Aus der

Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik (Department)

Tübingen

Abteilung Innere Medizin III

(Schwerpunkte: Kardiologie und Kreislauferkrankungen)

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Gawaz

Ein neuer thrombozytenspezifischer prognostischer Marker beim Akuten Koronarsyndrom

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Johannes Kammerer

aus

Stuttgart

2009

Dekan:	Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter:	Professor Dr. A. May
2. Berichterstatter:	Professor Dr. A. Scheule

Inhaltsverzeichnis

1	**Einleitung**	8
1.1	Plättchen bei primärer und sekundärer Hämostase	8
1.2	Membran-Glykoproteine auf Thrombozyten	12
1.3	Kollagen-Rezeptoren und ihre Signalwege	13
1.3.1	GPVI und seine Signalwege	13
1.3.2	GPVI ist der Hauptsignalrezeptor für Kollagen auf Plättchen	17
1.3.3	GPVI als möglicher Marker des Akuten Koronarsyndroms	19
1.4	CD40-Ligand	20
1.5	Plättchen im Entzündungsprozess	21
2	**Fragestellung**	24
3	**Material und Methoden**	25
3.1	Chemikalien und Geräte	25
3.1.1	Durchflusszytometrie	26
3.2	Studienpopulation	30
3.3	Probengewinnung und –verarbeitung	32
3.4	FACS-Messung	34
3.5	Patiententabelle	34
3.6	Statistik	36
4	**Ergebnisse**	37

5 Diskussion 46
5.1 GPVI als vielversprechender thrombozytärer Marker 46
5.2 Einflussfaktoren auf die GPVI-Expression 48

6 Zusammenfassung 50

7 Literaturverzeichnis 51

8 Danksagung 58

9 Lebenslauf 59

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin converting enzyme
ACS	Akutes Koronarsyndrom
ADP	Adenosindiphosphat
AT1-Rezeptor	Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1
CK	Kreatinkinase
Col	Kollagen
CPDA	Citrat Phosphat Dextrose Arginin
CRP	C-reaktives Protein
FACS	fluorescence-activated cell sorter
Fb	Fibrinogen
GP	Glykoprotein
IAP	instabile Angina pectoris
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IL	Interleukin
kDA	Kilodalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
MCP	Monozyten-chemotaktisches Protein
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
NF-κB	nuclear factor κB
NSTEMI	non ST-elevating myocardial infarction
PECAM	platelet-endothelial cell adhesion molecule
PTCA	perkutane transluminale coronare Angioplastie
RAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
SAP	stabile Angina pectoris
STEMI	ST-elevating myocardial infarction
Tn^+ACS	Troponin-positives Akutes Koronarsyndrom
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tsn	Thrombospondin
TxA2	Thromboxan A2
Vn	Vitronektin
vWF	von Willebrand Faktor

1 Einleitung

1.1 Plättchen bei primärer und sekundärer Hämostase

Die Hauptfunktion von Blutplättchen besteht darin, die Blutung von Wunden nach Gewebstraumen zu stillen. Dieser Vorgang läuft als primäre und sekundäre Hämostase ab. Hierfür werden sowohl eine veränderte Gefäßoberfläche als auch schnelle Zellaktivierungsmechanismen benötigt mit der darauf folgenden Akkumulation zusätzlicher Plättchen und Fibrin zu einem wachsenden Thrombus.

Der wesentliche Triggermechanismus für die Bildung eines hämostatischen Thrombus nach traumatischen Gefäßverletzungen ist der Verlust der endothelialen Barriere zwischen extrazellulärer Matrix und Blutstrom. Die Antwort der Plättchen auf dieses Ereignis läuft in drei aufeinanderfolgenden aber dennoch eng verzahnten Phasen ab, die man Adhäsion, Aktivierung und Aggregation nennt.

Die Adhäsion von ruhenden Plättchen an der beschädigten Gefäßwand ist der erste Schritt der primären Hämostase und wird als primäre Adhäsion bezeichnet (3). Die Anheftung von bereits aktivierten Plättchen an subendotheliale Strukturen nennt man sekundäre Adhäsion.

Der Adhäsionsprozess wird durch Glykoproteine vermittelt, die sich auf der Thrombozytenmembran befinden.

Der erste Kontakt zwischen zirkulierenden Plättchen und Gefäßwand wird durch thrombozytäres Glykoprotein Ib und an Kollagen gebundenen Von-Willebrand-Faktor hergestellt (39,45). Diese Interaktion ist relativ lose, denn sie kann schnell wieder aufgehoben werden. Sie ist das Ergebnis eines „Rollens“ der Plättchen entlang der freigelegten subendothelialen Matrix (47,48).

Diese Verlangsamung der Plättchen erlaubt es dem Kollagen-Rezeptor GPVI, der sich auf der Thrombozytenoberfläche befindet, seinen Liganden zu binden, was zur Aktivierung von Plättchen-Integrinen mit nachfolgender fester Adhäsion führt.

Die Rezeptor-Reaktion wird recht langsam geschlossen, ist aber irreversibel (37). Direkte GPVI-Kollagen-Interaktionen sind wesentlich für die initiale Anlagerung der Plättchen an der Gefäßwand und infolgedessen für stabile Plättchen-Adhäsion und –Aggregation an arteriellen Gefäßwandverletzungen verantwortlich (33).

Die GPVI-Bindung während der Plättchen-Kollagen-Interaktion versetzt $\alpha_2\beta_1$- und $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrine von einem niedrigen in einen höheren Affinitätsgrad (37).

Die Mg^{2+}-abhängige Bindung von $\alpha_2\beta_1$-Integrinen (auch als GPIa/IIa bzw. VLA-2 bezeichnet) an Kollagen und die Bindung von $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrinen an Von-Willebrand-Faktor sind die wichtigsten Interaktionen, die fester Adhäsion zugrunde liegen (48). Die Bindung des Plättchen-Kollagen-Rezeptors an Kollagen trägt wesentlich zur Aktivierungskaskade bei sich anlagernden Plättchen bei. Ein primärer hämostatischer Thrombus kann sich vollständig nach der Aktivierung der Plättchen ausbilden. Ausgehend von aus der Plättchenmembran freigesetzter Arachidonsäure bildet das gebundene und aktivierte Plättchen mittels des Enzyms Cyclooxygenase den aggregationsfördernden Faktor ThromboxanA_2. Dieses verstärkt den Aktivierungsprozess nach dessen Freisetzung in den Extrazellularraum und fördert nach Bindung an einen speziellen Thromboxan-Rezeptor die weitere Plättchenaggregation, speziell in Bezug auf Plättchen, die selbst nicht direkt in Kontakt mit Kollagen gekommen sind. Sie werden somit über lösliche Plättchenagonisten wie ADP, Fibrinogen, Von-Willebrand-Faktor und Thromboxan „indirekt“ aktiviert. Diese Substanzen verstärken auch die Wirkung von $\alpha_2\beta_1$- und $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrinen.

Während der Adhäsion und der damit einhergehenden Formveränderung setzt das Plättchen verschiedene in seinen Granula gespeicherte Substanzen in seine Umgebung frei. Dieser mit Exozytose vergleichbare Prozess ist als Sekretion, Freisetzung oder als Degranulation bekannt.

Die thrombozytäre Freisetzung von ADP und auch Von-Willebrand-Faktor, die sich in den dichten Granula befinden, sind von zentraler Bedeutung für die Aktivierung und Rekrutierung von ruhenden Plättchen, um zu dem Wachstum des plättchenreichen Thrombus beizutragen.

Die ADP- und Thromboxan-Rezeptoren gehören zur Gruppe heterotrimerer G-Proteine, zu denen G_i,G_q,G_{12}, und G_{13} zählen. Von besonderer Bedeutung ist dabei G_q, das besonders stark aktivierungsabhängig ist.

Um die Bindung von ADP an seinen Rezeptor zu unterbinden wird das Medikament Clopidogrel eingesetzt, das seine aggregationshemmende Wirkung dadurch erzielt, dass es den ADP-Rezeptor irreversibel blockiert. Das Medikament wird erfolgreich nach Stentimplantation sowie bei Patienten mit symptomatischer Arteriosklerose eingesetzt. ADP ist außerdem in der Lage, den Glykoprotein IIb-IIIa-Komplex zu aktivieren indem es an einen speziellen Membranrezeptor bindet (20). Als Rezeptorantagonist zum Glykoprotein IIb-IIIa kommt Abciximab zum Einsatz, das bisher bei Hoch-Risiko PTCA-Patienten angewendet wird.

Zusätzlich zur Hämostase interagiert das Plättchen durch viele physiologische Mechanismen über freigesetzte Faktoren mit seiner Umgebung. Solche Faktoren, wie der Wachstumsfaktor plateled-derived growth factor (PDGF), wirken mitogen auf Fibroblasten in der Umgebung des Plättchenthrombus und sind ein Bestandteil von proliferativen Prozessen am Ort von Gefäßwandläsionen und der dortigen Intimabildung. Darüber hinaus wird der pro-inflammatorische Faktor CD40-Ligand (CD40L) von aktivierten Plättchen abgegeben. CD40L beeinflusst entscheidend die chemotaktischen und adhäsiven Eigenschaften von Gefäßwandzellen (23).

Die Interaktion von zirkulierenden Plättchen mit bereits angelagerten Plättchen läuft mittels aktivierter $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin-Rezeptoren ab. Dies stimuliert weitere Plättchen zur Aggregation.

Dabei werden zwei Phasen von Aggregation unterschieden:

Primäre und sekundäre Aggregation. Während der primären Phase sind die Thrombozyten locker untereinander über Fibrinogen-Brücken verknüpft.

Dieser Prozess ist reversibel. Die sekundäre Aggregation setzt erst mit gewisser Verzögerung ein, nachdem es durch Plättchen-Sekretion zur Freisetzung von Granula-Komponenten gekommen ist. Dies verstärkt den Aktivierungsprozess und die sekundäre, irreversible Phase der Aggregation zusätzlich (20).

Scherkräfte, die die Kontaktwahrscheinlichkeit zwischen zwei Plättchen erhöhen, Calcium und Fibrinogen sind entscheidend für einen effektiven Aggregationsprozess (20). Der Glykoprotein IIb-IIIa-Komplex spielt dabei eine zentrale Rolle. Im Ruhezustand kann lösliches Plasma-Fibrinogen nicht an die Plättchenoberflächen binden, da die Bindungsstellen für Fibrinogen am Glykoprotein IIb-IIIa-Komplex nur nach Aktivierung zugänglich sind. Die Bindung von GPIIb-IIIa ist stark calciumabhängig und führt zur Bildung von Plättchen-Aggregaten.

Die primäre Plättchen-Aggregation ist relativ instabil, eine effiziente Hämostase jedoch benötigt eine Konsolidierung des plättchenreichen Thrombus durch sekundäre Hämostase. Diese beginnt mit der Aktivierung der Gerinnungskaskade und der Bildung von Thrombin und Fibrin. Dabei spielt die aktivierte Plättchenoberfläche eine entscheidende Rolle (17). Die Bindung von Fibrin an das Plättchenaggregat führt zu einer Verfestigung über Quervernetzungen. Das Plättchen-Fibrin-Konglomerat zieht sich zusammen und stabilisiert somit den Thrombus.

Während des Aktivierungsprozesses schnüren sich kleine Membranvesikel, als Mikropartikel bezeichnet, aus der Plasmamembran des Plättchens ab. Diese Partikel üben eine starke gerinnungsfördernde Wirkung in der Umgebung des Plättchens durch die Bildung eines Prothrombinase-Komplexes an ihrer Oberfläche aus (20). Der GPIIb-IIIa-Rezeptor hat Anteil an der thrombozytären Bildung von Thrombin und der Ausschleusung von Mikropartikeln. Diese Partikel katalysieren nun die Thrombin-Synthese, was zur Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin führt und dem Thrombus dadurch zusätzliche Stabilität verleiht.

1.2 Membran-Glykoproteine auf Thrombozyten

Die Plättchen exprimieren Glykoproteine auf ihren Membranen, die die Interaktion zwischen ihnen selbst und subendothelialer Matrix, plasmatischen Gerinnungsfaktoren, Endothelzellen oder Leukozyten vermitteln.

Die Glykoproteine werden in verschiedene Gruppen entsprechend ihrer charakteristischen Molekülstruktur klassifiziert: Integrine, Leucin-reiche Glykoproteine, Selectine, Immunglobulin-ähnliche Adhäsionsrezeptoren und lysosomale integrale Membranproteine (39).

Integrine sind Adhäsionsrezeptoren, die Strukturen des Zytoskeletts mit Elementen der extrazellulären Matrix verbinden. Integrine bestehen aus α- und β-Untereinheiten, von denen sich spezielle α-Abschnitte mit entsprechenden β-Abschnitten paaren und so einen funktionellen Rezeptor bilden. Sie befinden sich auf den meisten ruhenden Zellen und haben dort eine relativ geringe Affinität zu ihren Liganden, was sich aber durch Aktivierungsmechanismen sehr schnell ändern kann. Integrine interagieren mit zahlreichen Glykoproteinen, wie zum Beispiel Kollagen, Fibrinogen, Fibronektin, Laminin, Thrombospondin, Vitronektin und Von-Willebrand-Faktor (25). Derzeit werden fünf verschiedene Integrine auf Plättchen beschrieben, drei der β_1-Klasse und zwei der β_3-Klasse (39).

Plättchen enthalten zwei Glykoprotein-Membran-Komplexe, GPIb-V-IX und GPIV, die durch ihren Anteil an der Aminosäure Leucin unterschieden werden. Der GPIb-V-IX-Komplex bildet Adhäsionsrezeptoren für Von-Willebrand-Faktor und spielt eine zentrale Rolle in der primären Hämostase.

Die Hauptaufgabe von GPIb-V-IX ist dabei auf die Adhäsion von zirkulierenden Plättchen an Von-Willebrand-Faktor auf Kollagenfibrillen gerichtet, den hohen Scherkräften, die im arteriellen Flussprofil herrschen zum Trotz. Der Komplex besteht aus vier Untereinheiten mit Bindungsstellen für Von-Willebrand-Faktor und Thrombin (44).

Selektine sind vaskuläre Adhäsionsrezeptoren, die verschiedenste Zell-Zell-Interaktionen vermitteln. P-Selectin wird in den α-Granula gespeichert. Es wird auf dem ruhenden Plättchen nicht exprimiert.

Durch die aktivierungsbedingte Degranulierung kommt es zur schnellen Expression auf der Plättchenoberfläche. Die P-Selectin Oberflächenexpression ist somit ein Marker für die Thrombozyten-Aktivierung.

1.3 Kollagen-Rezeptoren und ihre Signalwege

Der erste Schritt in der hämostatischen Kaskade ist die Plättchen-Interaktion mit freigelegter extrazellulärer Matrix an Gefäßwandverletzungen. Unter den makromolekularen Bestandteilen scheint Kollagen die Hauptrolle in diesem Prozess zu spielen. Es wurden Gene für mehr als 20 Arten von Kollagen identifiziert, von denen 9 Typen in der Gefäßwand vorkommen: I, III, IV, V, VI, VIII, XII, XIII und XIV. Typ I und III sind dabei die wichtigsten Bestandteile der subendothelialen Matrix, Typ IV ist für den Aufbau der Basalmembran verantwortlich. Die Aminosäuren Glycin, Prolin und Hydroxyprolin sind hauptverantwortlich für den Aufbau der Kollagen-Tripelhelix.
Plättchenadhäsion und –aggregation an Kollagen sind Prozesse, die verschiedenste Plättchenagonisten beinhalten, die an einer Vielzahl von Oberflächen-rezeptoren, wie zum Beispiel Integrinen, Immunglobulin-ähnlichen Rezeptoren und G-Protein gekoppelten Rezeptoren ansetzen.

1.3.1 GPVI und seine Signalwege

GPVI wurde erstmalig vor über zwanzig Jahren mittels 2-D-Gelelektrophorese als ein 60-65 kDa schweres Glykoprotein identifiziert (11). Es wurde im Rahmen einer Studie in Japan entdeckt, bei der ein Patient mit einer Thrombozytopenie den Kollagen-Rezeptor GPVI nicht besaß und gegen ihn Autoantikörper gebildet hatte. Dies wurde zur genauen Strukturaufklärung genutzt (12).

Diese GPVI-freien Plättchen ließen sich durch Kollagen nicht stimulieren, wohl aber durch andere Substanzen.

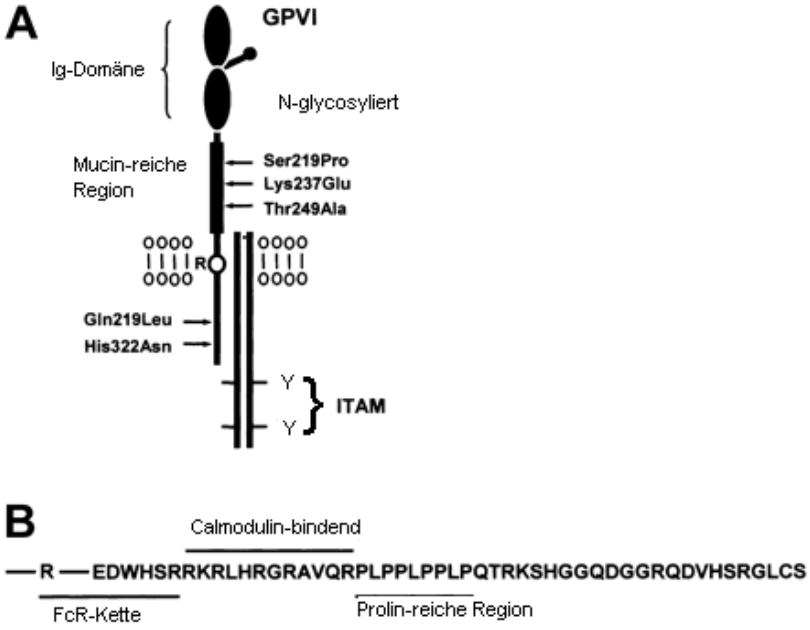
Auf Kollagenfibrillen wurde die genaue GPVI-Bindungsstruktur als eine Triplet-Repeat-Sequenz identifiziert, die, synthetisch hergestellt, GPVI aktivieren konnte.

GPVI ist ein Typ von Transmembran-Glykoproteinen, der zur Immunglobulin-Rezeptor-Familie gehört und Ähnlichkeiten mit dem Fcα-Rezeptor sowie dem Rezeptor natürlicher Killerzellen besitzt (12,38). Menschliches GPVI ist aus 339 Aminosäuren zusammengesetzt und enthält zwei Immunglobulin-C2-ähnliche extrazelluläre Domänen, gebildet aus Disulfidbrücken, einem Mucin-ähnlichen Stiel, einer transmembranösen Region und einem kurzen aus 51 Aminosäuren aufgebauten cytoplasmatischen Schwanz.

Wie Abbildung 1 zeigt, besitzt GPVI einen positiv geladenen Arginin-Rest in seiner transmembranösen Region, der für die Verknüpfung mit der χ-Kette des Fc-Rezeptors (FcR) verantwortlich ist (6,58), dem wichtigsten Element bei der GPVI-vermittelten Signalübertragung. Die ersten sechs juxtamembranösen Aminosäuren sind dafür entscheidend. Der cytosolische Schwanz enthält eine Prolin-reiche Region, die selektiv Domänen von Tyrosinkinasen bindet (53). Er enthält außerdem einen Calmodulin-bindenden Teil (4). Calmodulin ist konstitutiv mit GPVI verknüpft und durchläuft eine verzögerte Dissoziation während der Plättchen-Aktivierung, deren Bedeutung noch nicht geklärt ist.

Die Bindung von GPVI an Kollagen führt zur Phosphorylierung von zwei Tyrosinresten an der χ-Kette des Fc-Rezeptors (8,16,41) innerhalb einer als ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif, auch ARAM oder TAM genannt) bezeichneten Struktur, dargestellt in Abbildung 2. Man konnte diesen Mechanismus durch Einsatz des Schlangengifts Convulxin nachvollziehen. Dies führt zur Bindung und Aktivierung durch Disulfidbrücken der Tyrosinkinase $p72^{SYK}$, was eine Signalkaskade analog zu Immunglobulin-Rezeptoren auslöst, die damit beginnt, dass die Phospholipase Cχ2 aktiviert wird (54).

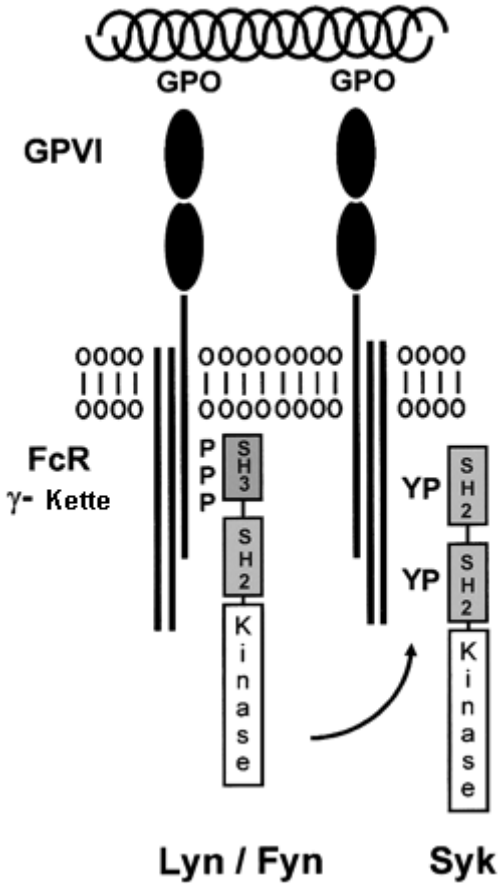
Es entstehen Inositoltriphosphat und Diacylglycerol, die die Calciummobilisation und Proteinkinase C-Aktivierung einleiten. Dies geschieht $\alpha_2\beta_1$-unabhängig. Es kommt schlussendlich zur Degranulation und zur Plättchenaggregation (5).



(modifiziert nach 38)

Abb.1: A: Aufbau von GPVI

B: Aminosäuren-Struktur des zytosolischen Schwanzes mit Bereich der FcRχ-Ketten-Interaktion, Calmodulin-bindender Domäne und Prolin-reicher Region



(modifiziert nach 38)

Abb. 2: Möglicher Mechanismus der ITAM-Phosphorylierung

Kollagen bindet mit seiner spezifischen GPO-Sequenz an GPVI. Dabei werden 2 GPVI-Moleküle verknüpft. Der zytosolische Schwanz besitzt eine Prolin-reiche Domäne, die die SH3-Gruppe der Src-Kinase bindet. Die beiden Src-Kinasen Lyn und und Fyn ermöglichen die Phosphorylierung der Tyrosinkinase Syk und die Initiierung der Signalkaskade mit der Phosphorylierung der Phospholipase Cχ2.

1.3.2 GPVI ist der Hauptsignalrezeptor für Kollagen auf Plättchen

Die Plättchenoberfläche exprimiert mindestens zwei verschiedene Kollagen-Rezeptoren, das $\alpha_2\beta_1$-Integrin und das plättchen-spezifische GPVI (38). Ein dritter Rezeptor, der besonders in der Frühphase der Adhäsion als wichtig erscheint, der GPIb-V-IX-Komplex, bindet nicht direkt an Kollagen, sondern an kollagengebundenen Von-Willebrand-Faktor. Man fand heraus, dass der GPVI-Komplex ein Schlüsselrezeptor für alle Arten von Kollagen ist (26).

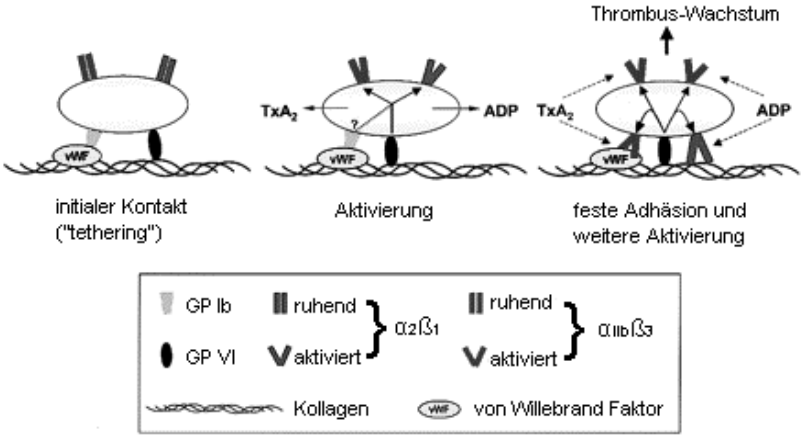
Jung und Moroi zeigten, dass die Affinität von $\alpha_2\beta_1$-Integrin für Kollagen über intrazelluläre Signalwege durch GPVI gesteuert wird. Sie bewiesen, dass mehrere Plättchenagonisten wie ADP, ThromboxanA$_2$ und GPVI-spezifische Stimuli die Bindungsaffinität von $\alpha_2\beta_1$-Integrin für monomeres oder lösliches Kollagen erhöhen (27,28,34). Abbildung 3 veranschaulicht dieses Prinzip.

Für die Kollagen-assoziierte Plättchenadhäsion bei höheren Scherkräften wird vWF auf den Kollagenfibrillen benötigt. Diese Interaktion ist unabdingbar für das initiale Abfangen der Plättchen aus dem Blutstrom und ist somit abhängig von der schnellen Reaktion zwischen vWF und GPIbα (48). Diese Bindung führt für einige Minuten zum „Rollen“ der Plättchen auf einer vWF-beschichteten Oberfläche bis $\alpha_{IIb}\beta_3$-vermittelte stabile Adhäsion eintritt (47). Im Gegensatz dazu tritt die stabile Adhäsion sehr schnell bei einer Kollagen-beschichteten Oberfläche $\alpha_2\beta_1$- und $\alpha_{IIb}\beta_3$-vermittelt ein (37,48). Diese Beobachtungen legen bei der Interaktion von vWF mit GPIb und $\alpha_{IIb}\beta_3$ eine wichtige Rolle von Kollagen nahe, das von funktionellem GPVI abhängig ist.

Es erscheint einleuchtend, dass die erste Kontaktaufnahme von Plättchen mit Kollagen und die darauf folgende Kaskade von Integrin-Aktivierung, Adhäsion und Thrombuswachstum an GPVI gebunden sind.

Diese Entwicklungen beleuchten eine neue Sequenz von Ereignissen in der Frühphase von Hämostase und Thrombose und rücken GPVI in eine zentrale Position in diesem komplexen Prozess (38).

Unter Flussbedingungen mit hohen Scherkräften agieren GPIbα und GPVI dahingehend, zirkulierende Plättchen aus dem Blutstrom heraus an ihre Liganden der extrazellulären Matrix, vWF und Kollagen, zu binden. Die schnelle Lösung dieser Bindungen verhindert jedoch die Ausbildung stabiler Adhäsion.
Die Generierung intrazellulärer Signale durch GPVI und wahrscheinlich auch GPIb versetzt β_1- und β_3-Integrine in einen höheren Affinitätsgrad und induziert die Freisetzung löslicher Agonisten wie ADP und ThromboxanA_2. Die aktivierten Integrine initiieren nun die feste Adhäsion durch Bindung an vWF und Kollagen wobei dieser Prozess noch zusätzlich durch die autokrine Aktivität der Mediatoren verstärkt wird, also der Wirkung auf die freisetzende Zelle selbst. Die Integrin-vermittelte Adhäsion wiederum verstärkt die GPVI-Kollagen-Interaktion und führt zu einer gesteigerten Signalaktivität wodurch auch die Integrin-Aktivität selbst heraufgeregelt wird. Somit werden schließlich auch die Sekretion und gerinnungsfördernde Wirkung verstärkt. Letztlich führt auch die Akkumulation von freigesetztem ADP und ThromboxanA_2 zur Aktivierung weiterer Plättchen und somit dem steten Wachstum des Thrombus.
Die genannten Mechanismen mit der Schlüsselrolle von GPVI (33) sind im klinischen Alltag von besonderer Bedeutung beim akuten Koronarsyndrom, einer arteriellen Gefäßwandverletzung durch Plaqueruptur mit Freilegung von extrazellulärer Matrix und den darauf folgenden oben genannten Aktivierungsmechanismen.
Die gezielte Blockade von GPVI bei Hoch-Risiko-Patienten könnte hier einen hohen antithrombotischen Stellenwert erzielen und schwerwiegende Komplikationen wie Gewebshypoxie- bzw. –ischämie vermeiden.



(modifiziert nach 38)

Abb.3: Mechanismen der Plättchen-Aktivierung an Kollagen

Nach initialer, reversibler Bindung kommt es über Aktivierungs-mechanismen zu fester Adhäsion und weiterer Aktivierung

1.3.3 GPVI als möglicher Marker des Akuten Koronarsyndroms

Anknüpfend an die bisher beschriebenen Mechanismen ist es interessant, GPVI als einen möglichen frühen Marker des Akuten Koronarsyndroms zu untersuchen, da die verstärkte Oberflächenexpression dieses Glykoproteins im Gegensatz zu konventionellen Myokardischämie-Markern wie Troponin-I und CK sofort messbar ist.

In einer Pilotstudie (7) wurde an 367 Patienten, die an stabiler Angina pectoris und Akutem Koronarsyndrom litten, die GPVI-Expression mittels FACS-Analyse gemessen, wobei sich signifikante Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen ergaben. Es zeigte sich, dass GPVI hier einen prädiktiven Wert für ein ACS besitzt. Über diesen Oberflächenrezeptor ist die Plättchenaktivierung bei Plaqueruptur durch den Kontakt mit freigelegtem Kollagen direkt messbar ohne ein „blindes Zeitfenster“ wie bei Tn-I und CK.

1.4 CD40-Ligand

CD40-Ligand (CD40L) ist ein 39 kDa schweres transmembranöses, pro-inflammatorisches Glykoprotein, das zur Familie der Tumor Nekrose Faktoren (TNF) gehört. CD40L wurde ursprünglich bei T-Lymphozyten entdeckt, wo es eine Rolle bei der Immunantwort spielt, nämlich der Bindung an den B-lymphozytären Rezeptor CD40 (49). Sowohl CD40L als auch CD40 wurden ebenfalls bei anderen Zellen des Gefäßsystems gefunden, wie beispielsweise Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Monozyten und Makrophagen, wo sie in Verbindung mit Entzündungsmediatoren gebracht wurden.

Die Pionierarbeit von Henn et al. zeigte, dass CD40L und CD40 auch auf Thrombozyten existieren und dass durch CD40L bestimmte Funktionen vermittelt werden.

Sie fanden heraus, dass CD40L bei unstimulierten Plättchen nicht zu finden ist, nach Aktivierung jedoch sehr schnell auf der Oberfläche exprimiert wird (23).

Sie zeigten darüber hinaus, dass die Oberflächenexpression von CD40L entzündungsfördernd wirkt und die Expression bestimmter Chemokine, Adhäsionsmoleküle (23) und Gewebsfaktoren durch die Bindung von CD40 auf Endothelzellen und Monozyten (50) regelt.

Durch die aktivierungsbedingte Oberflächenexpression von CD40L kommt es zu pro-inflammatorischen Effekten bei Endothelzellen durch endotheliales CD40 (23,50).

Die Bindung von CD40 auf Endothelzellen (29) bewirkt die Aktivierung und Expression von Adhäsionsmolekülen und Gewebsfaktoren, sie fördert auch die Produktion von entzündungsfördernden Chemokinen und Zytokinen. CD40L auf Plättchen kann auch Entzündungsprozesse vermitteln, die zu Matrixdegeneration und Plaqueruptur mit darauf folgendem ACS führen können. Zusätzlich zu seiner inflammatorischen und atherogenen Rolle ist CD40L auch bei der Thrombose von Bedeutung:

Bei hohen Scherkräften bindet CD40L direkt über die Integrin-bindende Sequenz KGD an das $\alpha_{IIb}\beta_3$–Integrin der Plättchen, was somit die Thrombusbildung fördert und die Ausbreitung der Plättchen über Integrin-Signale induziert (2). Somit kann Plättchen-CD40L eine Schlüsselverbindung zwischen Thrombose, Entzündungsgeschehen und Atherosklerose sein (1).

1.5 Plättchen im Entzündungsprozess

Neben ihrer grundlegenden Rolle bei Hämostase und Thrombose haben Thrombozyten auch entscheidenden Einfluss auf das Entzündungsgeschehen (42). Plättchen enthalten eine Vielzahl entzündungsfördernder Komponenten wie Eikosanoiden, Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die in großen Mengen in den Granula gespeichert werden und innerhalb von Sekunden nach Aktivierung freigesetzt werden können (22).

Darüber hinaus resultiert die Akkumulation aktivierter Plättchen an Gefäßwandläsionen möglicherweise aus der hohen Konzentration thrombozytärer Substanzen, die die adhäsiven und chemotaktischen Eigenschaften der Gefäßwandzellen verändern (22). Folglich können Plättchen die Chemotaxis und Rekrutierung von Monozyten in die Intima zu einem frühen Zeitpunkt der Atherogenese unterstützen (42).

Endotheliale Dysfunktion und vaskuläre Läsionen sind der Grundstein für atherosklerotische Prozesse (43). Von Plättchen freigesetzte Substanzen erwiesen sich als Induktionsmechanismus für endotheliale Gene, die in frühen Stadien der Entzündung aktiv sind (22,42). Aus der Reihe der inflammatorischen Gene wird MCP-1 von aktivierten Endothelzellen exprimiert (40). MCP-1 gehört zu der C-C Chemokin-Familie und zieht Monozyten bereits in subnanomolaren Konzentrationen zu Entzündungsprozessen (56).

Die MCP-1-Genregulation wird durch einen Trankriptionskomplex gesteuert, der der Kontrolle des nukleären Transkriptionsfaktors NF-κB unterliegt (55). Erhöhte Spiegel von MCP-1-mRNA wurden in atherosklerotischen Läsionen gefunden (31).

Die Chemotaxis und Diapedese zirkulierender Monozyten durch die endotheliale Barriere hindurch sind Voraussetzungen für die sich anschließende Umwandlung von Monozyten in Makrophagen zu einem frühen Zeitpunkt der Atherosklerose (43).

Das Adhäsionsmolekül ICAM-1, auch als CD54 bezeichnet, ist ein wichtiger Adhäsionsrezeptor für die Gruppe der Immunglobuline und wird auf eine aktivierungsabhängige Art und Weise auf Endothel exprimiert (24,57). ICAM-1 kann die Adhäsion von neutrophilen Leukozyten, Monozyten und Lymphozyten an die geschädigte Gefäßwand vermitteln (52) und so den Entzündungsprozess voranbringen.

Die Expression früher Response-Gene auf Entzündungsprozesse wie MCP-1 oder ICAM-1 wird im Endothel von dem Transkriptionsfaktor NF-κB reguliert (13). Aktivierte Plättchen induzieren die Aktivität dieses Transkriptionsfaktors (18). Es wurde gezeigt, dass aktivierte Plättchen entscheidend die chemotaktischen (über MCP-1) und adhäsiven (über ICAM-1) Funktionen von Endothelzellen verändern können, was über NF-κB-abhängige Prozesse vonstatten geht (18,19,23). Dies geschieht zu Beginn der Atherogenese.

Die Plättchen-induzierte Aktivierung des NF-κB-Systems könnte für das Entzündungsgeschehen bei der Atherosklerose mitverantwortlich sein.

Die Sekretion chemotaktischer Substanzen wie MCP-1 und die Oberflächenexpression von ICAM-1, was einen wichtigen Rezeptor für die Monozyten-Adhäsion an Endothelzellen darstellt (30), werden durch die Freisetzung hochwirksamer, Zytokin-ähnlicher Substanzen wie IL-1 und CD40L durch die aktivierten Plättchen ausgelöst (18,19,23).

Diese experimentellen Ergebnisse stützen die Hypothese, dass inflammatorische Veränderungen an der Gefäßwand entweder in der Umgebung eines Plättchen-reichen Thrombus oder nach dem Kontakt aktivierter Thrombozyten mit der intakten Gefäßwand ausgelöst werden.

Diese Veränderungen begünstigen das Einwandern von Monozyten und deren Umwandlung in Makrophagen.

Durch die Aufnahme von hoch-oxidiertem LDL durch Scavenger- Rezeptoren in die Makrophagen kommt es zu deren Umwandlung in Schaumzellen.

Diese begehen schließlich Apoptose und bilden extrazelluläre Lipid-Pools, die makroskopisch als sogenannte „fatty-streaks“ sichtbar sind. Der Lipidkern des atherosklerotischen Plaque entsteht also durch aus Schaumzellen freigesetztes LDL.

Durch die Einwanderung von glatten Muskelzellen in die Intima verdickt sich diese innerste Gefäßschicht zunehmend. Eine durch Fibromyozyten gebildete Matrix bildet eine fibröse Kappe, die dann sekundär kalzifiziert. Besonders in den Schulterregionen, das heißt, an den seitlichen Begrenzungen der fibrösen Kappe ist diese besonders vulnerabel. Durch die äußerst bedrohliche Komplikation der Plaqueruptur kommt es zur Freilegung von extrazellulärer Matrix mit sofortiger Plättchenaktivierung (31,43). Durch die Aktivierung des RAS kommt es zu einer verstärkten ACE-Aktivität mit daraus resultierenden erhöhten Angiotensin II-Spiegeln im Blut. Zytokine und Chemokine wie IL-6 und TNF-α werden ausgeschüttet, IL-1 erhöht den CRP-Spiegel.

2 Fragestellung

Anhand der oben genannten grundlegenden Mechanismen der Thrombozytenfunktion und –regulation hat die vorliegende Studie die folgenden Fragestellungen:

1) Ist die Oberflächenexpression von GPVI auf Thrombozyten bei Patienten mit Akutem Koronarsyndrom erhöht?
2) Kann ein schon prospektiv ermittelter Cut-off-Wert zur Identifizierung von Risikopatienten mit Akutem Koronarsyndrom dienen?
3) Wie wertvoll ist die GPVI-Bestimmung im Vergleich zu etablierten Markern des Akuten Koronarsyndroms?
4) Wie ist die Prognose und der klinische Verlauf bei Patienten mit erhöhten GPVI-Werten?

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Geräte:

In unserer Studie verwendeten wir die folgenden monoklonalen Antikörper, markiert mit Fluorescein Isothiocyanat (FITC, grün, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) oder Phycoerythrin (PE, rot):

Anti-CD42b (Klon SZ2) ist ein spezifischer monoklonaler Antikörper gegen GP Ib-V-IX, das ausschließlich auf Thrombozyten vorhanden ist und eine verlässliche Kontrolle darstellt, dass Thrombozyten durchfusszytometrisch erfasst werden. Es wurde anti-CD42b-PE (Immunotech, Marseille, Frankreich) verwendet.

Anti-CD62P (Klon CLB-Thromb/6) bindet an das aus den α-Granula freigesetzte Glykoprotein P-Selectin, das nur bei aktivierten Plättchen an der Oberfläche exprimiert wird und einen Marker für die Degranulation darstellt. In der Studie wurde anti-CD62P-FITC (Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland) verwendet.

Der monoklonale Antikörper anti-GPVI (Klon 4c9) wurde in unserem Labor mit FITC (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) konjugiert. Anhand dieses Antikörpers ließ sich die Oberflächenexpression von GPVI auf den Thrombozyten erfassen.

Es wurden ferner Paraformaldehyd (PFA) von Merck, Hohenbrunn, Deutschland sowie Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) von Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland zur Aufbereitung der Proben verwendet.

Die durchflusszytometrische Erfassung der Zellen wurde an einem FACS-Calibur-Gerät (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt.

3.1.1 Durchflusszytometrie:

Ein Durchflusszytometer wird auch als FACS-Gerät bezeichnet. Diese Abkürzung steht für „fluorescence activated cell sorter“. Es handelt sich um ein Gerät mit dem Zellen anhand von Fluoreszenz-Signalen charakterisiert werden können. Dabei wird jede Zelle einzeln an einem Laser vorbeigelenkt, der die Fluoreszenz-Farbstoffe der Antikörper anregt. Es kommt zur Emission von Licht einer bestimmten Wellenlänge. Durch ein komplexes System von Spiegeln und Filtern wird ein spezifisches Signal für jeden einzelnen Fluoreszenz-Antikörper erzeugt. Es ist auch unabhängig von Fluoreszenz möglich, die Größe und Granularität der Zellen zu bestimmen.

So können ganz bestimmte Oberflächenstrukturen aber auch intrazelluläre Bestandteile untersucht werden, was einen enormen Qualitäts- und Zeitgewinn gegenüber der klassischen Auszählmethode am Mikroskop bedeutet.

Man durchläuft bei jeder FACS-Messung stets vier Arbeitsschritte: Probenvorbereitung, Inbetriebnahme des Durchflusszytometers, Kompensation mit anschließender Messung der Proben und schlussendlich die Auswertung der Messergebnisse.

Der Laser ist die wichtigste Komponente des FACS-Geräts. Der Begriff Laser bedeutet „light amplification by stimulated emission of radiation“, was soviel wie „Lichtverstärkung durch angeregte Aussendung von Strahlung” heißt. Er basiert auf dem Prinzip, dass ein bestimmter Stoff angeregt wird und Strahlung aussendet. Diese Strahlung ist stark gebündelt und hat nahezu eine konstante Wellenlänge, man spricht von monochromatischem Licht. Bei FACS-Messungen können verschiedene Laser zum Einsatz kommen, der gebräuchlichste ist dabei der Argonionenlaser mit einer Wellenlänge von 488nm. Die Kühlung erfolgt zumeist mit Luft oder Wasser. Das komplexe optische System des Durchflusszytometers sorgt dafür, dass der Laserstrahl gebündelt wird bevor er auf die Probe in der Messküvette trifft. Durch das Auftreffen des Lichts auf die Probe erfolgt eine Streuung, die von dem Gerät detektiert wird (32).

Das nach vorne abgelenkte Licht wird im „Forwardscatter“ (FSC) registriert und liefert Informationen über die Größe der Zellen. Das in einem 90°-Winkel abgelenkte Seitwärtsstreulicht wird als „Sidescatter“ (SSC) bezeichnet und dient als Maß für die Granularität der gemessenen Zellen. Abbildung 4 veranschaulicht dieses Prinzip.

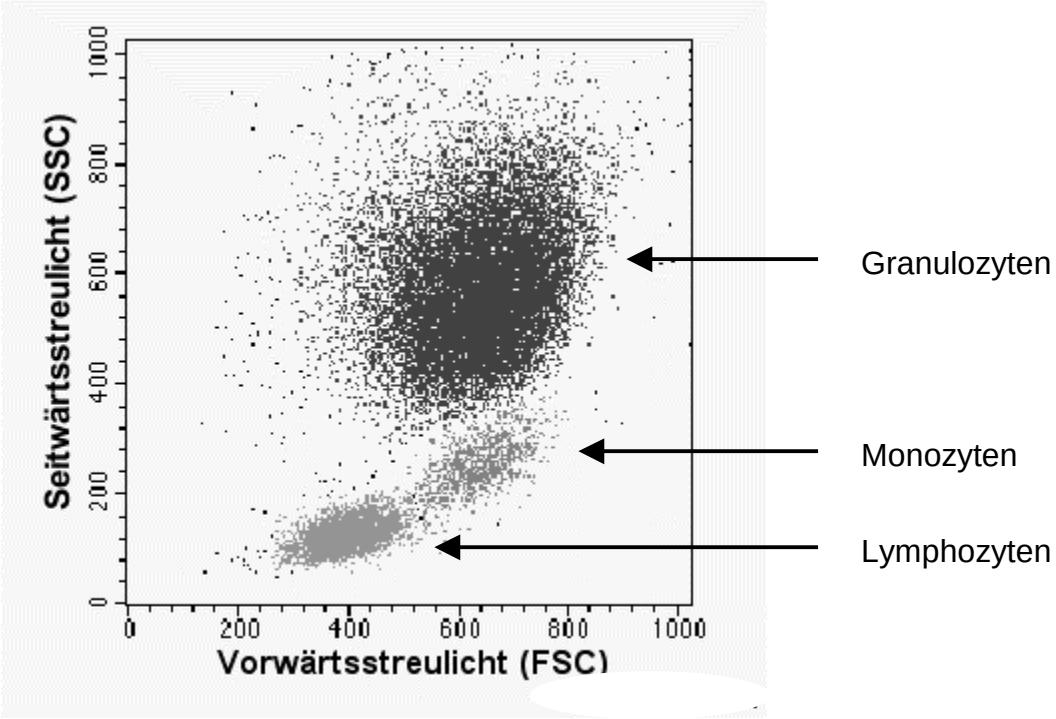


Abb. 4: Verteilung der verschiedenen Zellpopulationen anhand des Vorwärts-und Seitwärtsstreulichts

Das Vorwärtsstreulicht ist ein Maß für die Größe der Zellen, das Seitwärtsstreulicht für deren Granularität

Zur Messung des emittierten Lichts kommen spezielle Filter zum Einsatz: Bandpassfilter lassen nur Licht eines bestimmten Wellenlängenbereichs durch wie zum Beispiel von 520 bis 570 nm. Longpassfilter lassen nur Licht oberhalb einer bestimmten Wellenlänge passieren, beim 620LP beispielsweise nur oberhalb von 620 nm.

Anhand dieser Filter werden nur ausgewählte Wellenlängen von den Detektoren registriert und das Signal verstärkt. Mit diesen Messwerten liefert das Programm die gewünschten Ergebnisse.

Die verwendeten Antikörper lassen sich mit den verschiedensten Fluoreszenzfarbstoffen kombinieren, die ihre jeweiligen Absorptionsmaxima bei ganz unterschiedlichen Wellenlängen haben.

Bei FITC (Fluorescein-Isothiocyanat) liegt dieses Maximum bei 495 nm, bei PE (Phycoerythrin) findet man zwei Maxima bei 480 und 565 nm. Außerdem sind auch verschiedene Emissionsmaxima und Anregungswellenlängen zu nennen.

Die Anregungswellenlänge von 488 nm bei beiden Farbstoffen lässt sich gut mit einem Argonionenlaser kombinieren. Es sind auch Tandemkonjugate erhältlich, bei denen zwei Fluoreszenzfarbstoffe miteinander gekoppelt sind. Der erste Farbstoff wird angeregt und regt durch sein emittiertes Licht den zweiten Farbstoff an. Ein Vertreter dieser Klasse ist PE/Cy5, bei dem ein PE-Molekül mit Cyanin gekoppelt ist. Das Emissionsmaximum liegt dabei bei 667 nm. Von Bedeutung für den praktischen Umgang mit Fluoreszenzfarbstoffen ist deren Lichtempfindlichkeit, das heißt man sollte sie nicht längere Zeit Licht aussetzen sondern eine Abschirmung durch beispielsweise Aluminiumfolie zum Schutz verwenden.

Bei den unterschiedlichen Zellmarkierungsmethoden wird unterschieden zwischen intrazellulärer Markierung und Zelloberflächenmarkierung. Letztere lässt sich in direkte und indirekte Markierung gliedern, wobei direkte Markierung die Verwendung eines einfachen Fluoreszenzantikörpers bezeichnet und indirekte Markierung den Einsatz eines unmarkierten Primärantikörpers und eines markierten Sekundärantikörpers.

Auch Mehrfachmarkierungen mit verschiedenen Antikörpern gleichzeitig sind möglich. Am einfachsten ist die direkte Oberflächenmarkierung mit einem Antikörper, der gezielt gegen die antigene Struktur gerichtet ist, die untersucht werden soll. Bei intrazellulären Markierungen ist die Permeabilisierung der Zellmembran Voraussetzung, wofür häufig Saponine eingesetzt werden, die mit dem Cholesterol der Zellmembran reagieren (32).

Wenn die Probe nach der Markierung, auch Färbung genannt, noch aufbewahrt werden soll, bevor sie gemessen wird, sollte eine Fixierung vorgenommen werden. Gebräuchlich ist dabei PFA (Paraformaldehyd), das den status quo erhält. Chemisch handelt es sich dabei um eine Quervernetzung von Proteinen. Dabei können aber auch relevante zu untersuchende Strukturen modifiziert werden, das durch Vergleichsmessungen abgeschätzt werden sollte.

Vor der Antikörperzugabe behandelt man die Zellen in der Regel mit Waschpuffer wie dem weit verbreiteten PBS (Phosphat-Puffer Saline), das bestimmte Proteinzusätze enthalten kann, um ein physiologisches Milieu zu imitieren.

Außerdem sollen unspezifische Antikörper-Bindungen sowie „patching“ und „capping“ verhindert werden. „Patching“ bezeichnet das passive Verklumpen der Zelloberflächenproteine, unter „capping“ versteht man die metabolismusabhängige Ansammlung dieser vernetzten Proteine an einem Pol der Zelle.

Um dann zur Messung der gefärbten Zellen das Durchflusszytometer in Betrieb zu nehmen, sollte genügend Trägerflüssigkeit vorhanden sein, die den Probenfluss durch die Messküvette gewährleistet. Man verwendet hierzu in der Regel steril filtriertes PBS. Ohne Druck ist kein laminarer Probenfluss zu erreichen, er wird durch eine Luftpumpe mit einem Druckregler aufgebaut. Es sollten sich keine Luftblasen in den Schläuchen des Flüssigkeitssystems befinden da sie die Messung erheblich beeinträchtigen können. Es ist bei einigen Geräten möglich, vor der Messung noch zu „primen“, also mit Hilfe eines Luftstroms die Probennadel von Verunreinigungen zu befreien. Das ganze System sollte sinnvollerweise vor jeder Messung mit destilliertem Wasser gründlich durchgespült werden um aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen.

Eine Kompensation kann notwendig sein um Überlappungsbereichen der Emissionsspektren gleichzeitig verwendeter Fluorochrome Rechnung zu tragen. Bei FITC und PE kommt es zu einem breiten Überlappungsspektrum.

Das bedeutet, dass Teile der Signale des FITC-Antikörpers irrtümlich von dem PE-Detektor registriert würden und umgekehrt und falsche Messwerte entstehen könnten. Durch die Kompensation erfolgt eine „Nachjustierung“ mit einer Trennung der Signale der jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe.

Bei der Auswertung der Ergebnisse ist die Darstellungsweise ein wichtiger Aspekt, der auf die Fragestellung abgestimmt sein sollte.

Man kann einen Histogramm-Plot verwenden, bei dem auf der x-Achse die Fluoreszenzintensität je nach Signalstärke in linearer oder logarithmischer Darstellung aufgetragen ist und auf der y-Achse die Anzahl der Ereignisse dargestellt wird.

Eine Alternative ist der Dot-Plot, bei dem zwei Fluoreszenzintensitäten gegeneinander aufgetragen werden und jeder Punkt für ein Ereignis steht.

Eine Abwandlung davon ist der sogenannte Dichteplot, der bei großen Überlagerungen der Punkte die Verteilung wiedergibt. Ähnlich ist auch der Konturplot, bei dem Punkte gleicher Dichte mit einer Höhenlinien-artigen Darstellung zusammengefasst werden. Bei einer isometrischen Darstellung kommt eine dritte Ebene hinzu, die die Anzahl der Ereignisse zeigt.

Will man die Zellen nach der FACS-Messung für eine weitere Analyse verwenden, bietet sich ein Cellsorter an. Dabei wird der elektrisch leitfähige Flüssigkeitsstrom durch die Vibration der Messkanüle aufgebrochen. Dabei werden die Fluoreszenz-markierten Zellen entweder positiv oder negativ geladen und durch Ablenkplatten in spezielle Behälter geleitet. Ungeladene Zellen gehen in das Abflusssystem (32).

3.2 Studienpopulation:

Es wurden 1003 Patienten mit symptomatischer koronarer Herzkrankheit (KHK) ausgewählt. Dieses Kollektiv gliederte sich in 518 Patienten mit stabiler Angina pectoris (SAP) und 485 Patienten mit einem Akuten Koronarsyndrom (ACS):

Stabile Angina pectoris (SAP) beschreibt belastungsabhängige Beschwerden konstanten Ausmaßes ohne Zunahme.
Das akute Koronarsyndrom (ACS) gliedert sich auf in Troponin-positives ACS, STEMI und NSTEMI.
Das ACS beschreibt pectanginöse Beschwerden über mindestens 20 Minuten in Ruhe oder bei minimaler körperlicher Belastung mit Zunahme (Crescendo-Angina) oder wiederkehrenden Episoden.
Das EKG zeigt mindestens eine der folgenden Veränderungen: Neu aufgetretene ST-Senkung von mindestens 0,1 mV oder negatives T von mindestens 0,3 mV in zwei oder mehr benachbarten Standardableitungen. Dabei können CK und Troponin-I erhöht sein oder im Normbereich liegen.
Unter dem ST-Hebungs-Infarkt (STEMI) versteht man pectanginöse Beschwerden über mindestens 20 Minuten mit ST-Hebungen von mindestens 0.1 mV in zwei oder mehr Ableitungen im EKG sowie laborchemisch einer zweifachen CK-Erhöhung bezogen auf den Normbereich und signifikanten CK-MB- und/oder Troponin-I-Erhöhungen.
Der Nicht-ST-Hebungs-Infarkt (NSTEMI) beschreibt pectanginöse Beschwerden über mindestens 20 Minuten ohne ST-Hebungen im EKG sowie einer zweifachen CK-Erhöhung bezogen auf den Normbereich und signifikanten CK-MB- und/oder Troponin-I-Erhöhungen.
Als nicht auswertbares EKG wurden gemäß Hamm et al. Schenkelblockbilder eingestuft.
Als Kontrollgruppe dienten 60 Individuen, bestehend aus 40 Laborangestellten (24 Männer und 16 Frauen mit einem Alter von 31,1 Jahren ± 10,2 Jahren) ohne Medikation und kardiovaskulären Risikofaktoren außer 5 Rauchern. Diese Gruppe wurde bezüglich des KHK-Ausschlusses keiner Herzkatheteruntersuchung unterzogen. Als weitere Kontrolle dienten 20 Patienten, bei denen mittels Herzkatheteruntersuchung eine KHK ausgeschlossen worden war. Es handelte sich um 12 Männer und 8 Frauen mit einem Alter von 61,9 Jahren ± 12,3 Jahren, die bezüglich kardiovaskulärer Risikofaktoren 9x eine arterielle Hypertonie, 3x einen Diabetes Mellitus, zweimal eine Hypercholesterinämie, 3x Nikotinabusus und zweimal eine

positive Familienanamnese besaßen. Bei der Medikation wurde in 5 Fällen ein ß-Blocker, in zwei Fällen ein ACE-Hemmer, in drei Fällen ASS und in zwei Fällen ein Statin eingenommen.
Ausschlusskriterien für die Studie waren Alter unter 18 Jahren, Ablehnung der Teilnahme an der Studie und falsch-positive Erhöhung von CK oder CK-MB.
119 Patienten wurden von der Studie ausgeschlossen, davon verweigerten 78 ihre Zustimmung zur Teilnahme an der Studie, die übrigen 41 wurden aufgrund anderer Kriterien ausgeschlossen. Unsere Arbeitshypothese bestand darin, dass beim Akuten Koronarsyndrom die Expression von GPVI auf Thrombozyten erhöht ist. Dies wurde prospektiv durch die Validierung eines Cut-Off-Werts vorgenommen, der basierend auf einer vorausgegangenen Pilotstudie mit 367 Patienten (7) berechnet worden war.
Es wurden Messungen mittels Durchflusszytometrie durchgeführt, das kardiovaskuläre Risikoprofil der Patienten, die Prämedikation und Laborwerte des stationären Aufenthalts ermittelt. Außerdem wurden 30 Tage und 3 Monate nach der Herzkatheteruntersuchung klinische Endpunkte wie beispielsweise Herzinfarkt oder Schlaganfall bei 94,2 % der Patienten telephonisch abgefragt.

3.3 Probengewinnung und -verarbeitung:

Nach schriftlicher Einverständniserklärung wurde das Blut der Patienten zu Beginn der Herkatheteruntersuchung aus der Schleuse in der rechten Arteria femoralis entnommen und in eine 8,5 ml-CPDA-Monovette (gelb), eine 9 ml-EDTA-Monovette (rot), eine 9 ml Ammoniumheparinat-Monovette (blau) und eine 7,5 ml-Serum-Monovette (weiß) gefüllt und dann nach folgendem Pipettierschema aufbereitet:
Aus der 8,5 ml-CPDA-Monovette (gelb) wurden 10 µl Vollblut mit 490 µl PBS versetzt um ein Verklumpen zu verhindern. Aus diesen 500 µl wurden jeweils 35 µl für die GPVI- und für die CD62P-Messung in FACS-Röhrchen pipettiert.

Anschließend wurde jeweils 5 µl des anti-GPVI bzw. anti-CD62P-Antikörpers hinzugegeben und beide Röhrchen noch mit 5 µl des anti-CD42b-Antikörpers versetzt. Abschließend wurde in beide Röhrchen 5 µl PBS gegeben. Die Konzentration des schließlich 1:200 verdünnten anti-GPVI betrug 5µg/ml.
Der Ansatz von 50 µl wurde für 25 Minuten im Dunkeln bei Zimmertemperatur inkubiert. Danach wurde mit 300 µl 0,5% PFA abgestoppt und der Ansatz bei 5℃ bis zur FACS-Messung aufbewahrt.
Eine zusammenfassende Darstellung des Pipettierprotokolls zeigt Tabelle 1:

Pipettierschema zur Bestimmung der GPVI-Expression auf Thrombozyten:

10 µl CPDA-Plasma + 490 µl PBS
davon 35 µl + 5 µl anti-CD42b-PE
+ 5 µl anti-GPVI-FITC
+ 5 µl PBS

Pipettierschema zur Bestimmung der P-Selectin-Expression auf Thrombozyten:

10 µl CPDA-Plasma + 490 µl PBS
davon 35 µl + 5 µl anti-CD42b-PE
+ 5 µl anti-CD62P-PE
+ 5 µl PBS

Die 4 Monovetten wurden bei 20℃ und 3000 rpm für 1 0 Minuten zentrifugiert und dann der Überstand auf Eppendorf-Cups verteilt um im Plasma bzw. Serum gelöstes GPVI zu einem späteren Zeitpunkt zu analysieren. Diese Proben wurden bis zur weiteren Analyse bei –20℃ gelagert.
Zusätzlich wurden zwei 2,5 ml-EDTA-Monovetten (rot) bei –80℃ aufbewahrt um gegebenenfalls Polymorphismen bestimmen zu können.

3.4 FACS-Messung:

Die im FACS-Röhrchen befindliche Probe wurde in die Messvorrichtung des FACS-Geräts gebracht und die Messung bei mittlerer Flussrate gestartet, was ungefähr 300 Zellen pro Sekunde entsprach. Der Vorwärts-Scatter wurde auf E00 eingestellt und der Seitwärts-Scatter auf 261 kalibriert.
Thrombozyten wurden zunächst als eine charakteristische Population im Vorwärts- und Seitwärts-Scatter identifiziert und mittels eines „Gates“ markiert. Zusätzlich wurden ausschließlich CD42b-positive Zellen gemessen. Damit lag eine Positivkontrolle vor, um nur Thrombozyten durchflusszytometrisch zu erfassen. Anschließend wurde die mittlere Fluoreszenzintensität durch Zwei-Farben-Messung mittels Laser ermittelt.
Es wurde dabei einerseits die mittlere Fluoreszenzintensität GPVI-positiver Zellen gegenüber CD42b-positiven Zellen ermittelt und andererseits die CD62P-FITC-positiver Zellen gegenüber CD42b-positiven Zellen. Die Messung wurde jeweils nach 10.000 erfassten Zellen beendet. Die Ergebnisse wurden logarithmisch dargestellt und mit CELLQuest-Software aufgezeichnet und analysiert.

3.5 Patiententabelle:

Es wurde eine kontinuierliche Tabelle erstellt, die folgende Daten erfasste: Fortlaufende Patientennummer innerhalb der Studie, Name und Vorname, Geburtsdatum und Alter zum Zeitpunkt der Datenerfassung.
An initialen Laborwerten am Tag der stationären Aufnahme wurden erfasst: C-reaktives Protein (CRP), Kreatinkinase (CK), Kreatinkinase-MB (CK-MB) und Troponin-I. Im Verlauf des weiteren Patientenaufenthalts wurden zusätzlich die folgenden Laborparameter ausgewertet: Maximales CRP, maximale CK, maximale CK-MB, Quotient aus CK-MB und CK, maximales Troponin-I,

Kreatinin, Cholesterin, Triglyceride, LDL, HDL, INR, Thrombozyten, GOT, GPT, Bilirubin gesamt, AP, HbA1c.

Es wurden die FACS-Ergebnisse in Form von Mean- und Median-Werten von GPVI, CD62P und CD42b in die Tabelle eingetragen.

Ferner wurden folgende epidemiologischen Daten erhoben:

An kardiovaskulären Risikofaktoren: Arterielle Hypertonie, Diabetes Mellitus, Hyperlipoproteinämie, Nikotinabusus, Positive Familienanamnese.

Die Medikamente, welche die Patienten bei stationärer Aufnahme einnahmen: Vitamin K-Antagonisten, Clopidogrel, Aspirin, ß-Blocker, AT1-Antagonisten, ACE-Hemmer, Statine.

Bezüglich der Medikamente, die die Patienten bei Entlassung einnahmen: Vitamin K-Antagonisten, Clopidogrel, Aspirin, ß-Blocker, AT1-Antagonisten, ACE-Hemmer, Statine.

Einschränkung der linksventrikulären Funktion anhand der prozentualen Ejektionsfraktion, Anzahl der erkrankten Koronargefäße sowie die grundlegende Diagnose stabile Angina pectoris, Troponin-positives ACS oder STEMI/ NSTEMI. Das klinische Outcome wurde mittels telefonischer Abfrage innerhalb von 30 Tagen und 3 Monaten nach der Herzkatheteruntersuchung evaluiert. Dabei wurden folgende klinischen Endpunkte erfasst: Myokardinfarkt, Apoplex, Tod, kardiovaskulär bedingter Tod, erneute Herzkatheteruntersuchung, Stentthrombose, erneute Hospitalisierung.

Ferner wurden die folgenden Daten dokumentiert: Einnahme von Clopidogrel, Einnahme von Aspirin, Einnahme von Vitamin K-Antagonisten, Einnahme von ACE- Hemmern, Einnahme von AT1- Antagonisten, Einnahme von β- Blockern, Einnahme von Calciumantagonisten, Einnahme von Diuretika, Einnahme von Statinen, Einnahme von Nitraten, Insulinpflichtigkeit, Datum des klinischen Endpunkts sofern vorhanden, Datum des Telefonanrufs.

3.6 Statistik:

Es wurden paarweise Vergleiche zwischen stabiler Angina pectoris und Troponin-positivem ACS, STEMI bzw. NSTEMI durchgeführt. Dazu wurden angemessene nicht-parametrische Tests wie der Kruskall-Wallis-Test angewendet. Für Korrekturen bei Mehrfachtests wurde die Bonferroni-Holm-Korrektur verwendet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen. Vergleiche zwischen GPVI und klinischen Parametern wurden mittels der Spearman-Korrelation vorgenommen.

Eine Anpassung bei möglichen Einflussfaktoren wurde mittels multifaktorieller Kovarianz-Analyse für den dekadischen Logarithmus von GPVI durchgeführt. Der Zusammenhang zwischen nachkorrigiertem GPVI und konventionellen Laborwerten wurde für alle Patienten mittels der logistischen Regressionsanalyse berechnet. Um das individuelle Risiko für ACS aus den GPVI-Werten vorherzusagen, wurde die Receiver Operating Characteristic (ROC)-Kurve erstellt.

Ein log-rank-Test (Mantel-Cox) wurde zur Berechnung des Zusammenhangs zwischen Überlebenszeit und verschiedenen Einflussgrößen herangezogen. Die Kaplan-Meier-Überlebens-kurve stellte das ereignisfreie Überleben der Patienten dar.

Alle statistischen Analysen wurden mit dem Statistikprogramm SPSS Version 13 erhoben.

4 Ergebnisse

Es wurde konsekutiv die Oberflächenexpression des Kollagenrezeptors GPVI auf Thrombozyten an 1003 Patienten mit symptomatischer koronarer Herzerkrankung (KHK) untersucht. Bei allen Patienten wurde die Diagnose und die Schwere der Erkrankung mittels Herzkatheteruntersuchung verifiziert. Die demographischen Details werden in Tabelle 2 aufgeführt.

Die Oberflächenexpression von GPVI war beim akuten Koronarsyndrom (ACS) im Vergleich zu stabiler Angina pectoris (SAP) sowie den Kontrollpersonen (gestrichelte Linie) signifikant erhöht, wie in Abb. 5 beschrieben:

ACS (mittlere Fluoreszenzintensität±Standardabweichung): 19,8±5,9; SAP:18,7±8,5; p=0,01. In der Subgruppenanalyse wiesen Patienten mit akutem Myokardinfarkt und Troponin-positivem ACS die höchsten GPVI-Werte auf im Vergleich zu Patienten mit SAP, während untereinander keine signifikanten Unterschiede bestanden.

Um zu beurteilen, ob die GPVI-Level mit konventionellen Laborwerten für Myokardischämie korrelieren, wurde die Spearman-Korrelation herangezogen. Es zeigte sich, dass die GPVI-Werte zum Zeitpunkt der Herz-katheteruntersuchung nicht mit dem initialen Troponin-I und der initialen CK korrelierten (initiales Troponin-I: r=0,056; p=0,149; initiale CK: r=0,026; p=0,481).

Dagegen korrelierten die GPVI-Werte mit dem maximalen Troponin-I und der maximalen CK, die im Verlauf des weiteren stationären Patientenaufenthalts ermittelt wurden (maximales Troponin-I: r =0,107; p=0,002; maximale CK: r=0,089; p=0,009). Keine Korrelation bestand zwischen GPVI und CRP. Um zu überprüfen ob GPVI für ein ACS unabhängig von konventionellen Laborwerten prädiktiv ist, führten wir eine logistische Regressionsanalyse durch, die Troponin-I, CK, CK-MB und CRP zum Zeitpunkt der initialen Messung bei Krankenhausaufnahme beinhaltete (Tabelle 3). Es zeigte sich, dass GPVI mit einem akuten Koronarsyndrom unabhängig von konventionellen Laborwerten assoziiert ist.

Der dekadische initiale Logarithmus von GPVI (Tabelle 4) wurde aufgrund möglicher Einflussfaktoren wie Medikation und kardiovaskulären Risikofaktoren korrigiert. Es zeigten sich keine Signifikanzen bei Prämedikation, kardiovaskulären Risikofaktoren und konventionellen Laborwerten.

Um das individuelle Risiko für ein ACS aus den GPVI-Werten vorherzusagen, wurde eine Receiver Operating Characteristic (ROC)-Kurve berechnet. Es wurde ein Cut-off-Wert von 18,6 MFI für ein ACS bestimmt.

Wie Abbildung 6 zeigt, besaßen Patienten mit einem GPVI-Wert über 18,6 ein 1,39fach erhöhtes relatives Risiko, ein ACS zu entwickeln (95%-Konfidenzintervall: 1,1 bis 1,8). Bei erhöhten Troponin- und CK-MB-Werten und zusätzlich einem erhöhten GPVI-Wert ergab sich ein 2,53fach erhöhtes relatives Risiko für ein ACS.

Die Details der klinischen Prognose nach 30 Tagen bzw. 3 Monaten sind in den Abbildungen 7 und 8 dargestellt. Angesichts der geringen Anzahl an Ereignissen ergab sich keine statistische Signifikanz zwischen ACS-Patienten mit einem GPVI über 18,6 und Patienten mit stabiler Angina pectoris bzw. GPVI-Werten von kleiner als 18,6.

Als Trend scheint das Ereignis-freie Überleben nach 30 Tagen in der Kaplan-Meier-Überlebenskurve (Abb.9) bei Patienten mit erhöhtem GPVI im Vergleich zu den Patienten mit niedrigerem GPVI zu liegen und damit eine schlechtere Prognose zu haben.

	Gesamt: **SAP + ACS (n=1003)**	**SAP (n=518)**	**ACS (n=485)**
Durchschnittliches Alter in Jahren ± Standardabweichung	66,4 ±12,9	67,2 ±10,9	65,6 ±14,7
Anzahl der Patienten nach Geschlecht (in %)			
- Männlich	729 (72,7)	396 (76,4)	333 (68,7)
- Weiblich	274 (27,3)	122 (23,6)	152 (31,3)

	Gesamt: **SAP + ACS (n=1003)**	**SAP (n=518)**	**ACS (n=485)**
Häufigkeit der Kardiovaskulären Risikofaktoren (in %)			
- Arterielle Hypertonie	735 (73,3)	393 (75,9)	342 (70,5)
- Hyperlipidämie	553 (55,1)	326 (62,9)	227 (46,8)
- Diabetes mellitus	328 (32,7)	171 (33,0)	157 (32,4)
- Familiäre Disposition	194 (19,3)	107 (20,7)	87 (17,9)
- Nikotinabusus	354 (35,3)	176 (34,0)	178 (36,7)
KHK (in %)			
- 1-Gefäß-KHK	308 (30,7)	135 (26,0)	173 (35,7)
- 2-Gefäß-KHK	305 (30,4)	164 (31,7)	141 (29,1)
- 3-Gefäß-KHK	390 (38,9)	219 (42,3)	171 (35,2)
Linksventrikuläre Ejektionsfraktion nach Anzahl (in %)			
- normal	552 (55,0)	303 (58,5)	249 (51,3)
- leichtgradig eingeschränkt	206 (20,5)	106 (20,5)	100 (20,6)
- mittelgradig eingeschränkt	155 (15,5)	68 (13,1)	87 (18,0)
- schwer eingeschränkt	90 (9,0)	41 (7,9)	49 (10,1)
Häufigkeit der Medikation (in %)			
- ACE-Hemmer	311 (31,0)	197 (38,0)	114 (23,5)
- AT1-Antagonisten	59 (5,9)	47 (9,1)	12 (2,5)
- ß-Blocker	478 (47,7)	287 (55,4)	191 (39,4)
- Statine	384 (38,3)	251 (48,5)	133 (27,4)
- Aspirin	493 (49,2)	298 (57,5)	195 (40,2)
- Clopidogrel	94 (9,4)	62 (26,3)	32 (6,6)
- Vitamin K-Antagonisten	77 (7,7)	42 (8,1)	35 (7,2)

Tabelle 2: Demographische Aufgliederung des Patientenkollektivs

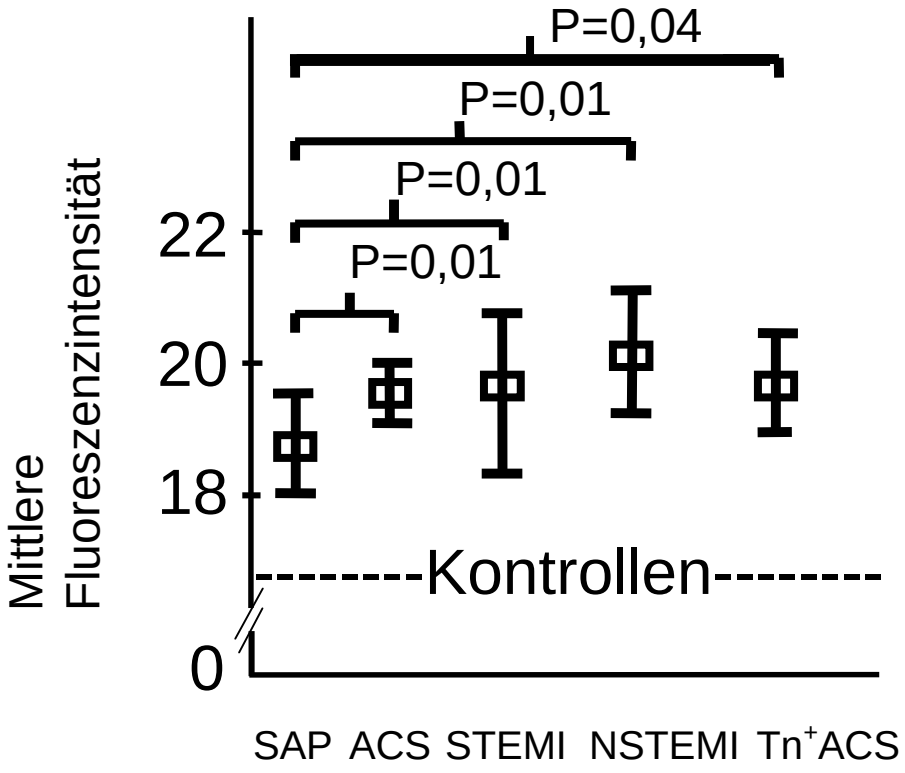


Abb. 5: Erhöhte GPVI-Expression auf Thrombozyten im ACS

Darstellung als 95%-Konfidenzintervalle. ACS aufgegliedert nach Untergruppen: Es ergeben sich jeweils signifikante Unterschiede gegenüber SAP. Die höchsten GPVI-Werte bei NSTEMI sind nicht signifikant gegenüber STEMI und Tn^+-ACS

	Regressionskoeffizient B	P-Wert
Initiales GPVI (MFI)	0,095	0,041
Initiales Troponin-I (ng/ml)	0,053	0,100
Initiale Kreatinkinase (U/l)	-0,001	0,194
Initiale Kreatinkinase-MB (U/l)	0,009	0,166
Initiales C-reaktives Protein (mg/dl)	-0,004	0,927

Tabelle 3: Die Assoziation von GPVI mit einem ACS ist unabhängig von konventionellen Laborwerten wieTroponin, CK und CRP

Dies wurde mittels der logistischen Regressionsanalyse ermittelt

	Faktor	P-Wert
Medikation	ß-Blocker	0,285
	ACE-Hemmer	0,735
	AT1-Antagonisten	0,808
	Statine	0,693
	Aspirin	0,657
	Clopidogrel	0,125
	Vitamin K-Antagonisten	0,526
Kardiovaskuläre Risikofaktoren	Arterielle Hypertonie	0,857
	Nikotinabusus	0,522
	Familiäre Disposition	0,807
	Diabetes mellitus	0,784
	Hyperlipidämie	0,773

Tabelle 4: Kein Zusammenhang der Einflussfaktoren auf die GPVI-Expression beim ACS

Berechnet wurde die multifaktorielle Analyse des dekadischen Logarithmus von GPVI

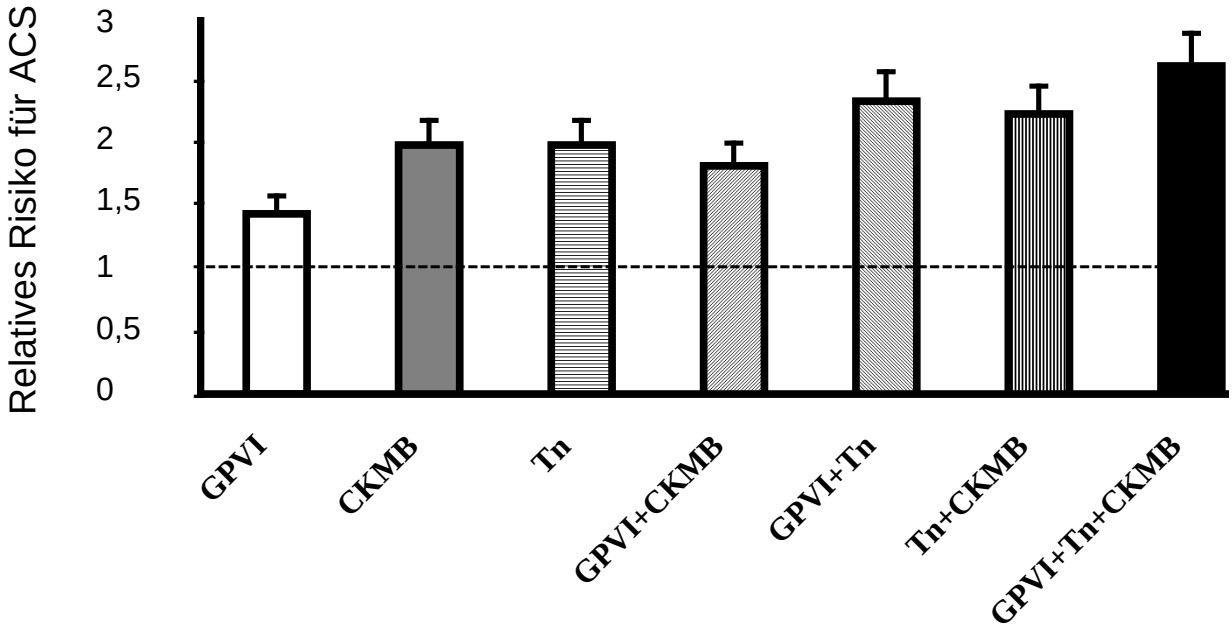


Abb. 6: Bis zu 2,53fach erhöhtes relatives Risiko für ein ACS bei der Kombination von verschiedenen Biomarkern

Gezeigt sind die gemessenen Biomarker bei Erhöhung über den Normbereich einzeln sowie kombiniert für die Risiko-Prädiktion eines ACS. Sind mehrere Biomarker gleichzeitig erhöht, ist das relative Risiko, ein ACS zu entwickeln, größer.
Gestrichelte Linie: Kein Biomarker

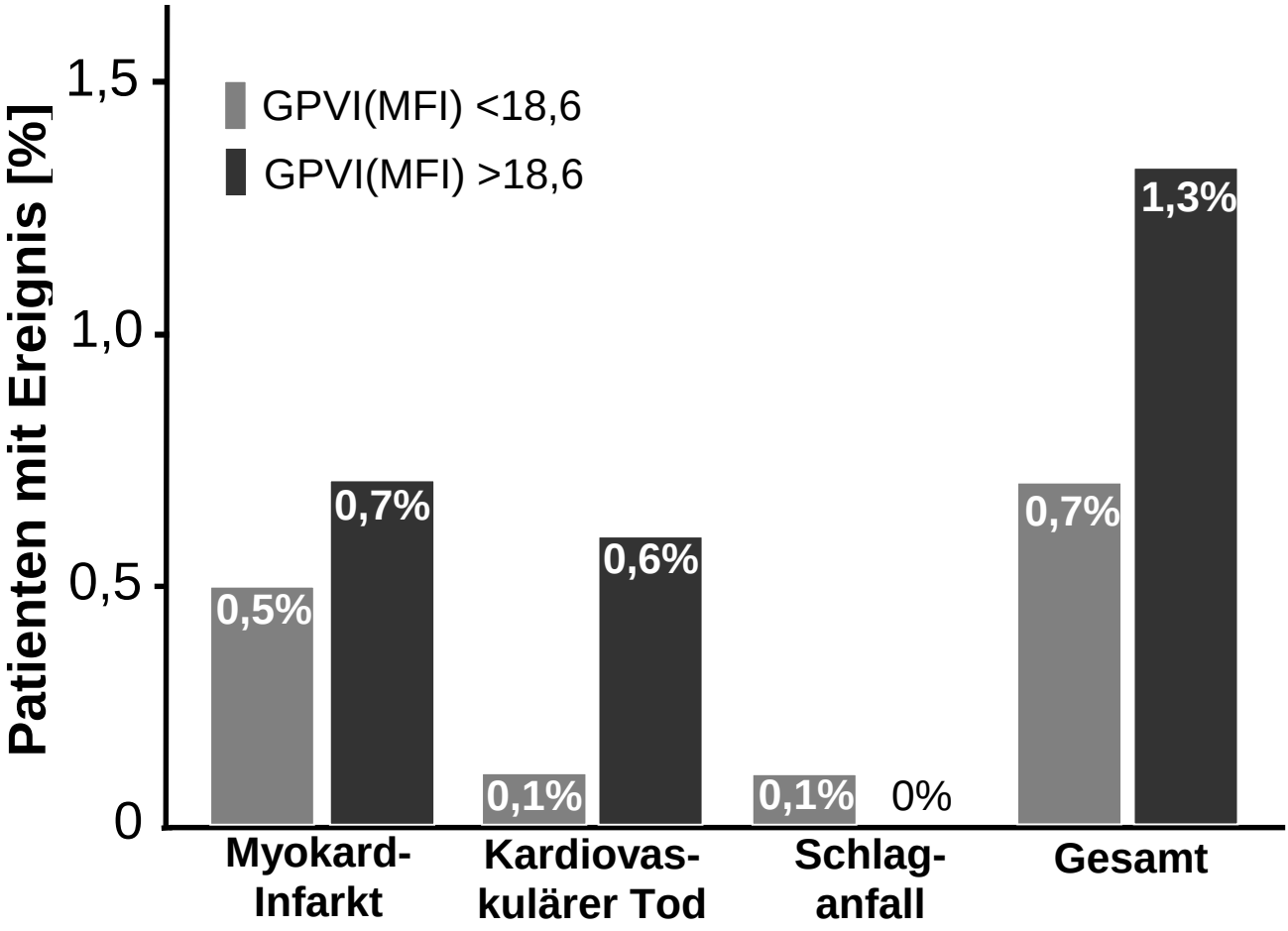


Abb.7: Klinische Ereignisse nach 30 Tagen
Gezeigt sind jeweils die Ereignisse bei Patienten mit erhöhten bzw. nicht erhöhten GPVI-Werten

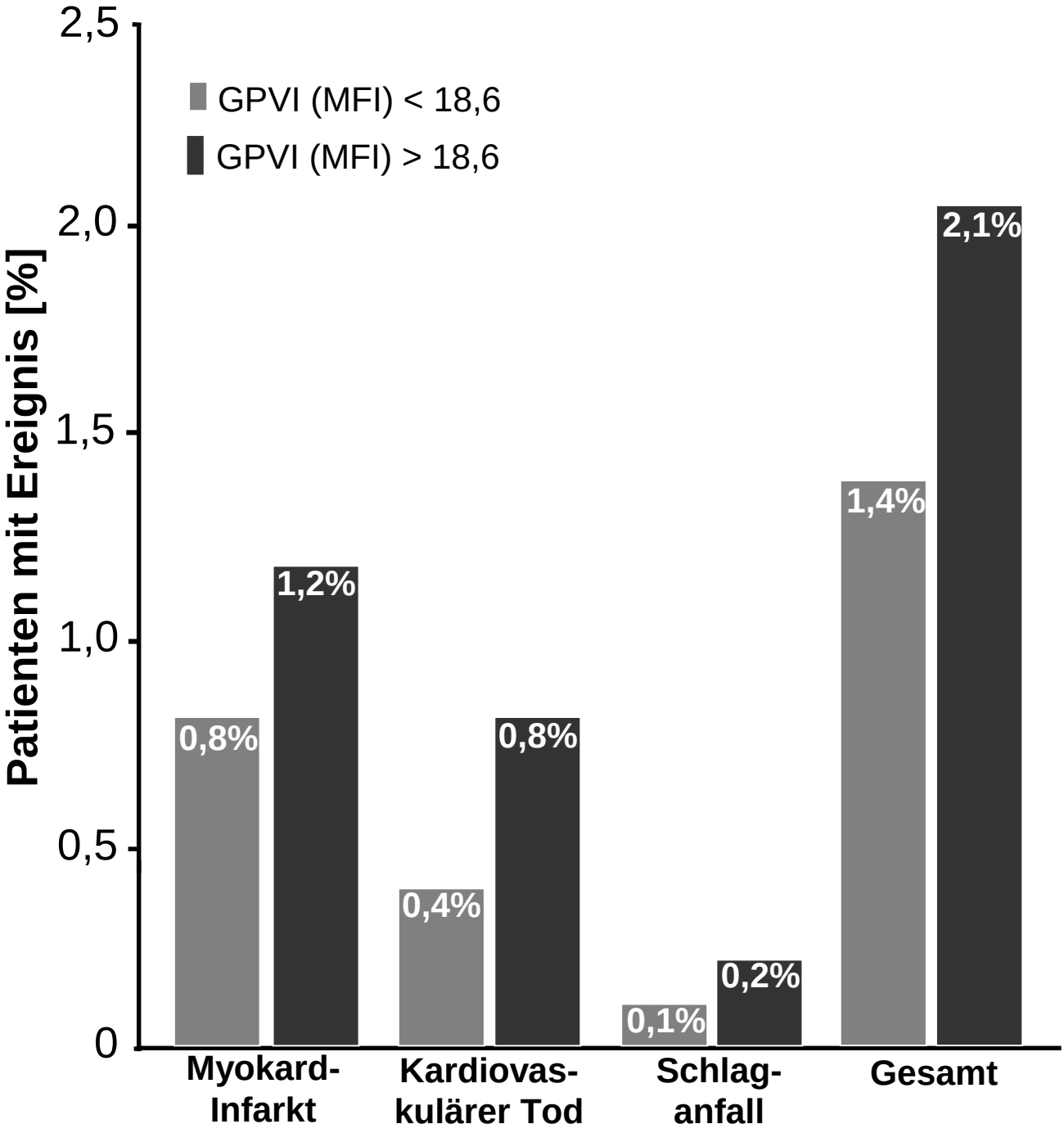
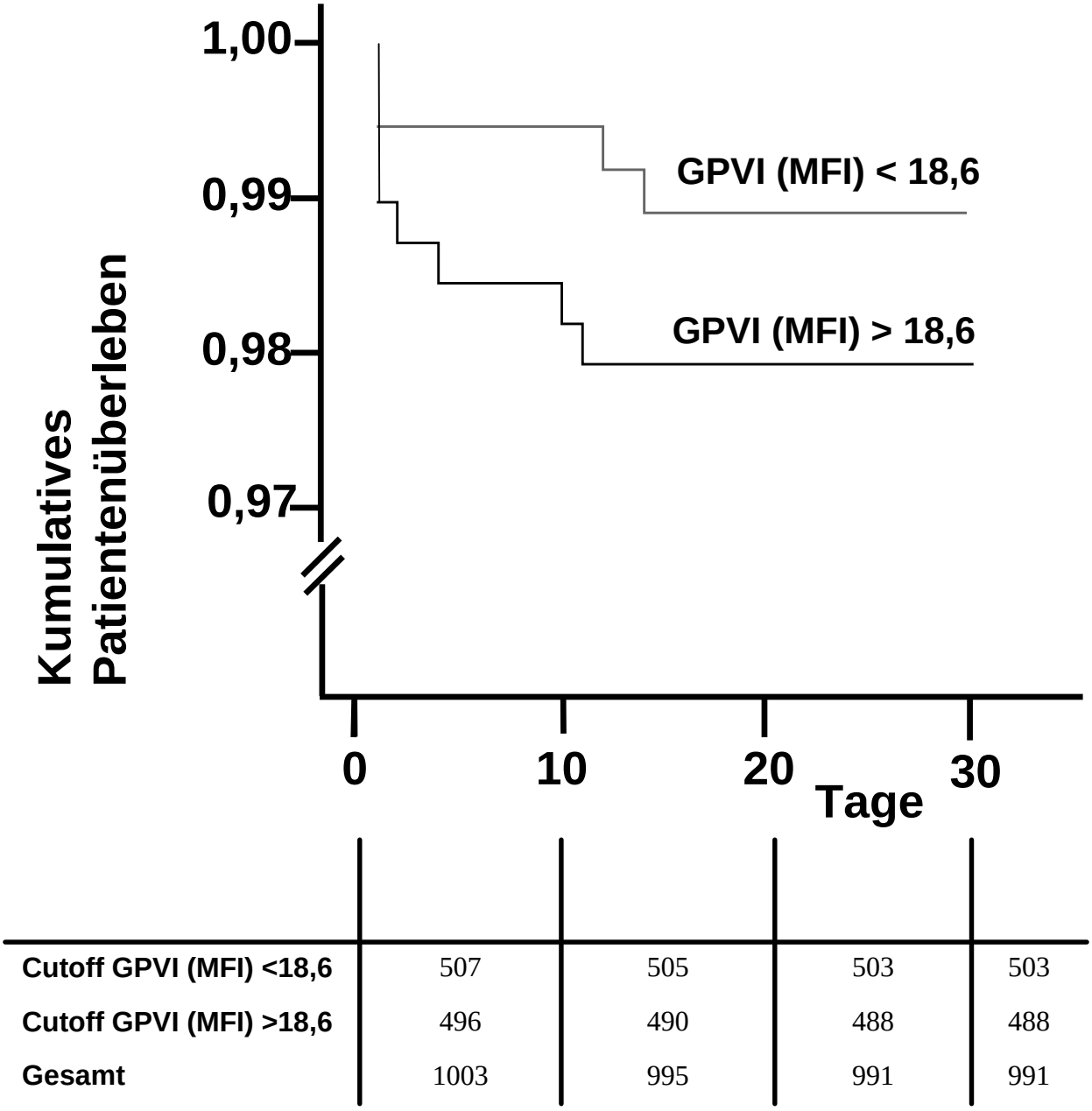


Abb. 8: Klinische Ereignisse nach 3 Monaten
Gezeigt sind jeweils die Ereignisse bei Patienten mit erhöhten bzw. nicht erhöhten GPVI-Werten



Cutoff GPVI (MFI) <18,6	507	505	503	503
Cutoff GPVI (MFI) >18,6	496	490	488	488
Gesamt	1003	995	991	991

Abb. 9: Kaplan-Meier Überlebenskurve
Anzahl der Patienten mit einem GPVI-Wert von <18,6 bzw. >18,6 innerhalb von 30 Tagen nach Entlassung

5 Diskussion

5.1 GPVI als vielversprechender thrombozytärer Marker

Die vorliegende Arbeit ist eine prospektive Studie, basierend auf Ergebnissen einer Pilotstudie (7), in die 1003 konsekutive Patienten einbezogen wurden, die an einer koronaren Herzkrankheit (KHK) litten, die sich als stabile Angina pectoris (SAP) oder akutes Koronarsyndrom (ACS) äußerte. Es zeigte sich, dass die GPVI-Expression beim ACS signifikant gegenüber SAP erhöht war. Die GPVI-Expression auf Thrombozyten zum Zeitpunkt der Herzkatheteruntersuchung war mit ACS assoziiert, unabhängig von Markern für Myokardischämie wie Troponin und CK. Erhöhte GPVI-Level bei stationärer Patientenaufnahme waren mit ACS und akutem Myokardinfarkt assoziiert. Die Ergebnisse der aktuellen Arbeit legen nahe, dass GPVI ein früher Biomarker für die Identifizierung von Patienten mit ACS sein kann.

Da die GPVI-Werte von Patienten mit ACS bei Aufnahme bereits erhöht sind, während die Laborwerte für Myokardischämie bzw. –nekrose noch im Normbereich liegen können, kann darüber spekuliert werden ob GPVI als ein Plättchen-spezifischer Thrombosemarker dabei helfen kann, Risikopatienten zu identifizieren, bevor sich ein koronares Ereignis entwickelt.

Die eingehende Untersuchung von Patienten, die sich in der Notaufnahme mit retrosternalem Druckgefühl oder anderen Symptomen vorstellen, die die Diagnose ACS nahe legen, ist schwierig. Gerade diese Patienten profitieren aber erheblich von einer frühzeitigen Diagnosestellung und Therapie. Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass die Bestimmung von Entzündungswerten wie CRP oder CD40L und Herzinsuffizienzmarkern wie BNP schon vor der Erhöhung von Nekrosemarkern wie Troponin und Kreatinkinase eine frühe Einsicht in das Risikoprofil des Patienten gewähren, um so Patienten mit einem erhöhten Risiko für ein bevorstehendes kardiales Ereignis ausfindig zu machen.

Mit einem Multimarker-Panel lässt sich durch die Kombination von GPVI mit weiteren Biomarkern die relative Risiko-Prädiktion für ein ACS im Vergleich zu einzelnen Biomarkern deutlich verbessern (bis zu 2,5 fach).

Im Follow-up nach 30 Tagen und 3 Monaten war bei Patienten mit initial erhöhtem GPVI im Trend ein schlechteres klinisches Outcome vorhanden als bei Patienten mit initial erniedrigtem GPVI (MFI<18,6).

Zukünftige Studien können zeigen, dass GPVI nicht nur als prädiktiver Marker für ein ACS anzusehen ist, sondern auch prognostische Aussagen bezüglich weiterer klinischer Ereignisse der Patienten zulässt.

Unsere Daten untermauern die Tatsache, dass die Plättchen-Aktivierung beim ACS eine zentrale Rolle spielt und entscheidend für den Krankheitsverlauf ist. Darüber hinaus lässt sich feststellen, dass ein Plättchen-spezifischer Aktivierungs-Marker, der eine wichtige pathophysiologische Rolle bei ACS-Patienten spielt, ein vielversprechender Anwärter auf einen Biomarker bei der Risikostratifizierung von ACS-Patienten sein könnte.

Durch die frühzeitige Bestimmung eines erhöhten GPVI-Wertes wäre man zukünftig in der Lage, einen prothrombotischen Status bei Patienten, die ein ACS zu entwickeln drohen, zu erkennen und sofort geeignete Maßnahmen wie z.B. eine Herzkatheteruntersuchung oder eine antithrombotische Therapie einzuleiten.

5.2 Einflussfaktoren auf die GPVI-Expression

GPVI ist der wichtigste Kollagenrezeptor, der Plättchen-Adhäsion und -Aktivierung an fibrillärem Kollagen vermittelt (38,34,33). Die GPVI-Expression wird durch das megakaryozytäre System eingeschränkt und ist folglich Plättchen-spezifisch (38).

Eingeschränkte Daten sind verfügbar, die dokumentieren, dass sich die GPVI-Expression auf zirkulierenden Thrombozyten beim Menschen verändert. Zuvor wurde gezeigt, dass GPVI bei Diabetes Typ II verändert ist (10). Andere Arbeitsgruppen fanden heraus, dass GPVI bei Patienten mit Myokardinfarkt erhöht ist (51).

Genetische Einflussfaktoren scheinen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von koronaren Thrombosen und Myokardinfarkten zu spielen, wie von einer Studie über GPVI-Polymorphismen gezeigt wurde (36). Dabei besitzen Patienten mit bestimmten Polymorphismen des GPVI-Rezeptors ein bis zu zehnfach erhöhtes Risiko für einen Myokardinfarkt.

Auch sind Polymorphismen in der Gensequenz von ß-Fibrinogen mit einem höheren kardiovaskulären Risiko assoziiert. Es wurde gezeigt, dass Polymorphismen des $\alpha_2\beta_1$-Rezeptors mit einer größeren Kollagen-Rezeptordichte korrelieren und somit ein erhöhtes Risiko für einen Schlaganfall oder einen Myokardinfarkt besteht (36).

In der vorliegenden Studie wurde das Patientenkollektiv nicht bezüglich GPVI-Polymorphismen untersucht, aber sie könnten signifikant zu dem Risiko für ein koronares Ereignis unabhängig von der GPVI-Expression beitragen.

Patienten mit einer verminderten GPVI-Expression weisen eine etwas verlängerte Blutungszeit und eine geringere Kollagen-vermittelte Adhäsion und Aggregation auf. In vitro sind gegen GPVI gerichtete Antikörper in der Lage, die Plättchen-Aktivierung zu induzieren oder zu hemmen, je nach Angriffspunkt.

Das fab-Fragment eines monoklonalen Antikörpers konnte die Plättchen-Aktivierung, -Aggregation und das Thrombuswachstum durch GPVI-Blockade verhindern.

Bei Mäusen führt ein anderer monoklonaler Antikörper zu einer signifikanten Dysregulation der primären Hämostase mit einem erhöhten Blutungsrisiko wenn die Antikörper-Therapie in Verbindung mit Aspirin oder einer verringerten $\alpha_2\beta_1$-Funktion abläuft.

Ein anderer Ansatz bei der In-Vitro-Hemmung der Kollagen-induzierten Thrombusbildung besteht in der Unterbindung der GPVI-Funktion durch lösliche GPVI-Dimere, die Bindungsstellen blockieren (34).

Dieses Verfahren wurde in ein In-Vivo-Modell übertragen, bei dem ein lösliches, dimeres GPVI-Fusionsprotein lokal an Kaninchen-Karotiden mit Endothel-läsionen gebracht wurde (9).

Das lösliche Fusionsprotein bindet an das Kollagen, das infolge der Endothelläsion gegenüber dem Blutstrom freigelegt wird.

Dabei wird die Hämostase systemisch nicht beeinträchtigt. Anhand dieses Modells wurde ein System von In-Vivo-Plaque-Imaging entwickelt, das es erlaubt, die Anlagerung des Fusionsproteins an Kollagen sichtbar zu machen (14).

Man hat nun die Stellen identifiziert, die mit einer lokalen Anti-GPVI-Therapie behandelt werden könnten ohne dabei systemische Nebenwirkungen wie ein erhöhtes Blutungsrisiko in Kauf nehmen zu müssen. Dies wäre eine Therapiealternative für Patienten mit Kontraindikationen für Clopidogrel oder Marcumar.

6 Zusammenfassung

Es wurde in einem prospektiven Studiendesign mit 1003 Patienten mit symptomatischer koronarer Herzerkrankung gezeigt, dass die Expression des Plättchen-Kollagen-Rezeptors GPVI bei Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom (ACS) im Vergleich zu Patienten mit stabiler Angina pectoris signifikant erhöht ist. Die Expressions-Level von GPVI bei stationärer Patientenaufnahme sind prädiktiv für ein ACS unabhängig von Laborwerten für eine Myokardischämie wie Troponin-I, CK-MB oder CK.

Die Bestimmung des Plättchen-spezifischen Thrombosemarkers GPVI könnte einen vielversprechenden frühen Biomarker für ein ACS darstellen, bevor eine Myokardischämie offensichtlich wird.

Im Follow-up zeigte sich als Trend eine schlechtere klinische Prognose bei Patienten mit erhöhten GPVI-Werten.

Zukünftige Studien sollten das Prädiktions-Potential von GPVI untermauern und auch hinsichtlich der prognostischen Aussagekraft weiter untersuchen.

Darüberhinaus stellt GPVI einen interessanten therapeutischen Angriffspunkt dar und könnte das Ziel von speziellen Antikörpern werden, die eine Blockade der prothrombotischen Kaskade bewirken könnten.

7 Literaturverzeichnis

1. Andre, P., Nannizzi-Alaimo, L., Prasad, S.K., Phillips, D.R.
Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease.
Circulation 106 (2002) 896-899

2. Andre, P., Prasad, K.S., Denis, C.V., He, M., Papalia, J.M., Hynes, R.O., Phillips, D.R., Wagner, D.D.
CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin-dependent mechanism.
Nat. Med. 8 (2002) 247-252

3. Andrews, R.K., Lopez, J.A., Berndt, M.C.
Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation.
Int. J. Biochem. Cell. Biol. 29 (1997) 91-105

4. Andrews, R.K., Suzuki-Inoue, K., Shen, Y., Tulasne, D., Watson, S.P., Berndt, M.C.
Interaction of calmodulin with the cytoplasmic domain of platelet GP VI.
Blood 99 (2002) 4219-4221

5. Asselin, J., Gibbins, J.M., Achison, M., Lee, Y.H., Morton, L.F., Farndale, R.W., Barnes, M.J., Watson, S.P.
A collagen-like peptide stimulates tyrosine phosphorylation of syk and phospholipase C gamma2 in platelets independent of the integrin alpha2beta1.
Blood 89 (1997) 1235-1242

6. Berlanga, O., Tulasne, D., Bori, T., Snell, D.C., Miura, Y., Jung, S., Moroi, M., Frampton, J., Watson, S.P.
The Fc receptor gamma-chain is necessary and sufficient to initiate signalling through glycoprotein VI in transfected cells by the snake C-type lectin,convulxin.
Eur. J. Biochem. 269 (2002) 2951-2960

7. Bigalke B, Langer H, Geisler T, Lindemann S, Gawaz M.
Glycoprotein VI: a novel marker for acute coronary syndrome.
Semin Thromb Hemost. (2007) Mar;33(2):179-84.

8. Briddon, S.J., Watson, S.P.
Evidence for the involvement of p59fyn and p53/56lyn in collagen receptor signalling in human platelets.
Biochem. J. 338 (1999) 203-209

9. Bultmann A, Herdeg C, Li Z, Munch G, Baumgartner C, Langer H, Kremmer E, Geisler T, May A, Ungerer M, Gawaz M.
Local delivery of soluble platelet collagen receptor glycoprotein VI inhibits thrombus formation in vivo.
Semin Thromb Haemost. (2006) May;95(5):763-6.

10. Cabeza N, Li Z, Schulz C, Kremmer E, Massberg S, Bultmann A, Gawaz M.
Surface expression of collagen receptor Fc receptor-gamma/glycoprotein VI is enhanced on platelets in type 2 diabetes and mediates release of CD40 ligand and activation of endothelial cells.
Diabetes (2004);53:2117–2121.

11. Clemetson, K.J., McGregor, J.L., James, E., Dechavanne, M., Luscher, E.F.
Characterization of the platelet membrane glycoprotein abnormalities in Bernard-Soulier syndrome and comparison with normal by surface-labeling techniques and high-resolution two-dimensional gel electrophoresis.
J. Clin. Invest. 70 (1982) 304-311

12. Clemetson, J.M., Polgar, J., Magnenat, E., Wells, T.N., Clemetson, K.J.
The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to Fc alphaR and the natural killer receptors.
J. Biol. Chem. 274 (1999) 29019-29024

13. Collins, T., Read, M.A., Neish, A.S., Whitley, M.Z., Thanos, D., Maniatis, T.
Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers.
FASEB. J. 9 (1995) 899-909

14. Daub K, Langer H, Seizer P, Stellos K, May AE, Goyal P, Bigalke B, Schonberger T, Geisler T, Siegel-Axel D, Oostendorp RA, Lindemann S, Gawaz M.
Platelets induce differentiation of human CD34+ progenitor cells into foam cells and endothelial cells.
FASEB J. (2006) Dec;20(14):2559-61. Epub 2006 Oct 31.

15. Dickfeld, T., Lengyel, E., May, A.E., Massberg, S., Brand, K., Page, S., Thielen, C., Langenbrink, K., Gawaz, M.
Transient interaction of activated platelets with endothelial cells induces expression of monocyte-chemoattractant protein-1 via a p38 mitogen-activated protein kinase mediated pathway. Implications for atherogenesis.
Cardiovasc. Res. 49 (2001) 189-199

16. Ezumi, Y., Shindoh, K., Tsuji, M., Takayama, H.
Physical and functional association of the Src family kinases Fyn and Lyn with the collagen receptor glycoprotein VI-Fc receptor gamma chain complex on human platelets.
J. Exp. Med. 188 (1998) 267-276

17. Furie, B., Furie, B.C.
Molecular and cellular biology of blood coagulation.
N. Engl. J. Med. 326 (1992) 800-806

18. Gawaz, M., Neumann, F.J., Dickfeld, T., Koch, W., Laugwitz, K.L., Adelsberger, H., Langenbrink, K., Page, S., Neumeier, D., Schömig, A., Brand, K.
Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells.
Circulation 98 (1998) 1164-1171

19. Gawaz, M., Brand, K., Dickfeld, T., Pogatsa-Murray, G., Page, S., Bogner, C., Koch, W., Schömig, A., Neumann, F.
Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis.
Atherosclerosis 148 (2000) 75-85

20. Gawaz, M.
Platelet and primary hamostasis.
In: "Blood platelets",
Thieme Verlag,
Stuttgart-New York, (2001), 4-24

21. Gawaz M, Langer H, May AE.
Platelets in inflammation and atherogenesis.
J Clin Invest (2005);115:3378–3384.

22. Heller, R., Bevers, E.M.
Platelets, vessel wall and the coagulation system.
In: "Platelets and their factors",
von Bruchhausen, F., Walter, U. eds.,
Spinger, Berlin, (1997), 585-607

23. Henn, V., Slupsky, J.R., Grafe, M., Anagnostopoulos, I., Foster, R., Müller-Berghaus, G., Kroczek, R.A.
CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells.
Nature 391 (1998) 591-594

24. Heyward, S.A., Dubois-Stringfellow, N., Rapoport, R., Bautch, V.L.
Expression and inducibility of vascular adhesion receptors in development.
FASEB. J. 9 (1995) 956-962

25. Hynes, R.O.
Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion.
Cell 69 (1992) 11-25

26. Jarvis, G.E., Atkinson, B.T., Snell, D.C., Watson, S.P.
Distinct roles of GPVI and integrin alpha(2)beta(1) in platelet shape change and aggregation induced by different collagens.
Br. J. Pharmacol. 137 (2002) 107-117

27. Jung, S.M., Moroi, M.
Platelets interact with soluble and insoluble collagens through characteristically different reactions.
J, Biol. Chem. 273 (1998) 14827-14837

28. Jung, S.M., Moroi, M.
Signal-transducing mechanisms involved in activation of the platelet collagen receptor integrin alpha(2)beta(1).
J. Biol. Chem. 275 (2000) 8016-8026

29. Kotowicz, K., Dixon, G.L., Klein, N.J., Peters, M.J., Callard, R.E.
Biological function of CD40 on human endothelial cells: costimulation with CD40 ligand and interleukin-4 selectively induces expression of vascular cell adhesion molecule-1 and P-selectin resulting in preferential adhesion of lymphocytes.
Immunology 100 (2000) 441-448

30. Lawrence, M.B., Springer, T.A.
Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins.
Cell 65 (1991) 859-873

31. Libby, P., Sukhova, G., Lee, R.T., Galis, Z.S.
Cytokines regulate vascular functions related to stability of the atherosclerotic plaque.
J. Cardiovasc. Pharmacol. 2 (Suppl 25) (1995) S9-12

32. Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M.
Der Experimentator: Immunologie
Spektrum Akademischer Verlag (2006)

33. Massberg, S., Gawaz, M., Grüner, S., Schulte, V., Konrad, I., Zohlnhofer, D., Heinzmann, U., Nieswandt, B.
A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo.
J. Exp. Med. 197 (2003) 41-49

34. Massberg S, Konrad I, Bultmann A, Schulz C, Munch G, Peluso M, Lorenz M, Schneider S, Bosta F, Muller I, Hu B, Langer H, Kremmer E, Rudelius M, Heinzmann U, Ungerer M, Gawaz M.
Soluble glycoprotein VI dimer inhibits platelet adhesion and aggregation to the injured vessel wall in vivo.
FASEB J (2004);18:397–399.

35. Moroi, M., Onitsuka, I., Imaizumi, T., Jung, S.M.
Involvement of activated integrin alpha2beta1 in the firm adhesion of platelets onto a surface of immobilized collagen under flow conditions.
Thromb. Haemost. 83 (2000) 769-776

36. Moshfegh K, Wuillemin WA, Redondo M, Lammle B, Beer JH, Liechti-Gallati S, Meyer BJ.
Association of two silent polymorphisms of platelet glycoprotein Ia/IIa receptor with risk of myocardial infarction: a case-control study.
Lancet. (1999) Jan 30;353(9150):351-4.

37. Nieswandt, B., Brakebusch, C., Bergmeier, W., Schulte, V., Bouvard, D., Mokhtari-Nejad, R., Lindhout, T., Heemskerk, J.W., Zirngibl, H., Fassler, R.
Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen.
EMBO. J. 20 (2001) 2120-2130

38. Nieswandt, B., Watson, S.P.
Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor?
Blood 102 (2003) 449-461

39. Nurden, A.
Human platelet glycoproteins.
In: "Hemostasis and Thrombosis",
Bloom, A., Forbes, C.D. eds.,
New York-Churchill Livingstone, (1994), 3rd edn., 259-285

40. Ollikainen E, Mikkelsson J, Perola M, Penttila A, Karhunen PJ.
Platelet membrane collagen receptor glycoprotein VI polymorphism is Associated with coronary thrombosis and fatal myocardial infarction in middle-Age men.
Atherosclerosis (2004);176:95–99.

41. Pober, J.S., Cotran, R.S.
Cytokines and endothelial cell biology.
Physiol. Rev. 70 (1990) 427-451

42. Quek, L.S., Pasquet, J.M., Hers, I., Cornall, R., Knight, G., Barnes, M., Hibbs, M.L., Dunn, A.R., Lowell, C.A., Watson, S.P.
Fyn and Lyn phosphorylate the Fc receptor gamma chain downstream of glycoprotein VI in murine platelets, and Lyn regulates a novel feedback pathway.
Blood 96 (2000) 4246-4253

43. Ross, R.
The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s.
Nature 362 (1993) 801-809

44. Ross, R.
Atherosclerosis--an inflammatory disease.
N. Engl. J. Med. 340 (1999) 115-126

45. Ruggeri, Z.M.
Mechanisms initiating platelet thrombus formation.
Thromb. Haemost. 78 (1997) 611-616

46. Ruggeri, Z.M.
Platelets in atherothrombosis.
Nat. Med. 8 (2002) 1227-1234

47. Samaha FF, Hibbard C, Sacks J, Chen H, Varello MA, George T, Kahn ML.
Density of platelet collagen receptors glycoprotein VI and alpha2beta1 and prior myocardial infarction in human subjects, a pilot study.
Med Sci Monit (2005);11: CR224–CR229.

48. Savage, B., Saldivar, E., Ruggeri, Z.M.
Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor.
Cell 84 (1996) 289-297

49. Savage, B., Almus-Jacobs, F., Ruggeri, Z.M.
Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow.
Cell 94 (1998) 657-666

50. Schonbeck, U., Libby, P.
The CD40/CD154 receptor/ligand dyad.
Cell Mol. Life Sci. 58 (2001) 4-43

51. Slupsky, J.R., Kalbas, M., Willuweit, A., Henn, V., Kroczek, R.A., Muller-Berghaus, G.
Activated platelets induce tissue factor expression on human umbilical vein endothelial cells by ligation of CD40.
Thromb. Haemost. 80 (1998) 1008-1014

52. Springer, T.A.
Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm.
Cell 76 (1994) 301-314

53. Suzuki-Inoue, K., Tulasne, D., Shen, Y., Bori-Sanz, T., Inoue, O., Jung, S.M., Moroi, M., Andrews, R.K., Berndt, M.C., Watson, S.P.
Association of Fyn and Lyn with the proline-rich domain of glycoprotein VI regulates intracellular signaling.
J. Biol. Chem. 277 (2002) 21561-21566

54. Suzuki-Inoue, K., Inoue, O., Frampton, J., Watson, S.P.
Murine GPVI stimulates weak integrin activation in PLCgamma2-/- platelets: involvement of PLCgamma1 and PI3-kinase.
Blood 102 (2003) 1367-1373

55. Ueda, A., Okuda, K., Ohno, S., Shirai, A., Igarashi, T., Matsunaga, K., Fukushima, J., Kawamoto, S., Ishigatsubo, Y., Okubo, T.
NF-kappa B and Sp1 regulate transcription of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene.
J. Immunol. 153 (1994) 2052-2063

56. Valente, A.J., Rozek, M.M., Sprague, E.A., Schwartz, C.J.
Mechanisms in intimal monocyte-macrophage recruitment. A special role for monocyte chemotactic protein-1.
Circulation 86 (Suppl 6) (1992) III20-25

57. Wertheimer, S.J., Myers, C.L., Wallace, R.W., Parks, T.P.
Intercellular adhesion molecule-1 gene expression in human endothelial cells. Differential regulation by tumor necrosis factor-alpha and phorbol myristate acetate.
J. Biol. Chem. 267 (1992) 12030-12035

58. Zheng, Y.M., Liu, C., Chen, H., Locke, D., Ryan, J.C., Kahn, M.L.
Expression of the platelet receptor GPVI confers signaling via the Fc receptor gamma -chain in response to the snake venom convulxin but not to collagen.
J. Biol. Chem. 276 (2001) 12999-13006

8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. M. Gawaz und Herrn PD Dr. med. A. E. May danke ich sehr für die Überlassung dieses interessanten und klinisch relevanten Themas sowie für den ständigen Anspruch gute Ergebnisse zu erhalten.

Ein besonderer Dank gebührt meinem unmittelbaren Betreuer Dr. med. Boris Bigalke, der durch seine Unterstützung sehr zum Zustandekommen dieser Doktorarbeit beigetragen hat und zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Verfügung stand.

Weiterhin danke ich herzlich den Laborassistentinnen Heike Runge und Iris Schäfer für deren exzellente fachliche Unterstützung bei der Arbeit im Labor.

Zu guter Letzt möchte ich vor allem meinen Eltern dafür danken, dass sie mir dieses Studium ermöglichen und mich in jeglicher Hinsicht unterstützen.

9 Lebenslauf

11.09.1982:	geboren in Stuttgart
1989- 1993:	Besuch der Plaisir- Grundschule in Backnang
1993- 2002:	Besuch des Gymnasiums in der Taus in Backnang
Juni 2002:	Erlangung der allgemeinen Hochschulreife
2002- 2003:	10-monatiger Zivildienst im Rettungsdienst Rems-Murr auf der Lehrrettungswache Backnang mit Ausbildung zum Rettungshelfer
April 2003:	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Eberhard Karls Universität Tübingen
März 2005:	Physikum in Tübingen

Famulaturen:
- 01.08.2005-31.08.2005 in der unfallchirurgischen Praxis Dr. Kübler in Backnang
- 12.09.2005-30.09.2005 in der kardiologischen Praxis Dr. Scheuber in Backnang
- 13.03.2006-13.04.2006 im Universitätsklinikum Tübingen Abteilung Innere III
- 07.08.2006-11.09.2006 in der Medizinischen Klinik des Kreiskrankenhauses Backnang
- 05.03.2007-22.03.2007 in der Loretto-Klinik Tübingen im Bereich Anästhesie

5. Juni 2009: Ärztliche Prüfung