

3 Fragestellungen der vorgestellten Arbeiten

Die vorliegende Arbeit untersucht, inwieweit hereditäre Varianten in Kandidatengenen der Thrombozytenfunktion, der plasmatischen Blutgerinnung sowie der vaskulären Homöostase:

1. eine Assoziation zum koronaren Risiko
2. eine Assoziation zu kardiovaskulären Ereignissen in der Folge von koronaren therapeutischen Katheterinterventionen

aufweisen.

ad 1:

Speziell untersucht wurden dabei die Genotypfrequenzen in der KHK- und Kontrollgruppe. Des Weiteren wurden Stratifizierungen hinsichtlich folgender prädefinierter Subgruppen vorgenommen:

1-, 2- und 3-Gefäßerkrankung

Akutes Koronarsyndrom

Akuter Myokardinfarkt

Frühe Manifestation der Erkrankung

Niedrig-Risiko-Gruppe

ad 2:

Speziell untersucht wurden die Genotypfrequenzen in der Gruppe der 673 Patienten, die sich einer therapeutischen Katheterintervention unterzogen und dabei den kombinierten 30-Tage-Endpunkt erreichten im Vergleich zur Gruppe der Patienten, die dabei keine Komplikationen erlitten.

Kandidatengene

Neben dem Manifestationsalter der KHK und deren Schweregrad ist zu erwarten, dass auch der Verlauf und die Komplikationsrate nach dem definierten Gefäßwandtrauma in Folge einer Katheterintervention einer genetischen Disposition unterliegen. Zur Untersuchung dieser Fragen konzentrierten wir uns insbesondere auf eine Auswahl von Kandidatengenen des plasmatischen und thrombozytären Blutgerinnungssystems bzw. der Thrombozyten, auf Regulatoren der Gefäßhomöostase und auf Gene, die bekannte Risikofaktoren der Arteriosklerose modifizieren.

Thrombozyten:

Thrombozyten spielen in der Atherogenese, bei Plaqueruptur und konsekutiven akuten Koronarsyndromen sowie beim Gefäßwandtrauma durch interventionelle Kathethertherapien – wie Ballondilatation und Stent-Implantation – eine entscheidende Rolle¹⁹. Infolge der Gefäßwandläsion und/oder Plaqueruptur kommt es zur Plättchenadhäsion im betroffenen Wandsegment. Entscheidend bei der Adhäsion sind thrombozytäre Membranglykoproteine, die an Komponenten der freiliegenden subendothelialen Matrix wie den von Willebrand Faktor und Kollagene – insbesondere Typ 1 und Typ 3 – binden²⁰. Der erste Kontakt findet dabei zwischen dem thrombozytären Glykoprotein-Ib/IX/V-Rezeptor-Komplex und dem freiliegenden von Willebrand Faktor statt. Dabei gehen die Thrombozyten in ein „rolling“ an der Gefäßwand über²¹. Im nächsten Schritt erfolgt durch Interaktion von subendothelialen Kollagenen mit den Glykoproteinrezeptoren Ia/IIa und VI eine stabile Adhäsion²². Nach Formänderung und Aktivierung der Plättchen kommt es zur Expression von P-Selektin und Aktivierung des Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptors. In einem weiteren Schritt folgt die primäre und sekundäre Aggregation der Thrombozyten über Fibrinogenbrücken sowie die Formation eines plättchenreichen Thrombus²³. Aufgrund dieser zentralen Bedeutung der Thrombozyten untersuchten wir Polymorphismen im Glykoprotein IIIa, im Glykoprotein Ia sowie im Glykoprotein Ib unter den o. g. Fragestellungen.

Glykoprotein IIIa

Der Glykoprotein IIb/IIIa Rezeptor gehört zur Gruppe der β_3 -Integrine und bindet im aktivierten Zustand Fibrinogen. Er ist mit ein bis zwei Prozent des Gesamtproteingehalts und ca. 80.000 Kopien pro Zelle das häufigste Membranglykoprotein der Thrombozyten. Der Rezeptor besteht aus den zwei 150 und 90 kDa Proteinen IIb und IIIa, die über Disulfidbrücken nicht-kovalent aneinander gebunden sind²⁴. 70 % der Rezeptoren sind konstitutiv an der Oberfläche der Thrombozyten exprimiert und 30 % werden nach Aktivierung aus intrazellulären Speichern an die Oberfläche befördert²⁵. Die wesentliche Funktion des GP IIb/IIIa Rezeptors ist die Bindung von Fibrinogen an die Oberfläche des aktivierten Thrombozyten und damit die Initiierung der Plättchenaggregation. In den letzten Jahren wurde die günstige Wirkung von Inhibitoren des Glykoprotein IIb/IIIa Rezeptors zur Verhinderung von Komplikationen bei akutem Koronarem Syndrom und bei

Hochrisiko-Katheterinterventionen in zahlreichen Studien belegt²⁶. Wir stellten uns daher die Frage, ob der A1/A2 (Leu33Pro) Polymorphismus des Glykoprotein IIIa Gens mit einem erhöhten prozeduralen Interventionsrisiko einhergeht und ob er in dem chronischen Verlauf der KHK eine Rolle spielt.

Glykoprotein Ia

Der Kollagenrezeptor Glykoprotein Ia/IIa ist mit 100 – 3000 Kopien pro Thrombozyt deutlich geringer repräsentiert²⁷, wobei die Expressionslevel differieren können²⁸. GP Ia/IIa bindet dabei Typ 1 Kollagen²⁹. Ein C807T-Polymorphismus in Exon 7 und ein G873A-Polymorphismus in Exon 8 des Alpha-2-Gens scheinen die Expressionslevel des Proteins im Sinne einer „gain of function“ zu beeinflussen³⁰. Für das 807T-Allel fand sich bei jungen Frauen eine Assoziation zu ischämischem Apoplex³¹. Zur kardiovaskulären Mortalität zeigte sich in einer großen holländischen Kohorten-Studie mit über 12.000 Frauen kein Exzessrisiko für die Gesamtgruppe³². Hingegen wies die Subgruppe der Raucherinnen ein erhöhtes Risiko (OR = 2,2) auf, während sich für Patientinnen mit Diabetes oder Mikroalbuminurie lediglich Trends fanden.

In Bezug auf ein erhöhtes Infarktrisiko von homozygoten 807T-Allel Trägern liefern größere Studien widersprüchliche Ergebnisse: Während eine Untersuchung mit 2237 Männern mit Infarktmanifestation im Alter unter 62 Jahren ein um 57 % erhöhtes Risiko und bei früher Infarktmanifestation unter 49 Jahren ein um 62 % erhöhtes Risiko beschrieb³³, fand eine andere Fallkontrollstudie mit 1.210 Patienten mit sehr früher Infarktmanifestation (unter 45 Jahren) keine Assoziation³⁴. Wir untersuchten in unserer Studie den 807-TT-Genotyp als prozeduralen Risikofaktor bei Koronarinterventionen.

Glykoprotein Ib

Das Glykoprotein-Ib α wird mit ca. 25.000 Kopien/Plättchen exprimiert³⁵ und bildet in Form des Glykoprotein-Ib/IX/V-Rezeptor-Komplexes - wie oben beschrieben - durch Bindung an den von Willebrand Faktor den Initialschritt der Plättchenadhäsion³⁶. Glykoprotein-Ib α ist polymorph, funktionell bedeutsame Mutationen mit einer schlechteren Bindung an den von Willebrand Faktor sind Grundlage des Bernard-Soulier Syndroms³⁷. In der japanischen Bevölkerung wurde erstmals ein „variable number of tandem repeat“ (VNTR) Polymorphismus mit 1 - 4 tandems von jeweils 39 Basenpaaren beschrieben^{38, 39}. Zur

funktionellen Bedeutung dieser Varianten ist bis dato nichts bekannt. Mit ihm im linkage disequilibrium befindet sich der „single nucleotide polymorphism“ C434T, der durch einen Aminosäureaustausch in Position 145 (T -> M) in der Bindungsregion des von Willebrand Faktors charakterisiert ist ⁴⁰.

Wir untersuchten den 1999 erstmals beschriebenen T/C Polymorphismus in der Kozak-Sequenz des I β α -Glykoproteingens ⁴¹, der in Position -5 upstream des Initiator-ATG lokalisiert ist. In vitro Experimente zeigten dabei eine erhöhte GP Ib-Rezeptordichte, die mit einer verbesserten Translationseffizienz erklärt wurde.

Plasmatische Gerinnung:

Plaquerupturen sind wesentlich an der Progression der Koronaren Herzerkrankung und an deren Komplikationen wie instabile Angina pectoris und akuter Myokardinfarkt beteiligt. Dabei werden dem vorbeistömenden Blut subendotheliale Strukturen präsentiert, die neben der Aktivierung von Thrombozyten zu einer Initiierung des extrinsischen Wegs der plasmatischen Gerinnungskaskade über „tissue factor“ führt.

Faktor VII

Der Gerinnungsfaktor VII ist eine Vitamin K abhängige Protease, die bei der Initiierung der Koagulationskaskade eine entscheidende Rolle spielt. Bei Bindung an „tissue factor“, der bei Gefäßläsionen in der subendothelialen Matrix präsentiert wird, erfolgt die Spaltung zu aktiviertem Faktor VIIa, der seinerseits Faktor X aktiviert und somit den extrinsischen Weg der Gerinnung anstößt ⁴²⁻⁴⁴. Schon 1986 beschrieb eine Studie eine Assoziation zwischen der Faktor VII Aktivität und dem Auftreten von tödlichen Myokardinfarkten ⁴⁵. Im Gegensatz dazu waren aber mehrere neuere populationsbasierte Studien ⁴⁶ in Bezug auf Faktor VII Aktivität und Infarktrisiko in ihren Aussagen uneinheitlich.

Die Faktor VII Aktivität wird von einem Polymorphismus in der Promotorregion des Faktor VII Gens wesentlich mitbestimmt: Arg353Gln ist funktionell ⁴⁷ und geht mit einer Reduktion der Enzymaktivität von bis zu 30 % einher ⁴⁸. Wir untersuchten daher diesen Polymorphismus im Hinblick auf die oben definierten Fragestellungen.

Gefäßregulation:

Bereits in der frühen Phase der Atherogenese kommt der endothelialen Dysfunktion eine entscheidende Bedeutung zu⁴⁹. Wesentlich zu der dabei charakteristisch eingeschränkten Vasomotion trägt das sich ausbildende Ungleichgewicht zwischen endogenen Vasokonstriktoren wie Angiotensin II oder Endothelin I zu Lasten endogener Vasodilatoren, insbesondere dem Stickstoffmonoxid, bei⁵⁰. Auch bei noch normaler NO Produktion ist die Bioverfügbarkeit von NO durch das verstärkte Auftreten von Sauerstoffradikalen (oxidativer Stress) in der Atherogenese eingeschränkt⁵¹. Exemplarisch untersuchten wir Varianten der folgenden Gene.

Angiotensin II Typ 1 Rezeptor

Der Angiotensin II Typ 1 Rezeptor spielt in der Gefäßwand eine wesentliche Rolle: Zusätzlich zu systemischen Effekten wie Vasokonstriktion mediiert der Angiotensin II Typ 1 Rezeptor lokal proinflammatorische und proliferative atherogene Eigenschaften von Angiotensin II im gewebsständigen Renin-Angiotensin-Aldosteron System⁵². Es handelt sich dabei um einen G-Protein gekoppelten Rezeptor, für den ein A1166C Polymorphismus beschrieben wurde⁵³. Für das C-Allel wurde eine Assoziation zur beschleunigten Abnahme der Nierenfunktion bei nierenkranken Patienten⁵⁴, zu höherem systolischen Blutdruck in sonst normotensiven Individuen⁵⁵ und vermehrter linksventrikulärer Hypertrophie berichtet⁵⁶. Zur funktionellen Bedeutung gibt es Daten, die auf eine vermehrte Ansprechbarkeit auf Angiotensin II, stärker ausgeprägt bei Männern als bei Frauen, hinweisen⁵⁷. Wir untersuchten die Assoziation dieses Polymorphismus zum 30-Tage-Endpunkt nach koronarer Katheterintervention.

Endotheliale NO Synthase

Die endotheliale NO Synthase ist das Schlüsselenzym der vaskulären Homoöstatik⁵⁸. Ihr Produkt, Stickstoffmonoxid, spielt eine zentrale Rolle in der Regulation der Vasomotion und wirkt über unterschiedliche Mechanismen antiatherogen⁵⁹. Eine verringerte Bioverfügbarkeit von NO⁶⁰, z. B. unter Einfluß von Risikofaktoren wie Rauchen⁶¹, bedingt eine

endotheliale Dysfunktion⁶² und stellt einen sehr frühen und wesentlichen Schritt in der Entstehung der Arteriosklerose dar⁶³. Im Tiermodell der eNOS knock-out Maus konnte gezeigt werden, dass diese unabhängig von der Höhe ihres Blutdrucks verstärkt Arteriosklerose entwickelt⁶⁴. Es sind mehrere hereditäre eNOS Varianten (Glu298Asp, -786T>C, intron-4 VNTR, intron-13 CA repeat) bekannt⁶⁵; wir konzentrierten uns auf den bislang kaum untersuchten CA repeat Polymorphismus in Intron 13 des eNOS Gens als möglichen hereditären Risikofaktor für die KHK.

ENOS und Hyperhomocysteinämie

Homocysteinämie interagiert auf verschiedene Weise mit dem NO System, eine Hyperhomocysteinämie bedingt durch Verminderung der eNOS Aktivität und der NO Bioverfügbarkeit eine endotheliale Dysfunktion⁶⁶. Erhöhte Homocysteinspiegel führen zu einer Erhöhung des oxidativen Stress⁶⁷ und wirken prokoagulatorisch⁶⁸. Auf dem Boden des in der vorigen Arbeit dargelegten funktionellen CA repeat Polymorphismus in Intron 13 der endothelialen NO Synthase untersuchten wir in dieser Studie, ob eine Gen-Umwelt-Interaktion zwischen Homocystein und dem Polymorphismus besteht. Wir fokussierten dabei auf die besondere Situation des akuten Koronaren Syndroms, in dem die prokoagulatorische Aktivierung eine besondere Bedeutung besitzt.

Methylentetrahydrofolsäure Reduktase und Hyperhomocysteinämie

In mehreren Studien wurde die Rolle hoher Homocysteinspiegel als atherogener Risikofaktor etabliert⁶⁹. Ein Schlüsselenzym im Remethylenisierungszyklus des Homocysteins ist die Methylentetrahydrofolsäure Reduktase (MTHFR). 1988 wurde eine thermolabile Variante der MTHFR beschrieben⁷⁰, die eine um 50 % niedrigere Enzymaktivität aufweist. Als Ursache dafür konnte 1995 der C⁶⁷⁷T Polymorphismus in Exon 4 identifiziert werden⁷¹. Mehrere Assoziationsstudien zeigen, dass homozygote Individuen der 677T Variante höhere Homocysteinspiegel haben⁷². Im nächsten Schritt untersuchten mehrere Studien den C⁶⁷⁷T Polymorphismus als koronaren Risikofaktor, wobei die Aussagen hinsichtlich des KHK Risikos und des Infarkt Risikos widersprüchlich blieben⁷³. Zwei weitere Polymorphismen, A¹²⁹⁸C und T¹³¹⁷C, wurden im MTHFR Gen identifiziert^{74,75}; es existieren jedoch nur sehr spärliche Daten zu ihrer Bedeutung als hereditäre atherogene Risikofaktoren. Wir untersuchten diese drei Varianten des MTHFR Gens als Determi-

nanten des Plasmahomocysteinspiegels sowie als hereditäre Risikofaktoren der KHK.

In einer weiteren Arbeit wurden hohe Homocysteinspiegel ($> 15 \mu\text{mol/l}$) per se als Risikofaktor für Katheterinterventionen unabhängig von Genotypen untersucht.

G-Protein $\beta 3$

Mehrere bedeutende atherogene Mechanismen werden via G-Protein gekoppelte Signalwege vermittelt⁷⁶: Dazu gehören die verstärkte Vasokonstriktion durch Katecholamine, Angiotensin II und Endothelin 1⁷⁷. Darüber hinaus wird über mehrere Rezeptoren G-Protein-gekoppelt die Proliferation glatter Muskelzellen⁷⁸ und Intimahyperplasie⁷⁹ induziert. Zusätzlich kommt es über diesen Signalweg zu einer Aktivierung der ADP-abhängigen Thrombozytenaggregation⁸⁰. Die $\beta 3$ -Untereinheit des G-Proteins ist Bestandteil des heterotrimeren Komplexes des inhibierenden $G_{(i)}$ -Proteins. Für dieses Gen (GNB3) wurde eine Mutation in Exon 10 (C⁸²⁵T) beschrieben, die mit alternativem Splicing der Prä-/Pro-mRNA assoziiert ist⁸¹. Die Splice-Variante verstärkt dabei offensichtlich agonistische Signale im Sinne verstärkter Vasokonstriktion und Hypertrophie⁸². In Übereinstimmung mit diesen Befunden wurde eine Assoziation dieses Polymorphismus mit arterieller Hypertonie⁸³ sowie mit einer diastolischen Funktionsstörung⁸⁴ beschrieben. Wir untersuchten diese Variante im Hinblick auf das prozedurale Risiko nach Katheterinterventionen.

Paraoxonase

Oxidativer Stress spielt in der Atherogenese eine bedeutsame Rolle⁸⁵, insbesondere wird der atherogenen Wirkung von oxidiertem Low-Density-Lipoprotein eine zentrale Bedeutung zugeschrieben⁸⁶. Paraoxonase 1, eine an HDL gebundene Aryl-dialkyl-Phosphatase, reduziert die Entstehung von LDL-Peroxiden⁸⁷. Im Tiermodell der Paraoxonase knock-out Maus konnte das vermehrte Auftreten von Atherosklerose gezeigt werden⁸⁸. Im Paraoxonase 1 Gen sind zwei Polymorphismen im Codon 55 (L55M) bzw. 192 (Q192R) bekannt, die eine unterschiedliche Enzymaktivität bedingen⁸⁹. Kleinere Studien haben gezeigt, daß dies möglicherweise mit einem unterschiedlichen Risiko für Koronare Herzerkrankung assoziiert ist⁹⁰. Wir untersuchten beide Polymorphismen und daraus resultierende Haplotypen in unserem Patientenkollektiv als atherogene Risikofaktoren.

β3-Adrenorezeptor

Der β3 Adrenorezeptor spielt eine wesentliche Rolle in der katecholamin-induzierten Lipolyse und besitzt pathophysiologische Bedeutung in der Entwicklung eines metabolischen Syndroms⁹¹. Es finden sich Hinweise, dass die Trp64Arg Mutation im β3 Adrenorezeptor Gen mit einer vermehrten Gewichtszunahme, einer verstärkten Insulinresistenz und einer frühen Manifestation des Typ 2 Diabetes assoziiert ist⁹². Da diese Faktoren potentiell atherogen sind, prüften wir die Bedeutung dieser Mutation als Risikofaktor für die KHK.

Leptin steht unter zentraler Kontrolle und ist ein wesentlicher Regulator des Körpergewichts⁹³. Es gibt eine enge Korrelation zwischen Leptin- und Insulinspiegeln; Patienten mit Insulinresistenz haben gleichzeitig höhere Leptinwerte⁹⁴. Leptin korreliert offensichtlich mit Markern des metabolischen Syndroms wie Triglyzeride und Apolipoprotein B sowie mit dem systolischen Blutdruck⁹⁵. Des weiteren finden sich Korrelationen mit inflammatorischen Markern wie CrP⁹⁶. In der vorliegenden Arbeit stellten wir uns die Frage, inwieweit Leptinspiegel mit dem Koronaren Risiko korrelieren. Da die Trp64Arg Mutation im β3 Adrenorezeptor Gen ähnliche Korrelationen zeigt, prüften wir ferner, inwieweit diese Mutation eine Determinante der Leptinspiegel ist.