Angiolillo, D. J., A. Fernandez-Ortiz, E. Bernardo, F. Alfonso, C. Macaya, T. A. Bass, and M. A. Costa. 2007. "Variability in individual responsiveness to clopidogrel: clinical implications, management, and future perspectives." *J Am Coll Cardiol* 49 (14):1505-16. doi: 10.1016/j.jacc.2006.11.044.
- Applied Biosystems. 2003. "ABI Prism 7000 Sequence Detection System User Guide."
- Applied Biosystems. 2006. "TaqMan SNP Genotyping Assays."
- Applied Biosystems. 2010a. "GeneAmp PCR 9700 Manual."
- Applied Biosystems. 2010b. "TaqMan SNP Genotyping Assays Protocol."
- Bertrand, M. E., V. Legrand, J. Boland, E. Fleck, J. Bonnier, H. Emmanuelson, M. Vrolix, L. Missault, S. Chierchia, M. Casaccia, L. Niccoli, A. Oto, C. White, M. Webb-Peploe, E. Van Belle, and E. P. McFadden. 1998. "Randomized Multicenter Comparison of Conventional Anticoagulation Versus Antiplatelet Therapy in Unplanned and Elective Coronary Stenting : The Full Anticoagulation Versus Aspirin and Ticlopidine (FANTASTIC) Study." *Circulation* 98 (16):1597-1603. doi: 10.1161/01.cir.98.16.1597.
- Buonamici, P., R. Marcucci, A. Migliorini, G. F. Gensini, A. Santini, R. Panicia, G. Moschi, A. M. Gori, R. Abbate, and D. Antoniucci. 2007. "Impact of platelet reactivity after clopidogrel administration on drug-eluting stent thrombosis." *J Am Coll Cardiol* 49 (24):2312-7. doi: 10.1016/j.jacc.2007.01.094.
- Collet, J. P., J. S. Hulot, A. Pena, E. Villard, J. B. Esteve, J. Silvain, L. Payot, D. Brugier, G. Cayla, F. Beygui, G. Bensimon, C. Funck-Brentano, and G. Montalescot. 2009. "Cytochrome P450 2C19 polymorphism in young patients treated with clopidogrel after myocardial infarction: a cohort study." *Lancet* 373 (9660):309-17. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61845-0.
- Cutlip, D. E., S. Windecker, R. Mehran, A. Boam, D. J. Cohen, G. A. van Es, P. G. Steg, M. A. Morel, L. Mauri, P. Vranckx, E. McFadden, A. Lansky, M. Hamon, M. W. Krucoff, P. W. Serruys, and Consortium Academic Research. 2007. "Clinical end points in coronary stent trials: a case for standardized definitions." *Circulation* 115 (17):2344-51. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.685313.
- Daemen, Joost, Peter Wenaweser, Keiichi Tsuchida, Linda Abrecht, Sophia Vaina, Cyrill Morger, Neville Kukreja, Peter Jüni, Georgios Sianos, Gerrit Hellige, Ron T. van Domburg, Otto M. Hess, Eric Boersma, Bernhard Meier, Stephan Windecker, and Patrick W. Serruys. 2007. "Early and late coronary stent thrombosis of sirolimus-eluting and paclitaxel-eluting stents in routine clinical practice: data from a large two-institutional cohort study." *The Lancet* 369 (9562):667-678. doi: 10.1016/s0140-6736(07)60314-6.
- Doyle, B., C. S. Rihal, C. J. O'Sullivan, R. J. Lennon, H. J. Wiste, M. Bell, J. Bresnahan, and D. R. Holmes, Jr. 2007. "Outcomes of stent thrombosis and restenosis during

-
- extended follow-up of patients treated with bare-metal coronary stents." *Circulation* 116 (21):2391-8. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.707331.
- Dynabyte medical, Dynabyte GmbH, München. 2006. "Benutzerhandbuch Multiplate®."
- Dynabyte medical, Dynabyte GmbH, München. 2009. "Beipackzettel ADPtest, Prostaglandin E1."
- Efron, B. 1979. "Bootstrap Methods: Another Look at the Jackknife." *The Annals of Statistics* 7 (1):1-26. doi: 10.1214/aos/1176344552.
- Feit, F., M. D. Voeltz, M. J. Attubato, A. M. Lincoff, D. P. Chew, J. A. Bittl, E. J. Topol, and S. V. Manoukian. 2007. "Predictors and impact of major hemorrhage on mortality following percutaneous coronary intervention from the REPLACE-2 Trial." *Am J Cardiol* 100 (9):1364-9. doi: 10.1016/j.amjcard.2007.06.026.
- Frere, C., T. Cuisset, B. Gaborit, M. C. Alessi, and J. S. Hulot. 2009. "The CYP2C19*17 allele is associated with better platelet response to clopidogrel in patients admitted for non-ST acute coronary syndrome." *J Thromb Haemost* 7 (8):1409-11. doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03500.x.
- Gachet, C. 2008. "P2 receptors, platelet function and pharmacological implications." *Thromb Haemost* 99 (3):466-72. doi: 10.1160/TH07-11-0673.
- Geisler, T., D. Grass, B. Bigalke, K. Stellos, T. Drosch, K. Dietz, C. Herdeg, and M. Gawaz. 2008a. "The Residual Platelet Aggregation after Deployment of Intracoronary Stent (PREDICT) score." *J Thromb Haemost* 6 (1):54-61. doi: 10.1111/j.1538-7836.2007.02812.x.
- Geisler, T., E. Schaeffeler, J. Dippon, S. Winter, V. Buse, C. Bischofs, C. Zuern, K. Moerike, M. Gawaz, and M. Schwab. 2008b. "CYP2C19 and nongenetic factors predict poor responsiveness to clopidogrel loading dose after coronary stent implantation." *Pharmacogenomics* 9 (9):1251-9. doi: 10.2217/14622416.9.9.1251.
- Giannitsis, E., Hamm, Ch., Nef, H., Katus, H. 2012. Cardiac biomarkers. In *Percutaneous Interventional Cardiovascular Medicine - The PCR-EAPCI Textbook*, edited by E; Serruys Eeckhout, P.W.; Wijns, W.; Vahanian, A.; Sambeek M. van; De Palma, R.
- Gilard, M., B. Arnaud, J. C. Cornily, G. Le Gal, K. Lacut, G. Le Calvez, J. Mansourati, D. Mottier, J. F. Abgrall, and J. Bosch. 2008. "Influence of omeprazole on the antiplatelet action of clopidogrel associated with aspirin: the randomized, double-blind OCLA (Omeprazole CLopidogrel Aspirin) study." *J Am Coll Cardiol* 51 (3):256-60. doi: 10.1016/j.jacc.2007.06.064.
- Giusti B, Gori AM, Marcucci R, Saracini C, Sestini I, Paniccia R, Valente S, Antonucci D, Abbate R, Gensini GF. 2007. "Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism, but not CYP3A4 IVS10 + 12G/A and P2Y12 T744C polymorphisms, is associated with response variability to dual antiplatelet treatment in high-risk vascular patients." *Pharmacogenet Genomics* (17(12)):1057-64.
- Grines, C. L., R. O. Bonow, D. E. Casey, Jr., T. J. Gardner, P. B. Lockhart, D. J. Moliterno, P. O'Gara, P. Whitlow, Association American Heart, Cardiology American College of, Angiography Society for Cardiovascular, Interventions, Surgeons American College of, Association American Dental, and Physicians American College of. 2007. "Prevention of premature discontinuation of dual antiplatelet therapy in patients with coronary artery stents: a science advisory from the American Heart Association, American College of Cardiology, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, American College of Surgeons, and American Dental Association, with representation from the American College of Physicians." *Circulation* 115 (6):813-8. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.180944.
- Gurbel, P. A., R. C. Becker, K. G. Mann, S. R. Steinhubl, and A. D. Michelson. 2007. "Platelet function monitoring in patients with coronary artery disease." *J Am Coll Cardiol* 50 (19):1822-34. doi: 10.1016/j.jacc.2007.07.051.
- Gurbel, P. A., K. P. Bliden, B. L. Hiatt, and C. M. O'Connor. 2003. "Clopidogrel for coronary stenting: response variability, drug resistance, and the effect of

-
- pretreatment platelet reactivity." *Circulation* 107 (23):2908-13. doi: 10.1161/01.CIR.0000072771.11429.83.
- Gurbel, P. A., K. P. Bliden, W. Samara, J. A. Yoho, K. Hayes, M. Z. Fissaha, and U. S. Tantry. 2005. "Clopidogrel effect on platelet reactivity in patients with stent thrombosis: results of the CREST Study." *J Am Coll Cardiol* 46 (10):1827-32. doi: 10.1016/j.jacc.2005.07.056.
- Gurbel, P. A., W. C. Lau, and U. S. Tantry. 2008. "Omeprazole: a possible new candidate influencing the antiplatelet effect of clopidogrel." *J Am Coll Cardiol* 51 (3):261-3. doi: 10.1016/j.jacc.2007.07.090.
- Heestermans AACM, van Werkum JW, Schömig E, ten Berg JM, Taubert D. 2006. "Clopidogrel resistance caused by a failure to metabolize clopidogrel into its metabolites." *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 4:1143-5.
- Hochholzer, W., D. Trenk, H. P. Bestehorn, B. Fischer, C. M. Valina, M. Ferenc, M. Gick, A. Caputo, H. J. Buttner, and F. J. Neumann. 2006. "Impact of the degree of periprocedural platelet inhibition after loading with clopidogrel on early clinical outcome of elective coronary stent placement." *J Am Coll Cardiol* 48 (9):1742-50. doi: 10.1016/j.jacc.2006.06.065.
- Holmes, D. R., Jr., D. J. Kereiakes, S. Garg, P. W. Serruys, G. J. Dehmer, S. G. Ellis, D. O. Williams, T. Kimura, and D. J. Moliterno. 2010. "Stent thrombosis." *J Am Coll Cardiol* 56 (17):1357-65. doi: 10.1016/j.jacc.2010.07.016.
- Hulot, J. S., A. Bura, E. Villard, M. Azizi, V. Remones, C. Goyenvallé, M. Aiach, P. Lechat, and P. Gaussem. 2006. "Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism is a major determinant of clopidogrel responsiveness in healthy subjects." *Blood* 108 (7):2244-7. doi: 10.1182/blood-2006-04-013052.
- Iakovou, I., T. Schmidt, E. Bonizzoni, L. Ge, G. M. Sangiorgi, G. Stankovic, F. Airoldi, A. Chieffo, M. Montorfano, M. Carlino, I. Michev, N. Corvaja, C. Briguori, U. Gerckens, E. Grube, and A. Colombo. 2005. "Incidence, predictors, and outcome of thrombosis after successful implantation of drug-eluting stents." *JAMA* 293 (17):2126-30. doi: 10.1001/jama.293.17.2126.
- Iijima, R., G. Ndrepepa, J. Mehilli, R. A. Byrne, S. Schulz, F. J. Neumann, G. Richardt, P. B. Berger, A. Schomig, and A. Kastrati. 2009. "Profile of bleeding and ischaemic complications with bivalirudin and unfractionated heparin after percutaneous coronary intervention." *Eur Heart J* 30 (3):290-6. doi: 10.1093/eurheartj/ehn586.
- Jochem W. van Werkum, MD*, †, Antonius A. Heestermans, MD‡, A. Carla Zomer, MD*, Johannes C. Kelder, MD*, Maarten-Jan Suttorp, MD, PhD*, Benno J. Rensing, MD, PhD*, Jacques J. Koolen, MD, PhD§, B.R. Guus Brueren, MD, PhD§, Jan-Henk E. Dambrink, MD, PhD‡, Raymond W. Hautvast, MD, PhD //, Freek W. Verheugt, MD, PhD†, Jurriën M. ten Berg, MD, PhD. "Predictors of Coronary Stent Thrombosis : The Dutch Stent Thrombosis Registry." doi: 10.1016/j.jacc.2008.12.055.
- Kazui M, Nishiya Y, Ishizuka T, Hagihara K, Farid NA, Okazaki O, Ikeda T, Kurihara A. 2010. "Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the two oxidative steps in the bioactivation of clopidogrel to its pharmacologically active metabolite." *Drug Metab Dispos* 38 (1):92-9. doi: 10.1124/dmd.109.029132.
- Kereiakes, D.; Sarembock, I. 2012. Stent Thrombosis. In *Percutaneous Interventional Cardiovascular Medicine - The PCR-EAPCI Textbook*, edited by E; Serruys Eeckhout, P.W.; Wijns, W.; Vahanian, A.; Sambeek M. van; De Palma, R.
- Kinnaird, T. D., E. Stabile, G. S. Mintz, C. W. Lee, D. A. Canos, N. Gevorkian, E. E. Pinnow, K. M. Kent, A. D. Pichard, L. F. Satler, N. J. Weissman, J. Lindsay, and S. Fuchs. 2003. "Incidence, predictors, and prognostic implications of bleeding and blood transfusion following percutaneous coronary interventions." *Am J Cardiol* 92 (8):930-5.

-
- Kossler, J.; U.; Steigerwald, and U.; Walter. 2009. "[Anticoagulants of primary haemostasis]." *Hamostaseologie* 29 (3):274-8.
- Kuchulakanti, P. K., W. W. Chu, R. Torguson, P. Ohlmann, S. W. Rha, L. C. Clavijo, S. W. Kim, A. Bui, N. Gevorkian, Z. Xue, K. Smith, J. Fournadjieva, W. O. Suddath, L. F. Satler, A. D. Pichard, K. M. Kent, and R. Waksman. 2006. "Correlates and long-term outcomes of angiographically proven stent thrombosis with sirolimus- and paclitaxel-eluting stents." *Circulation* 113 (8):1108-13. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.600155.
- Laine, M., F. Paganelli, and L. Bonello. 2016. "P2Y12-ADP receptor antagonists: Days of future and past." *World J Cardiol* 8 (5):327-32. doi: 10.4330/wjc.v8.i5.327.
- Lau, W. C., P. A. Gurbel, P. B. Watkins, C. J. Neer, A. S. Hopp, D. G. Carville, K. E. Guyer, A. R. Tait, and E. R. Bates. 2004. "Contribution of hepatic cytochrome P450 3A4 metabolic activity to the phenomenon of clopidogrel resistance." *Circulation* 109 (2):166-71. doi: 10.1161/01.CIR.0000112378.09325.F9.
- Machery-Nagel. 2012. "User Manual: Genomic DNA from Blood."
- Manoukian, S. V., F. Feit, R. Mehran, M. D. Voeltz, R. Ebrahimi, M. Hamon, G. D. Dangas, A. M. Lincoff, H. D. White, J. W. Moses, S. B. King, 3rd, E. M. Ohman, and G. W. Stone. 2007. "Impact of major bleeding on 30-day mortality and clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes: an analysis from the ACUITY Trial." *J Am Coll Cardiol* 49 (12):1362-8. doi: 10.1016/j.jacc.2007.02.027.
- Mardis, E. R. 2008. "Next-generation DNA sequencing methods." *Annu Rev Genomics Hum Genet* 9:387-402. doi: 10.1146/annurev.genom.9.081307.164359.
- Mayo, O. 2008. "A century of Hardy-Weinberg equilibrium." *Twin Res Hum Genet* 11 (3):249-56. doi: 10.1375/twin.11.3.249.
- Mega, J. L., S. L. Close, S. D. Wiviott, L. Shen, R. D. Hockett, J. T. Brandt, J. R. Walker, E. M. Antman, W. Macias, E. Braunwald, and M. S. Sabatine. 2009. "Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel." *N Engl J Med* 360 (4):354-62. doi: 10.1056/NEJMoa0809171.
- Mega, J. L., T. Simon, J. P. Collet, J. L. Anderson, E. M. Antman, K. Bliden, C. P. Cannon, N. Danchin, B. Giusti, P. Gurbel, B. D. Horne, J. S. Hulot, A. Kastrati, G. Montalescot, F. J. Neumann, L. Shen, D. Sibbing, P. G. Steg, D. Trenk, S. D. Wiviott, and M. S. Sabatine. 2010. "Reduced-function CYP2C19 genotype and risk of adverse clinical outcomes among patients treated with clopidogrel predominantly for PCI: a meta-analysis." *JAMA* 304 (16):1821-30. doi: 10.1001/jama.2010.1543.
- Mehili, J.; Hamm, Ch. W.; Landmesser, U.; Massberg, S. 2015. "Akutes Koronarsyndrom ohne ST-Hebung (NSTEMI-ACS)." *ESC Pocket Guidelines*.
- Mehran, R., S. J. Pocock, G. W. Stone, T. C. Clayton, G. D. Dangas, F. Feit, S. V. Manoukian, E. Nikolsky, A. J. Lansky, A. Kirtane, H. D. White, A. Colombo, J. H. Ware, J. W. Moses, and E. M. Ohman. 2009. "Associations of major bleeding and myocardial infarction with the incidence and timing of mortality in patients presenting with non-ST-elevation acute coronary syndromes: a risk model from the ACUITY trial." *Eur Heart J* 30 (12):1457-66. doi: 10.1093/eurheartj/ehp110.
- Mehran, R., S. V. Rao, D. L. Bhatt, C. M. Gibson, A. Caixeta, J. Eikelboom, S. Kaul, S. D. Wiviott, V. Menon, E. Nikolsky, V. Serebruany, M. Valgimigli, P. Vranckx, D. Taggart, J. F. Sabik, D. E. Cutlip, M. W. Krucoff, E. M. Ohman, P. G. Steg, and H. White. 2011. "Standardized bleeding definitions for cardiovascular clinical trials: a consensus report from the Bleeding Academic Research Consortium." *Circulation* 123 (23):2736-47. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.009449.
- Moscucci, M., K. A. Fox, C. P. Cannon, W. Klein, J. Lopez-Sendon, G. Montalescot, K. White, and R. J. Goldberg. 2003. "Predictors of major bleeding in acute coronary syndromes: the Global Registry of Acute Coronary Events (GRACE)." *Eur Heart J* 24 (20):1815-23. doi: 10.1016/s0195-668x(03)00485-8.

-
- Ndrepepa, G., P. B. Berger, J. Mehilli, M. Seyfarth, F. J. Neumann, A. Schomig, and A. Kastrati. 2008. "Periprocedural bleeding and 1-year outcome after percutaneous coronary interventions: appropriateness of including bleeding as a component of a quadruple end point." *J Am Coll Cardiol* 51 (7):690-7. doi: 10.1016/j.jacc.2007.10.040.
- Ohlsson Rosenborg, S., J. Mwinyi, M. Andersson, R. M. Baldwin, R. S. Pedersen, S. C. Sim, L. Bertilsson, M. Ingelman-Sundberg, and E. Eliasson. 2008. "Kinetics of omeprazole and escitalopram in relation to the CYP2C19*17 allele in healthy subjects." *Eur J Clin Pharmacol* 64 (12):1175-9. doi: 10.1007/s00228-008-0529-z.
- Park, D. W., S. C. Yun, S. W. Lee, Y. H. Kim, C. W. Lee, M. K. Hong, S. S. Cheong, J. J. Kim, S. W. Park, and S. J. Park. 2008. "Stent thrombosis, clinical events, and influence of prolonged clopidogrel use after placement of drug-eluting stent data from an observational cohort study of drug-eluting versus bare-metal stents." *JACC Cardiovasc Interv* 1 (5):494-503. doi: 10.1016/j.jcin.2008.06.011.
- Price, M. J., S. Endemann, R. R. Gollapudi, R. Valencia, C. T. Stinis, J. P. Levisay, A. Ernst, N. S. Sawhney, R. A. Schatz, and P. S. Teirstein. 2008. "Prognostic significance of post-clopidogrel platelet reactivity assessed by a point-of-care assay on thrombotic events after drug-eluting stent implantation." *Eur Heart J* 29 (8):992-1000. doi: 10.1093/eurheartj/ehn046.
- Savi, P., J. M. Pereillo, M. F. Uzabiaga, J. Combalbert, C. Picard, J. P. Maffrand, M. Pascal, and J. M. Herbert. 2000. "Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel." *Thromb Haemost* 84 (5):891-6.
- Schomig, A., F. J. Neumann, A. Kastrati, H. Schühlen, R. Blasini, M. Hadamitzky, H. Walter, E. M. Zitzmann-Roth, G. Richardt, E. Alt, C. Schmitt, and K. Ulm. 1996. "A randomized comparison of antiplatelet and anticoagulant therapy after the placement of coronary-artery stents." *N Engl J Med* 334 (17):1084-9. doi: 10.1056/NEJM199604253341702.
- Serebruany, V., S. V. Rao, M. A. Silva, J. L. Donovan, A. O. Kannan, L. Makarov, S. Goto, and D. Atar. 2010. "Correlation of inhibition of platelet aggregation after clopidogrel with post discharge bleeding events: assessment by different bleeding classifications." *Eur Heart J* 31 (2):227-35. doi: 10.1093/eurheartj/ehp434.
- Shi, M. 2001. "Enabling Large-Scale Pharmacogenetic Studies by High-Throughput Mutations Detection and Genotyping Technologies." *Clinical Chemistry* 47 (2):164-172.
- Shuldiner, A. R., J. R. O'Connell, K. P. Bliden, A. Gandhi, K. Ryan, R. B. Horenstein, C. M. Damcott, R. Pakyz, U. S. Tantry, Q. Gibson, T. I. Pollin, W. Post, A. Parsa, B. D. Mitchell, N. Faraday, W. Herzog, and P. A. Gurbel. 2009. "Association of cytochrome P450 2C19 genotype with the antiplatelet effect and clinical efficacy of clopidogrel therapy." *JAMA* 302 (8):849-57. doi: 10.1001/jama.2009.1232.
- Sibbing D, von Beckerath O, Schömig A, Kastrati A, von Beckerath N. 2007. "Impact of body mass index on platelet aggregation after administration of a high loading dose of 600 mg of clopidogrel before percutaneous coronary intervention." *Am J Cardiol* 100(2):203-5.
- Sibbing, D., S. Braun, S. Jawansky, W. Vogt, J. Mehilli, A. Schomig, A. Kastrati, and N. von Beckerath. 2008a. "Assessment of ADP-induced platelet aggregation with light transmission aggregometry and multiple electrode platelet aggregometry before and after clopidogrel treatment." *Thromb Haemost* 99 (1):121-6. doi: 10.1160/TH07-07-0478.
- Sibbing, D., S. Braun, T. Morath, J. Mehilli, W. Vogt, A. Schomig, A. Kastrati, and N. von Beckerath. 2009a. "Platelet reactivity after clopidogrel treatment assessed with point-of-care analysis and early drug-eluting stent thrombosis." *J Am Coll Cardiol* 53 (10):849-56. doi: 10.1016/j.jacc.2008.11.030.

-
- Sibbing, D., D. Gebhard, W. Koch, S. Braun, J. Stegherr, T. Morath, N. Von Beckerath, J. Mehilli, A. Schomig, T. Schuster, and A. Kastrati. 2010a. "Isolated and interactive impact of common CYP2C19 genetic variants on the antiplatelet effect of chronic clopidogrel therapy." *J Thromb Haemost* 8 (8):1685-93. doi: 10.1111/j.1538-7836.2010.03921.x.
- Sibbing, D., and A. Kastrati. 2009b. "Risk of combining PPIs with thienopyridines: fact or fiction?" *Lancet* 374 (9694):952-4. doi: 10.1016/S0140-6736(09)61562-2.
- Sibbing, D., W. Koch, D. Gebhard, T. Schuster, S. Braun, J. Stegherr, T. Morath, A. Schomig, N. von Beckerath, and A. Kastrati. 2010b. "Cytochrome 2C19*17 allelic variant, platelet aggregation, bleeding events, and stent thrombosis in clopidogrel-treated patients with coronary stent placement." *Circulation* 121 (4):512-8. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.885194.
- Sibbing, D., T. Morath, J. Stegherr, S. Braun, W. Vogt, M. Hadamitzky, A. Schomig, A. Kastrati, and N. von Beckerath. 2009c. "Impact of proton pump inhibitors on the antiplatelet effects of clopidogrel." *Thromb Haemost* 101 (4):714-9.
- Sibbing, D., S. Schulz, S. Braun, T. Morath, J. Stegherr, J. Mehilli, A. Schomig, N. von Beckerath, and A. Kastrati. 2010c. "Antiplatelet effects of clopidogrel and bleeding in patients undergoing coronary stent placement." *J Thromb Haemost* 8 (2):250-6. doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03709.x.
- Sibbing, D., J. Stegherr, W. Latz, W. Koch, J. Mehilli, K. Dorrlor, T. Morath, A. Schomig, A. Kastrati, and N. von Beckerath. 2009d. "Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism and stent thrombosis following percutaneous coronary intervention." *Eur Heart J* 30 (8):916-22. doi: 10.1093/eurheartj/ehp041.
- Sibbing, D., D. Taubert, A. Schomig, A. Kastrati, and N. Von Beckerath. 2008b. "Pharmacokinetics of clopidogrel in patients with stent thrombosis." *J Thromb Haemost* 6 (7):1230-2. doi: 10.1111/j.1538-7836.2008.03004.x.
- Sibbing, D., N. von Beckerath, T. Morath, J. Stegherr, J. Mehilli, N. Sarafoff, S. Braun, S. Schulz, A. Schomig, and A. Kastrati. 2010d. "Oral anticoagulation with coumarin derivatives and antiplatelet effects of clopidogrel." *Eur Heart J* 31 (10):1205-11. doi: 10.1093/eurheartj/ehq023.
- Siller-Matula, J. M., G. Christ, I. M. Lang, G. Delle-Karth, K. Huber, and B. Jilma. 2010. "Multiple electrode aggregometry predicts stent thrombosis better than the vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation assay." *J Thromb Haemost* 8 (2):351-9. doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03699.x.
- Siller-Matula, J. M., I. Lang, G. Christ, and B. Jilma. 2008. "Calcium-channel blockers reduce the antiplatelet effect of clopidogrel." *J Am Coll Cardiol* 52 (19):1557-63. doi: 10.1016/j.jacc.2008.07.055.
- Sim, S. C., C. Risinger, M. L. Dahl, E. Aklillu, M. Christensen, L. Bertilsson, and M. Ingelman-Sundberg. 2006. "A common novel CYP2C19 gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants." *Clin Pharmacol Ther* 79 (1):103-13. doi: 10.1016/j.clpt.2005.10.002.
- Simon, T., C. Verstuyft, M. Mary-Krause, L. Quteineh, E. Drouet, N. Meneveau, P. G. Steg, J. Ferrieres, N. Danchin, L. Becquemont, S. T. Elevation French Registry of Acute, and S. T. Elevation Myocardial Infarction Investigators Non. 2009. "Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events." *N Engl J Med* 360 (4):363-75. doi: 10.1056/NEJMoa0808227.
- Taubert, D., A. Kastrati, S. Harlfinger, O. Gorchakova, A. Lazar, N. von Beckerath, A. Schomig, and E. Schomig. 2004. "Pharmacokinetics of clopidogrel after administration of a high loading dose." *Thromb Haemost* 92 (2):311-6. doi: 10.1267/THRO04080311.
- Trenk, D., W. Hochholzer, M. F. Fromm, L. E. Chialda, A. Pahl, C. M. Valina, C. Stratz, P. Schmiebusch, H. P. Bestehorn, H. J. Buttner, and F. J. Neumann. 2008.

-
- "Cytochrome P450 2C19 681G>A polymorphism and high on-clopidogrel platelet reactivity associated with adverse 1-year clinical outcome of elective percutaneous coronary intervention with drug-eluting or bare-metal stents." *J Am Coll Cardiol* 51 (20):1925-34. doi: 10.1016/j.jacc.2007.12.056.
- van Dijk, E. L., H. Auger, Y. Jaszczyszyn, and C. Thermes. 2014. "Ten years of next-generation sequencing technology." *Trends Genet* 30 (9):418-26. doi: 10.1016/j.tig.2014.07.001.
- Wang, G., H. P. Lei, Z. Li, Z. R. Tan, D. Guo, L. Fan, Y. Chen, D. L. Hu, D. Wang, and H. H. Zhou. 2009. "The CYP2C19 ultra-rapid metabolizer genotype influences the pharmacokinetics of voriconazole in healthy male volunteers." *Eur J Clin Pharmacol* 65 (3):281-5. doi: 10.1007/s00228-008-0574-7.
- Weiß, Ch. 2013. "Basiswissen Medizinische Statistik." In: Springer Verlag.
- Weiss, J., M. M. Ten Hoewel, J. Burhenne, I. Walter-Sack, M. M. Hoffmann, J. Rengelshausen, W. E. Haefeli, and G. Mikus. 2009. "CYP2C19 genotype is a major factor contributing to the highly variable pharmacokinetics of voriconazole." *J Clin Pharmacol* 49 (2):196-204. doi: 10.1177/0091270008327537.
- World Health Organization. 2014. "The Top 10 causes of death." Last Modified updated May 2014 Accessed 21 Nov 2015, 19:57 Uhr. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/#>.
- World Health Organization. 2015. "Cardiovascular diseases (CVDs)." Last Modified updated Jan 2015 Accessed 22 Nov 2015, 19:25 Uhr. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>.
- Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, Chrolavicius S, Tognoni G, Fox KK; Clopidogrel in Unstable Angina to Prevent Recurrent Events Trial Investigators. 2001. "Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation." *N Engl J Med* 345(7):494-502.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Adnan Kastrati, Stellvertretende Direktor der Klinik für Herz- und Kreislauferkrankungen am Deutschen Herzzentrum München danke ich für die Bereitstellung und Überlassung des Themas.

In der gesamten Zeit von der Phase der Datenerhebung bis zur Fertigstellung der Dissertation hat mich Prof. Dr. med. Dirk Sibbing in allen Fragen zur Arbeit gut betreut, zunächst als Arbeitsgruppenleiter am DHZ München und jetzt als Oberarzt an der Medizinischen Klinik und Poliklinik I des Klinikums der Universität München. Mit seinen kritischen Anmerkungen und Hinweisen hat er wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Die Arbeitsgruppe von Dr. Werner Koch am DHZ München hat mich warmherzig in den Räumlichkeiten der Gruppe aufgenommen und bei auftretenden Fragen unterstützt. Die Arbeitsgruppe hat auch die Blutproben zur Genotypisierung und die notwendigen Patientendaten zur Verfügung gestellt.

Den Kolleginnen Tanja Morath und Julia Stegherr danke ich für die Einarbeitung in die Methoden und für die gute Zusammenarbeit.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern und meinem Bruder für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung.