

3 Einleitung

3.1 Definition, Ätiologie und Relevanz des akuten Koronarsyndroms

Kardiovaskuläre Erkrankungen stehen an erster Stelle der Todesursachenstatistik in der Bundesrepublik Deutschland und anderer westlicher Industriestaaten. Auch in den Staaten der Schwellenländer und der dritten Welt nehmen diese Erkrankungen stark an Bedeutung zu.

In Deutschland starben im Jahr 2004 mehr als 94.000 Menschen an den Folgen einer koronaren Herzerkrankung (KHK) und mehr als 64.000 Menschen an den Folgen eines akuten Myokardinfarktes².

Ein klinisch relevantes Problem ist, dass 30-40% der KHK-Patienten prähospital versterben³. Um die hohe Mortalitätsrate zu verstehen und eine verbesserte Prävention leisten zu können, ist das Verständnis der Pathogenese des ACS außerordentlich wichtig.

Definition: Das akute Koronarsyndrom (ACS) umfasst die instabile Angina pectoris, den transmuralen und nicht-transmuralen Myokardinfarkt sowie den plötzlichen Herztod. Eine gültige klinische Definition der stabilen Angina pectoris bezieht sich auf eine Klassifikation von Braunwald¹. Zur Mortalität trägt insbesondere das ACS als komplexer Phänotyp der KHK bei. Unter dem Begriff des ACS werden die Phasen der KHK zusammengefasst, die unmittelbar lebensbedrohlich sind.

Hierdurch gelingt eine einheitliche Kategorisierung, die für Diagnostik und prognostische Einschätzung wichtig ist.

3.2 Pathogenese des akuten Koronarsyndroms / Atherosklerose

Koronarsyndrome wie instabile Angina pectoris und Myokardinfarkt sind Komplikationen eines Gefäßverschlusses bei Atherosklerose^{4,5}. Atherosklerose ist definiert als eine progressive Erkrankung der großen Gefäße, die durch Akkumulation von Lipiden und fibrösen Elementen der

Gefäßwand charakterisiert ist⁶ und zu einer Einengung des Gefäßlumens führt.

Pathomorphologisch liegt dem ACS überwiegend die Ruptur eines vulnerablen, atherosklerotischen Plaques zugrunde⁷. Daraus folgt, dass der Myokardinfarkt fast immer die Konsequenz einer Thrombusbildung an einem ruptierten atherosklerotischen Plaque ist. Diese Plaques sind Auflagerungen in den Arterien, die durch Atherosklerose hervorgerufen werden. Die physikalische Zerreißung jenes Plaques erlaubt zirkulierenden Koagulationsfaktoren aus dem Blut den Kontakt mit dem thrombogenetischen Material aus dem Kern dieser Lipidauflagerungen. Dieser Kontakt führt zum Gefäßverschluss und damit zum Thrombus.

Innerhalb der Pathogenese der Atherosklerose und insbesondere des ACS spielen Thrombozyten eine entscheidende Rolle. Die Aggregation der Thrombozyten ist hierbei der ausschlaggebende Schritt in der Entwicklung der Gefäßverschlüsse, der die fatalen Folgen des ACS zur Folge hat (vgl. Abb.1).

3.2.1 Thrombozytenaggregation

Thrombozyten spielen eine fundamentale Rolle in der Pathophysiologie des ACS, da die Ruptur eines koronaren Plaques gefolgt wird von Adhäsion, Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten, was in einer Formation eines okklusiven oder nicht-okklusiven koronaren Thrombus endet⁸.

Die Thrombozytenaggregation ist Teil der physiologischen Hämostase aber auch Grundlage der pathologischen Entstehung eines Thrombus und damit des Gefäßverschlusses. Normalerweise zirkulieren Thrombozyten einzeln im Blut, ohne dass eine Interaktion untereinander oder mit anderen Zelltypen stattfindet. Bei der Verletzung der Gefäßwand jedoch führen primäre und sekundäre Hämostase zur Bildung eines Pfropfs (Thrombus) aus Thrombozyten und Fibrin.

Die Thrombozytenmembran besitzt zahlreiche Komponenten, die den Kontakt mit subendothelialen Strukturen bzw. dem Endothel nach Gefäßverletzung fördern. Auf ihrer Außenfläche trägt diese Membran einen Mantel aus kohlenhydratreichen Verbindungen. Der größte Anteil dieser Verbindungen ist mit Proteinen zu Glykoproteinen verbunden, die hauptsächlich als Rezeptoren für die Induktion der hämostatischen Aktivität der Plättchen dienen. Die Aktivierung der Thrombozyten durch Agonisten findet durch Bindung an diese G-Protein gekoppelten Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche statt⁹.

Diese thrombozytären Glykoproteine werden nach ihrer Molekularmasse in unterschiedliche Fraktionen eingeteilt: Ia, Ib, IIb, IIIa und IIIb. Es handelt sich dabei um eine Superfamilie von Rezeptorproteinen für die adhäsiven Proteine, an denen Fibrinogen als interzelluläres Adhäsionsmolekül und die Substratadhäsionsmoleküle von Willebrand-Faktor (vWF), Fibronektin, Vitronektin und Kollagen spezifisch gebunden werden.

Nach der Verletzung der Gefäßwand erfolgt die lokale Sekretion verschiedener vasoaktiver Substanzen aus dem Endothel, z.B. Endothelin. Dies führt zu einer langanhaltenden Vasokonstriktion. Durch die Gefäßverletzung gelangen Thrombozyten an die Bestandteile der extrazellulären Matrix wie z.B. Kollagen, Proteoglykane und andere adhäsive Glykoproteine. Die Adhäsion von Thrombozyten erfolgt durch die Bindung des thrombozytären Oberflächenrezeptors Glykoprotein Ib (GPIb) an vWF. Dieser dient als Verbindungsstück zwischen dem subendotheliale Kollagen und den Thrombozyten¹⁰ (vgl. Abb. 2).

Der carboxylterminale Anteil des vWF bindet auf stimulierten Thrombozyten an den GPIIb/IIIa-Komplex. Der Komplex befindet sich in ruhenden Plättchen vorwiegend intrazellulär. Durch die Thrombinstimulation wird er an die Zelloberfläche befördert. Auch der in der Membran enthaltene Anteil wird bei der Aktivierung der Thrombozyten exponiert.

Dieser Komplex stellt folglich einen Schlüsselrezeptor für die Bindung der Proteinkofaktoren der Plättchenaggregation dar. Die Expression dieser

Rezeptoren unterliegt der intrazellulären Kontrolle. Zusätzlich zum vWF werden noch Fibrinogen und Fibronectin an diese Rezeptoren gebunden. Wie in der Abbildung 2 dargestellt, besitzt Fibrinogen an den α - und γ -Ketten spezifische Bindungssequenzen für GPIIb/IIIa. Bei Stimulation von Thrombozyten werden bis zu 400.000 Fibrinogenbindungsstellen pro Thrombozyt exponiert.

Unter dem Einfluss von Induktoren, wie z.B. ADP, PAF, etc., verlieren die Thrombozyten ihre diskoide Form und nehmen eine sphäroide Struktur an (Abb. 1). Es kommt dabei zur Formation von Filopodien und Zellspreizung durch Ausspannen von Lamellen.

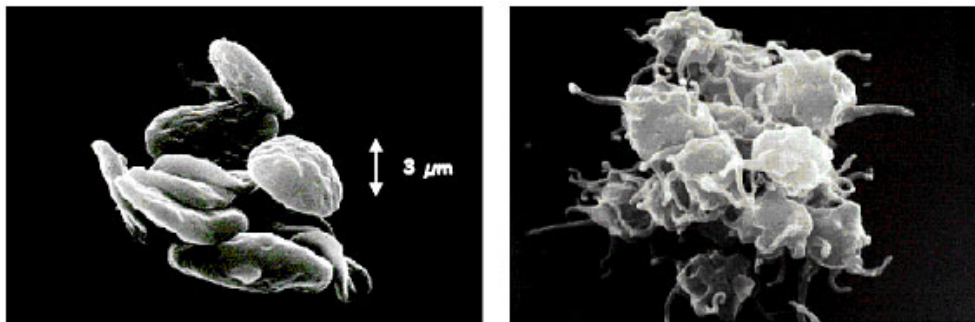


Abb. 1: Aktivierung von Thrombozyten

Thrombozyten gehen aus dem nicht aktivierten Zustand: diskoide Form in einen aktivierten Zustand: sphäroide Form über. Es findet die Ausbildung von Filopodien statt.

Modifiziert nach www.perfusion.com/9905-platelet-anatomy

Die Thrombozyten werden in einen aktivierten Zustand versetzt, was zu einer Freisetzung sekretorischer Granula führt. Durch diese Botenstoffe angelockt kommt es zu einer weiteren Rekrutierung von Thrombozyten. Aus den Granula wird neben Calcium auch ADP freigesetzt, das als Mediator für die Thrombozytenaggregation dient.

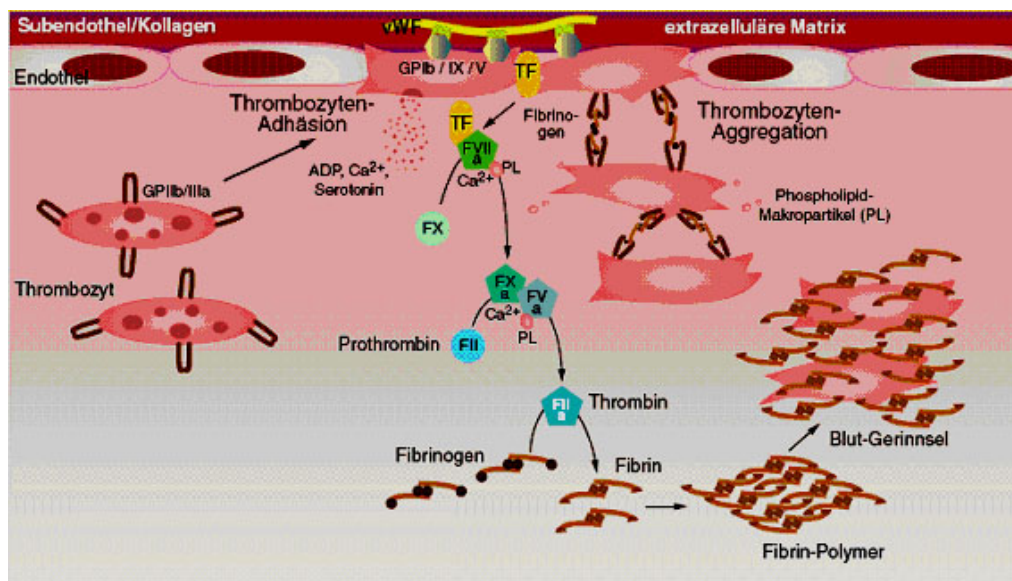


Abb. 2: Schematische Darstellung der Thrombozytenaggregation
 Bildung eines primären Thrombozytenthrombus an der Verletzung einer Gefäßwand
 modifiziert nach¹¹

3.3 Molekulargenetische Grundlagen des akuten Koronarsyndroms

3.3.1 Genetische Polymorphismen und Mutationen

Das humane Genom besteht aus 3 bis 3,5 Milliarden Basen. Von diesen stellen nur ca. 3% kodierende Gene und deren flankierenden regulatorischen Sequenzen dar. Bei allen Säugetierorganismen tritt infolge normaler zellulärer Vorgänge oder zufälliger Wechselwirkung mit der Umwelt eine bestimmte Zahl von genetischen Varianten in allen Bereichen des Genoms auf.

Der Begriff des Polymorphismus wird in der Genetik wie folgt definiert: durch Mutationen entstandene Unterschiede in der Nukleotidsequenz homologer DNA-Bereiche. Man bezeichnet eine genetische Variante als „Polymorphismus“, wenn ihre Frequenz größer als 1% in der Normalbevölkerung ist. Varianten, die seltener als 1% vorkommen, bezeichnet man als Mutationen¹².

Die meisten stabilen genetischen Varianten zeigen sich in der Form von Einzelbasenaustauschen (single nucleotide polymorphism, SNP). Diese

stellen 90% der gesamten Variationen im Genom dar. Die restlichen 10% zeigen sich als Insertionen, Deletionen und einer variablen Anzahl von Repeat-Elementen¹³. Häufige Sequenzvarianten treten etwa alle eintausend Basen in kodierenden oder regulatorischen Sequenzen auf¹⁴.

Da jedes Basenpaar der DNA mutieren kann, wird bei SNPs unterschieden zwischen Transition und Transversion. Die häufigste Form ist die Transition: hierbei wird eine Pyrimidinbase durch eine andere ersetzt (G→C) oder eine Purinbase durch eine andere (T→A). Seltener ist die Form der Transversion, bei der eine Purin- durch eine Pyrimidinbase (oder umgekehrt) ersetzt wird¹⁵.

Polymorphismen werden fast immer im Kontext komplexer genetischer Erkrankungen gesehen und sind regelmäßig in der „Normalbevölkerung“ nachweisbar, wenn auch mit unterschiedlichen Allelfrequenzen in verschiedenen ethnischen Gruppen. Im Unterschied zu den seltenen Mutationen, die zu monogenen Erkrankungen führen können, sind genetische Polymorphismen häufig und erhöhen bei einzelnen Individuen das Risiko für die Ausbildung beispielsweise bestimmter kardiovaskulärer Phänotypen deutlich, besonders beim Zusammentreffen mehrerer zu diesem Phänotyp prädisponierender Allele¹⁵.

Die Bedeutung von Polymorphismen als Risikomarker für komplexe Erkrankungen ist Gegenstand zahlreicher Studien, wie die folgenden Beispiele zeigen.

Kandidatengen-Polymorphismen können einerseits mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert sein. Ein Beispiel für ein solches „Risiko-Allel“ stellt der Insertions/Deletions-Polymorphismus (I/D) im Angiotensin-Converting Enzym (ACE) dar. Der DD-Genotyp konnte z. B. in verschiedenen Studien mit einer erhöhten Myokardinfarktinzidenz assoziiert werden¹⁶.

Andererseits kann ein weniger frequentes Allel auch eine protektive Funktion haben, wie das Beispiel des Pro715-Allels im P-Selektin-Gen gezeigt hat. Dieses Allel ist häufiger bei gesunden Kontrollen als bei den Patienten mit Myokardinfarkt zu finden¹⁷.

Genetische Varianten in kodierenden Regionen können bei Änderung der Aminosäuresequenz zu einer veränderten Proteinfunktion führen.

Genetische Varianten, die in 5'-flankierenden Regionen und in Introns auftreten, können dagegen die Gentranskription beeinflussen¹⁸. Polymorphismen im 3'-Bereich eines Gens können zu Veränderungen der mRNA-Stabilität und translationellen Blockade führen.

3.3.2 Genetik akuter Koronarsyndrome

Verschiedene Risikofaktoren, sowohl umweltbedingte als auch genetisch determinierte, beeinflussen das individuelle Risiko für ACS additiv oder synergistisch. Epidemiologische Studien zeigten, dass Diabetes mellitus, Rauchen oder Übergewicht das Risiko für akuten Myokardinfarkt erheblich steigern. Aber auch veränderte Plasmaspiegel verschiedener Koagulationsproteine wie Fibrinogen und Faktor VII korrelieren mit einem erhöhten Risiko für Myokardinfarkt^{19,20}.

Ebenso erlaubt die Auswertung zahlreicher genetischer Populationsstudien einen Rückschluss auf den Einfluss genetischer Variablen auf die Ausbildung bestimmter Phänotypen. In einer Studie mit 20.000 Zwillingen konnte z. B. gezeigt werden, dass die Wahrscheinlichkeit an einer KHK zu versterben, genetisch determiniert ist²¹. Wenn der erste Zwilling an einer KHK verstorben ist, ist das relative Risiko für den zweiten Zwilling ebenfalls daran zu erkranken, etwa doppelt so hoch.

In der Populations-basierten Framingham Heart Studie, die 2413 gesunde Individuen einschloss, konnte spezifiziert werden, dass die Thrombozytenaggregation selbst als akut kardiovaskulärer Phänotyp, genetisch determiniert ist²². Dabei bestimmen bisher noch unbekannte genetische Faktoren 20-30% der Variabilität der Thrombozytenaggregation, während bekannte Kovarianten wie essentielle Hypertonie, Dyslipidämie und hoher Plasma-Fibrinogen-Spiegel einen nur 4 bis 7%igen Anteil an der Thrombozytenaggregation hatten.

Bei der Thrombozytenaggregation können mögliche genetische Dysfunktionen der Blutkomponenten zu „loss-of-function-Mutationen“ der physiologischen Antikoagulantien, „gain-of-function-Mutationen“ der prokoagulatorischen Proteine oder zu einer pathologischen Thrombozytenfunktion führen, die mit einer erhöhten Aktivierung verbunden sein kann.

Zur Klärung der genetischen Komponente trägt die Suche und Identifizierung von Kandidatengenomen entscheidend bei.

3.4 Kandidatengene des akuten Koronarsyndroms

3.4.1 Der Kandidatengenansatz

Wie bereits oben beschrieben, ist das ACS eine komplexe Erkrankung, die durch verschiedene genetische Faktoren und Umwelteinflüsse determiniert wird. Die Identifizierung von Genen, die in die Genese dieser Erkrankung involviert sind, ist daher entsprechend kompliziert. Bis heute sind mindestens 100 verschiedene Gene identifiziert, die in unterschiedlichem Ausmaß an der Entstehung des ACS beteiligt sein können.

Kandidatengene definieren sich als solche Gene, die einen Beitrag zu einem entsprechenden Phänotypen leisten. Zur Identifizierung solcher Gene arbeitet man mit dem so genannten Kandidatengenansatz (Candidate Gene Approach). Diese Herangehensweise beinhaltet die systematische Suche nach genetischen Varianten in diesen Kandidatengenomen sowie die Assoziation der einzelnen Varianten mit den Phänotypen. Hierfür müssen große Studienpopulationen für die entsprechenden Varianten genotypisiert werden.

Der methodische Wert des Kandidatengenansatzes wurde durch die Identifizierung von Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen bewiesen. Als eines der ersten Beispiele gilt der Nachweis der Korrelation von Polymorphismen im Gen für Apolipoprotein E mit Hyperlipidämie²³. Systematische Untersuchungen zeigen, dass eine Vielzahl von

Kandidatengen für kardiovaskuläre Erkrankungen genetisch polymorph sind²⁴.

Entsprechend können genetische Varianten in den Kandidatengen, allein oder in Kombination, Einfluss auf die Thrombozytenaggregation und damit auf die Ausbildung des ACS nehmen²⁵.

3.4.2 Auswahl von Kandidatengen

Kandidatengene werden nach verschiedenen Kriterien ausgewählt. Für die Thrombozytenaggregation als pathophysiologischem Aspekt des ACS kommen zunächst alle Gene in Betracht, deren Genprodukte direkt oder indirekt an der Thrombozytenaggregation beteiligt sind. Neben dem thrombozytären Glykoproteinrezeptor GPIIb/IIIa sind das vor allem seine Liganden α - und γ -Fibrinogen sowie die den Rezeptor aktivierenden Serinproteasen Neutrophile Elastase und Cathepsin G. Außerdem zählen hierzu alle Gene, die der Rezeptorbindung in der Signaltransduktionskaskade nachfolgen, wie z.B. pp125FAK, pp72syk und F-actin. Ebenso in Betracht kommen sämtliche Gene, die für spezifische Transkriptionsfaktoren der oben aufgeführten Gene kodieren.

Kandidatengene werden auch durch Messung der Genexpression mittels cDNA-Microarrays bzw. anderen Hybridisierungstechniken wie Northern-Blot in passenden Zell- und Gewebetypen unter Berücksichtigung der unterschiedlichen pathophysiologischen Stadien definiert²⁵. Hierbei werden Gene gewählt, die bei veränderten physiologischen Bedingungen eine differenzierte Expression zeigen.

Einen weiteres Indiz für die Identifizierung von Kandidatengen erfolgt durch Messung Proteinregulation. So konnten Smith et al.²⁶ zeigen, dass die Proteinspiegel der Neutrophilen Elastase in Patientengruppen mit kardiovaskulären Erkrankungen höher sind als in entsprechenden Kontrollgruppen. Das Gen dieses unterschiedlich exprimierten Proteins kommt daher als Kandidatengen für das ACS in Betracht.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass Kandidatengene durch Messung einer veränderten Expression der Genprodukte auf mRNA- und Proteinebene definiert werden.

3.5 Bedeutung des Fibrinogens für das ACS

Humanes Fibrinogen ist ein zirkulierendes Plasmaglykoprotein mit einem Molekulargewicht von 340 kDa, welches in den Hepatozyten synthetisiert wird. Fibrinogen besteht aus zwei symmetrischen Halbmolekülen. Jedes Halbmolekül besteht aus drei strukturell verschiedenen Untereinheiten: α -, β -, und γ -Fibrinogen^{27,28}. Im Vergleich zum γ -Fibrinogen leistet α -Fibrinogen zwar nur einen 20 bis 25%igen Beitrag zur Thrombozytenaggregation, stabilisiert jedoch insgesamt die Bindung signifikant²⁹.

Fibrinogen spielt eine Schlüsselrolle in der Thrombogenese durch die Vermittlung der Thrombozytenaggregation und damit der klinischen Manifestation des ACS.

Aus pathologisch-anatomischen Untersuchungen ist bekannt, dass Fibrinogen bereits Bestandteil der frühesten atherosklerotischen Plaques ist und hier Ödeme der Intima verursacht^{23,30}. Veränderung der Plasmafibrinogenspiegel sind dabei ein wichtiger prognostischer Marker: Erhöhung der Plasmakonzentration von mehr als 0,6 g/L Fibrinogen bedeuten ein 84% höheres Myokardinfarktrisiko in den folgenden fünf Jahren³¹. Fibrinogen erfüllt damit die Kriterien eines eigenständigen und unabhängigen kardiovaskulären Risikofaktors^{20,32,33}.

Plasmafibrinogen macht ca. 2 bis 3% des Bluteiweißes aus. Dabei ist die individuelle Plasmafibrinogenkonzentration weitgehend unabhängig von der Nahrungsmittelzufuhr und zu 20-50% genetisch determiniert^{34,35}. Allerdings wurde gezeigt, dass Plasmafibrinogenspiegel durch ein Zusammenspiel zwischen Genotypen und Umweltfaktoren beeinflusst werden können. Einige genetische Varianten im Promotor von β -Fibrinogen sind assoziiert mit moderat erhöhtem Plasmafibrinogen bei Nichtrauchern, zeigen dagegen aber starke genotyp-assoziierte Effekte bei Rauchern, die mit deutlich erhöhten Fibrinogenspiegeln einhergehen³⁶.

Liegt eine Gefäßverletzung vor, wird die Thrombozytenaggregation aktiviert. Fibrinogen wird dabei zu Fibrin umgebaut und es bildet sich ein Thrombus, indem Fibrinogen die Thrombozyten über die GPIIb/IIIa-Rezeptoren vernetzt. Gleichzeitig wird Fibrinogen gemeinsam mit dem platelet derived growth factor (PDGF) aus den α -Granula der Thrombozyten freigesetzt, was eine Thrombozytenaktivierung und Gefäßkontraktion verursacht. Bereits die Anlagerung von Fibrinogen an das Endothel verstärkt den Fibrinogennachschub. Erhöhte Fibrinogenspiegel erhöhen die Plasmaviskosität. Zusätzlich bildet Fibrin einen unlöslichen Pfropf im finalen Stadium der Blutgerinnungskaskade.

Der Glykoproteinrezeptor GPIIb/IIIa ist das häufigste Integrin auf der Oberfläche von Thrombozyten (ca. 50.000 bis 100.000 Kopien pro Thrombozyt). Wie die Abb. 3 zeigt, besitzt GPIIb/IIIa eine große extrazelluläre Region für die Ligandenbindung und eine kleine intrazelluläre Domäne für die Vermittlung der intrazellulären Signaltransduktion.

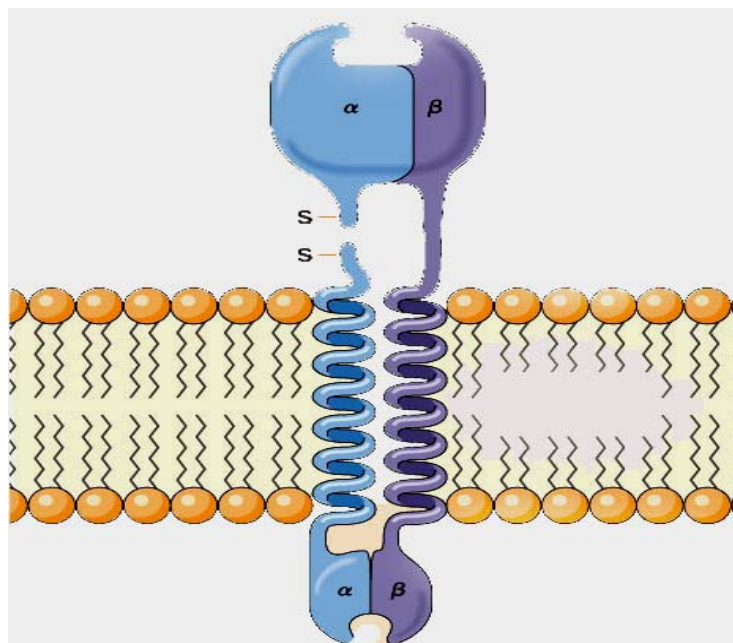


Abb. 3. Schematische Darstellung des dimeren Glykoproteinrezeptors GPIIb/IIIa

Der Rezeptor wird von Heterodimeren aus einer α - und β -Untereinheit gebildet. Jede dieser Untereinheiten hat eine lange N-terminale extrazelluläre Bindungsdomäne, an die sich ein transmembranärer Bereich und ein kurzer zytoplasmatischer Anteil anschließt.

Nach Aktivierung und Konformationsänderung (durch u.a. Neutrophile Elastase) des GPIIb/IIIa Rezeptors bindet γ -Fibrinogen an den Rezeptor über seine Dodecapeptid-Sequenz, welche sich an seinem Carboxyl-Ende befindet und spezifisch an die GPIIb-Rezeptoruntereinheit (Aminosäurepositionen 296-306) bindet. Die (RGD) Arg-Gly-Asp-Sequenzen des α -Fibrinogens (Aminosäurepositionen α 95-97 und α 572-572) binden die GPIIIa-Rezeptoruntereinheit spezifisch, welche durch die Aminosäurepositionen 109-171 und 211-222 des GPIIIa-Gens kodiert werden³⁷.

3.5.1 Genetische und peptidische Struktur des Fibrinogens

Die drei Gene α -, β -, und γ -Fibrinogen werden als separate mRNAs transkribiert. Alle drei Gene liegen auf dem langen Arm des Chromosoms 4, im Segment 28 (4q28). Die Abfolge der Transkription ist hierbei gamma, alpha und beta (siehe Abb. 4).

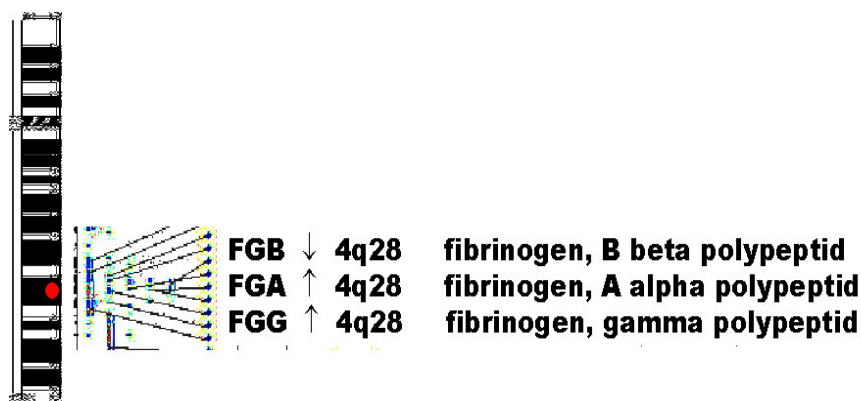


Abb. 4: Transkriptionsreihenfolge der Fibrinogene

Dargestellt ist die Reihenfolge der Transkription der drei Fibrinogene auf Chromosom 4, der Pfeil deutet die Transkriptionsorientierung an: Pfeil nach oben heißt Ablesung auf dem negativen Strang, Pfeil nach unten Ablesung auf dem positiven Strang

Die Kontrolle der Transkription des Fibrinogens wird von verschiedenen Transkriptionsfaktoren übernommen, die miteinander kooperieren. Hierbei sind Steroidhormone und verschiedene Zytokine entscheidend beteiligt³⁸.

Die α -Kette, bestehend aus 6 Exons, und die γ -Kette (10 Exons) sind in entgegengesetzter Richtung orientiert wie die β -Kette, die von 8 Exons

codiert wird. Das zirkulierende Fibrinogen besteht aus der α -Kette mit 610 Aminosäuren, aus β -Kette mit 461 Aminosäuren und aus 411 Aminosäuren der γ -Kette.

Die drei konstitutiven Ketten des Peptides werden zusammengehalten von insgesamt 29 Disulfidbrücken. In der Leberzelle liegen die drei Polypeptidketten einzeln vor und werden vor der Sekretion zusammengefügt. Im Zellkultorexperiment konnte gezeigt werden, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die Formation des Fibrinogens die Synthese der β -Kette darstellt²⁸.

3.5.2 Molekulargenetische Bedeutung des Fibrinogens

Die basalen Fibrinogenspiegel können sowohl durch Umweltfaktoren beeinflusst als auch genetisch determiniert sein³⁵. Viele Studien konnten unabhängig voneinander zeigen, dass veränderte Plasma-Fibrinogenspiegel mit dem Risiko der KHK assoziiert sind.

Einfluss nehmen aber auch Faktoren wie Rauchen, Übergewicht und Medikamenteneinnahme.

Bisher wurden in den drei Fibrinogen-Genen zahlreiche Mutationen identifiziert, die vor allem zu Dysfibrinogenie (eine Dysfunktion des Fibrinogens) führen. Einige Mutationen im Fibrinogen, die meist Einzelaminosäureaustausche darstellen, können zu starken Störungen der Hämostase führen³⁹⁻⁴¹.

Bezüglich Atherosklerose und ACS fokussieren die meisten Untersuchungen auf Polymorphismen in der β -Fibrinogen Kette⁴². Verschiedene Studien zeigen eine Assoziation zwischen dem Polymorphismus G-455A und dem Fibrinogenspiegel. Eine direkte Assoziation zum Myokardinfarkt fehlt jedoch. Dagegen konnte der Polymorphismus G1689T mit einem höheren Fibrinogenplasmaspiegel assoziiert werden und die Genotypisierung der ECTIM Studie (Etude Cas-Temoins sur l'Infarctus du Myocarde) von vier Polymorphismen im β -

Fibrinogen konnte eine Assoziation der seltenen Allele mit dem Schweregrad der KHK aufzeigen⁴³.

Weiterhin zeigten verschiedene Studien, dass Polymorphismen im Liganden des Fibrinogens, des Glykoproteinrezeptors GPIIb/IIIa, assoziiert sind mit Myokardinfarkt und instabiler Angina pectoris⁴⁴.

Folglich wird angenommen, dass aufgrund der aufgezeigten Bedeutung für die Ausbildung des ACS α - und γ -Fibrinogen aufschlussreiche, jedoch noch nicht ausreichend untersuchte Kandidatengene darstellen.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit gab es keine Studie, die versuchte, eine Assoziation von Polymorphismen in der α - und γ -Kette von Fibrinogen mit dem ACS herzustellen.

3.6 Bedeutung der Neutrophilen Elastase für das ACS

3.6.1 Serinproteasen

Proteasen werden definiert als Enzyme, die Peptidbindungen spalten. Viele physiologische und pathophysiologische Prozesse werden durch Proteasen vermittelt, sie sind daher in verschiedene humane Erkrankungen involviert⁴⁵. Eine unkontrollierte Aktivität von Proteasen kann aber außerordentlich destruktiv für biologische Prozesse sein⁴⁶.

Proteasen werden in vier Familien eingeteilt:

- Serinproteasen
- Metalloproteasen
- Aspartatproteasen
- Cysteinproteasen.

Die Proteasen jeder Familie spalten Peptidbrücken mit dem gleichen Basismechanismus und gleicher katalytischer Domäne. Serinproteasen tragen ihren Namen, weil für ihren Reaktionsmechanismus ein Serinrest der Protease eine entscheidende Rolle spielt. Zur Familie der Serinproteasen

gehören die humane Neutrophile Elastase (ELA2), Chymotrypsin, Cathepsin G, Trypsin und Thrombin⁴⁷.

Enzyme der Serinproteasen greifen beispielsweise in folgende Prozesse ein:

1. ELA2 beim pulmonalen Emphysem,
2. Thrombin bei der Thrombusformation und
3. Dipeptidylpeptidase IV bei der Infektabwehr.

Zu der katalytischen Trias der Serinproteasen gehören die Aminosäuren Serin-Histidin-Asparaginsäure. Bei der katalytischen Spaltung von Peptidbindungen greift die reaktive Hydroxylgruppe des Serins die Carbonylgruppe der spaltbaren Amidbindung des Substrates an. Hierbei wird ein Tetrahedral-Intermediat gebildet, das von den Hydrogenbindungen benachbarter Aminosäuren stabilisiert wird. Die nachfolgende Hydrolyse führt zur Spaltung der Peptidbindung^{45,48}.

Die Substratspezifität vieler Serinproteasen wird determiniert durch Interaktion an der primären Substrat-bindenden Seite. Hierdurch kann die Klassifizierung der Serinproteasen in drei Hauptgruppen durchgeführt werden

1. Trypsin-ähnliche Proteasen
2. Chymotrypsin-ähnliche Proteasen
3. Elastasen

Proteolytische Enzyme werden kontinuierlich aus verschiedenen Quellen in das Gewebe abgegeben, um die natürliche Homöostase aufrecht zu erhalten.

3.6.2 Neutrophile Elastase

Die Neutrophile Elastase (ELA2), auch Leukozytenelastase, Elastase 2 oder Medullasin genannt, ist ein monomeres Glykoprotein mit einer molekularen Masse von ca. 25 kDa. Das Vorläuferprotein von ELA2 besteht aus 267

Aminosäuren, bei dem die ersten 29 Aminosäuren ein Signalpeptid darstellen. Das reife und funktionsfähige Enzym besteht aus 218 Aminosäuren. Dieses Peptid umfasst zwei Asparagin-gebundene Carbohydrat-Seitenketten und ist über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden.

Ein Homologievergleich von Sinha et al.⁴⁹ mit anderen bekannten Serinproteasen ergab, dass ELA2 eine moderate Homologie zu dem humanen Cathepsin G (37%) und der Pankreaselastase aus dem Schwein (43%) aufzeigt⁵⁰.

Das ELA2 Protein wird auf einem Gen kodiert, das sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 19, im Abschnitt 13.3 befindet. Das Gen ELA2 besteht aus 5 Exons und 4 Introns⁵¹. Der Promotor weist typische Sequenzen wie eine TATA-Box und ein CAAT-Signal auf. Weiterhin befindet sich in der 5'-Region ein sechsfacher Tandem-Repeat, der die Promotoraktivität beeinflussen kann (siehe Abb. 5)⁵².

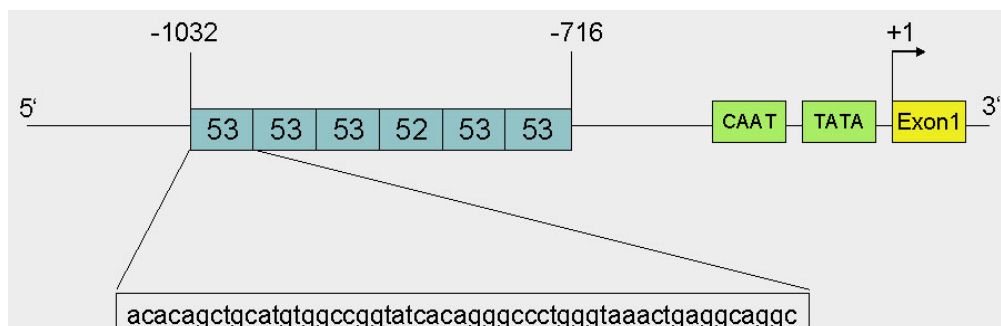


Abb. 5: Aufbau des ELA2-Promotors

Dargestellt sind die typischen Promotorsequenzen (CAAT, TATA) sowie das REP53-Element im distalen Promotor. Dieser besteht aus 52 bp bzw. 53 bp großen Sequenzabschnitten, die sich 5- bis 7-mal wiederholen. Die Sequenz der einzelnen Abschnitte ist wiedergegeben.

ELA2 wird während der Differenzierung von Promyelozyten und Promonozyten synthetisiert und anschließend in den zytoplasmatischen Granula der Mitochondrienmembran gespeichert⁵³.

Verschiedene Arbeiten zeigten, dass die Sekretion von ELA2 durch Neutrophile an der Gewebedestruktion bei verschiedenen Erkrankungen wie der Zystischen Fibrose, dem Emphysem und der rheumatoiden Arthritis

beteiligt ist. ELA2 ist in der Lage, eine große Bandbreite von Substraten umzusetzen, darunter fallen auch Elastin, Collagen und Proteoglykane⁵⁴.

3.6.3 Neutrophile Elastase und das ACS

Erhöhte Plasmaspiegel von ELA2 wurden in verschiedenen Studien mit Phänotypen des ACS assoziiert. So zeigten Smith et al.²⁶, dass die Plasmaspiegel bei Patienten mit Myokardinfarkt signifikant höher waren als in den Kontrollgruppen. Unter anderen zeigten Studien, dass der Plasmaspiegel eines spezifischen Abbauproduktes von ELA2 im Vergleich zur Kontrollgruppe um den Faktor 5 erhöht ist bei Patienten mit Myokardinfarkt. Bei Patienten mit instabiler Angina pectoris ist er sogar 13fach erhöht⁵⁵.

Es wird daher angenommen, dass ELA2 an der Entstehung des Gefäßverschlusses bei der Ausbildung des ACS beteiligt ist. Tatsächlich konnte in tierexperimentellen Untersuchungen gezeigt werden, dass die Gabe des Elastase-Inhibitors Elafin bei Ratten unterschiedliche klinische und diagnostische Phänotypen wie den myokardialen Blutfluss und die Infarktgröße des künstlich erzeugten Myokardinfarktes verbessert⁵⁶.

3.6.4 Neutrophile Elastase und Thrombozytenaggregation

Die Sezernierung von ELA2 aus den Granula kann die Thrombozytenaggregation verstärken. So führte *in vitro* die Exposition von Thrombozyten mit verschiedenen Elastasen zu einer erhöhten Expression von Fibrinogen-bindenden Stellen auf den Thrombozyten^{57,58}.

Catepsin G, das gleichzeitig mit ELA2 aus den Granula sezerniert wird, aktiviert die Thrombozytenaggregation primär, während ELA2 sie verstärkt. Si-Tahar et al. geht daher davon aus, dass die Liganden-bindende Tasche des GPIIb/IIIa-Komplex im inaktiven Zustand nicht zugänglich ist für Liganden wie Fibrinogen. ELA2 ist in der Lage, proteolytisch ein Oligopeptid mit der Größe von 19 Aminosäuren zwischen der Asparaginsäure 838 und

Arginin 856 herauszuschneiden. Der Rezeptorkomplex geht dadurch in einen aktiven Zustand über.

Si-Tahar et al.⁵⁹ beschreiben, dass ELA2 in der Lage ist, die Fibrinogen-bindende Aktivität durch eine Proteolyse der GPIIb-Untereinheit zwischen den Aminosäuren Val837 und Asp838 hochzuregulieren (Abb. 6). Diese Aktivierung führt zu einer Potenzierung der Cathepsin G-abhängigen Thrombozytenaggregation.

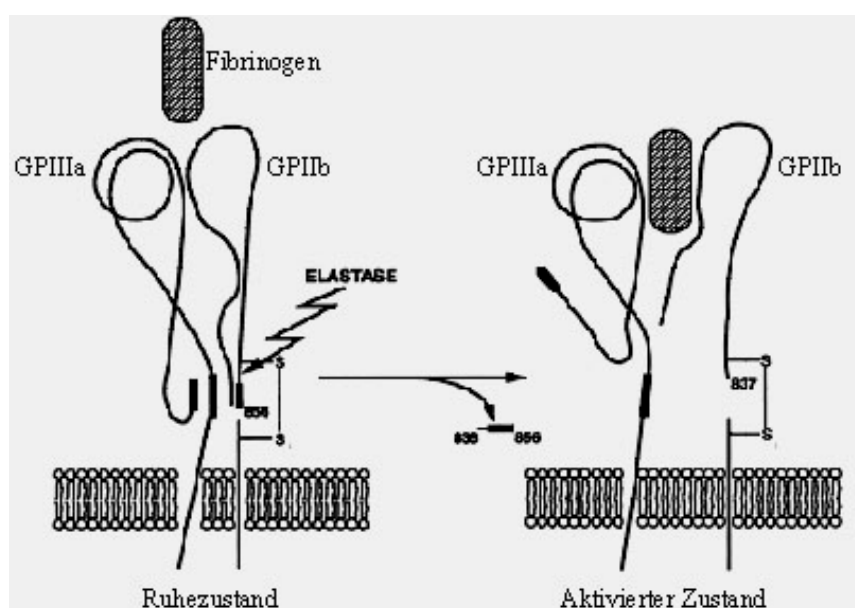


Abb. 6: Schematische Darstellung der Aktivierung von GPIIb/IIIa durch ELA 2

durch Proteolyse der GPIIb-Untereinheit zwischen den Aminosäuren Val837 und Asp838 wird der Rezeptor zur Aufnahme des Liganden Fibrinogen aktiviert. Modifiziert nach Si-Tahar et al.⁵⁹

Cathepsin G und Elastase werden als prozessierte, katalytisch aktive Enzyme gespeichert und nach Aktivierung der Granulozyten freigesetzt. Durch Spaltung oder limitierte Proteolyse können sie die Eigenschaften anderer, gleichzeitig freigesetzter Proteine modulieren. Unter anderem können sie z. B. nach Degranulation eine proteolytische Kaskade auslösen, die zur Aktivierung latenter Matrix-Metalloproteasen führt. Die proteolytische (aber auch autolytische) Regulation der Aktivität von Serinproteasen durch andere Serinproteasen ist zudem ein weit verbreiteter Mechanismus v.a. in der Blutgerinnungskaskade⁶⁰.

3.6.5 Molekulargenetische Bedeutung der Neutrophilen Elastase

Die oben beschriebene Aktivierung der Thrombozytenaggregation durch die neutrale Protease ELA2 führt zu der Hypothese, dass genetische Varianten im Gen für ELA2 zu einer veränderten Aggregation beim ACS führen könnten. ELA2 wird hierdurch zu einem Kandidatengen für diese Phänotypen.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit gab es keine Untersuchungen zu der Assoziation zwischen genetischen Varianten im ELA2-Gen und des ACS. Obwohl zahlreiche genetische Varianten, vor allem Mutationen, bekannt sind, die zu einer seltenen erblichen Erkrankung, einer schwerwiegend angeborenen Neutropenie (severe congenital neutropenia, auch Kostmann Syndrom) führen⁶¹. Bisher gibt es jedoch noch keinen systematischen Ansatz der versucht, eine Assoziation zwischen möglichen genetischen Varianten dieses Gens mit Myokardinfarkt und verwandten kardiovaskulären Phänotypen herzustellen.

4 Fragestellung

Mit dieser Arbeit sollte die Genstruktur der drei Kandidatengene α -Fibrinogen, γ -Fibrinogen und Neutrophile Elastase analysiert werden, da deren Proteine in den pathophysiologischen Prozess der Thrombusbildung bei der Ausbildung akuter Koronarsyndrome involviert sind.

1. Zunächst sollten die Promotor- und kodierenden Regionen (soweit bekannt) der Gene α - und γ -Fibrinogen sowie Neutrophile Elastase (ELA2) nach genetischen Varianten untersucht werden, da über die Bedeutung von genetischen Varianten in diesen Genen bei der Ausbildung akuter Koronarsyndrome bislang nichts bekannt ist. Mögliche Polymorphismen in diesen drei Kandidatengenen könnten einen Einfluss auf die unterschiedliche Aktivität oder Bindung der Liganden an den Glykoproteinrezeptor GPIIb/IIIa haben und zu einer veränderten Thrombozytenaggregation führen. Die Folge wäre ein verändertes Risiko der Ausbildung akuter Koronarsyndrome.
2. Identifizierte genetische Polymorphismen sollten in zur Verfügung stehenden Populationen untersucht und die Assoziationen einzelner Polymorphismen und Haplotypkombination von Polymorphismen mit dem Phänotypen des akuten Koronarsyndroms korreliert werden.
3. Anschließend sollten funktionelle Unterschiede in der Transkription von möglichen Polymorphismen im Promotor der Gene mittels Reporteranalysen untersucht werden.

Die vorgestellte Promotionsarbeit soll somit zu einem besseren Verständnis der Genotyp-Phänotyp-Beziehungen bei kardiovaskulären Erkrankungen beitragen und die genetische Identifizierung von Risikogruppen ermöglichen.