

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik

Tübingen

Abteilung Innere Medizin III

(Schwerpunkt: Kardiologie und Angiologie)

**Einfluss von genetischen Varianten im platelet endothelial
aggregation receptor 1- Gen auf die Prognose und
Thrombozytenfunktion bei Patienten mit koronarer
Herzerkrankung**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Bauer, Maike Christine

2020

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. T. Geisler
2. Berichterstatter: Professorin Dr. L. Quintanilla Martinez de Fend

Tag der Disputation: 10.12.2020

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	11
1.1. Koronare Herzerkrankung.....	11
1.1.1. Definition.....	11
1.1.2. Pathophysiologie.....	11
1.1.3. Kardiovaskuläre Risikofaktoren	13
1.1.4. Klinik.....	13
1.1.5. Stabile Angina pectoris.....	13
1.2. Akutes Koronarsyndrom	15
1.2.1. Definition.....	15
1.2.2. Pathogenese.....	15
1.2.3. Klinik.....	15
1.3. Thrombozyten	17
1.3.1. Rolle.....	17
1.3.2. Morphologie.....	17
1.3.3. Pathomechanismus.....	17
1.4. Antithrombozytäre Therapie.....	20
1.4.1. Substanzen	20
1.5. PEAR1.....	24
1.6. Ziel.....	26
2. Material und Methoden	27
2.1. Material.....	27
2.1.1. Patientenkollektiv.....	27
2.1.2. Studienprotokoll.....	27
2.1.3. Follow-up	29
2.1.4. Geräte, Verbrauchsmaterialien und Software	29
2.1.5. Reagenzien	31
2.2. Methoden	32
2.2.1. Blutentnahme.....	32
2.2.2. Impedanzaggregometrie mittels Multiplate®-System.....	32
2.2.3. Genotypisierung	36

2.2.4.	Statistische Auswertung.....	37
3.	Ergebnisse.....	39
3.1.	Charakterisierung der Studienpopulation	39
3.2.1.	rs12566888	40
3.2.2.	rs2768759	42
3.2.3.	rs41273215	43
3.3.	Ergebnisse der Genotypisierung bezogen auf den primären Endpunkt	46
3.4.	Ergebnisse der Geotypisierung bezogen auf den sekundären Endpunkt.....	51
3.5	Ergebnisse der Thrombozytenfunktionsanalyse in Abhängigkeit vom Genotyp	52
4.	Diskussion.....	57
4.1.	Allgemeines.....	57
4.2.	Auswirkungen von <i>PEAR1</i> Genvarianten auf Thrombozyten	57
4.3.	Auswirkungen von <i>PEAR1</i> Genvarianten auf Endothelzellen	59
4.4.	Auswirkungen von <i>PEAR1</i> SNPs bei Patienten unter Medikation mit Thrombozytenaggregationshemmern	59
4.5.	Auswirkungn von <i>PEAR1</i> SNPs auf Thrombozytengröße und –anzahl.....	60
4.6.	Auswirkungen von <i>PEAR1</i> SNPs bei Patienten unter Medikation mit Thrombozytenaggregationshemmern auf die Thombozytenfunktion	61
4.7.	Auswirkungen von <i>PEAR1</i> SNPs bei Patienten unter Medikation mit Thrombozytenaggregationshemmern und mit vorausgegangener PCI.....	62
4.8.	Auswirkungen von <i>PEAR1</i> SNPs bei Patienten unter Medikation mit Thrombozytenaggregationshemmern und vorausgegangener PCI auf Thrombozytenfunktion	64
4.9.	Limitationen der Studie.....	64
4.10.	Schlussfolgerung	65
5.	Zusammenfassung	67
5.1.	Hintergrund und Fragestellung.....	67
5.2.	Ergebnisse.....	67
5.3.	Schlussfolgerung	68
6.	Literaturverzeichnis	70
7.	Erklärungen zum Eigenanteil.....	75
8.	Publikationen	76

9.	Anhang.....	77
9.1.	Abbildungsverzeichnis.....	77
9.3.	Danksagung	79
9.4.	Lebenslauf.....	80

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AA	engl.: arachidonic acid (Arachidonsäure)
Abb	Abbildung
ACE	engl.: Angiotensin converting enzyme (Angiotensinkonvertierendes Enzym)
ACS	engl.: Acute coronary syndrome (Akutes Koronarsyndrom)
ACVRL1	Activin A receptor like type 1
ADP	Adenosindiphosphat
ANG2	Angiopoetin 2
AP	Angina Pectoris
ASS	Acetylsalicylsäure
AT I	Angiotensin I
ATP	Adenosintriphosphat
AU	engl.: Aggregation units (Einheit der Thrombozytenaggregation)
AUC	engl.: Area under the curve (Integralfläche)
BMS	engl.: Bare Metal Stent (Metallstent)
Bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
Ca.	circa
CABG	engl.: coronary artery bypass graft (Koronararterielle Bypass- Operation)
CAD	engl.: Coronary Artery Disease (koronare Herzkrankheit)
CAM	engl.: Cellular Adhesion Molecule
CCS	Canadian Cardiovascular Society
CI	Confidence Intervall
CK-MB	Creatinkinase-Myokardtyp
Col	Kollagen
COPD	engl.: Chronic obstructive pulmonary disease (chronisch obstruktive Lungenerkrankung)
COX	Cyclooxygenase
CPTP	Cyclopentyl-Triazolopyrimidine

CT	Computertomographie
CVRF	engl.: cardiovascular risk factors (kardiovaskuläre Risikofaktoren)
DAPT	duale antithrombozytäre Therapie
d.h.	das heißt
DES	engl.: Drug Eluting Stent (mit Medikamenten beschichteter Stent)
DNA	engl.: Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EKG	Elektrokardiogramm
fl	Femtoliter
G	Guanin
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GP	Glykoproteinrezeptor
GWAS	genomweite Assoziationsstudie
h	Stunde
HAEC	Human Aorta Endothelial Cell
HDL	engl.: high density lipoprotein (Lipoprotein mit hoher Dichte)
HR	Hazard Ratio
HWE	Hardy-Weinberg-Equilibrium
hz	homozygot
IAP	Instabile Angina pectoris
ICAM-1	engl.: Intercellular adhesion molecule 1 (Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IR	engl.: incident rate (Inzidenzrate)
i.v.	lat.: intra vena (intravenöse Medikamenteneinnahme)
KHK	Koronare Herzerkrankung
LD	engl.: linkage disequilibrium (Kopplungsungleichgewicht)
LDL	engl.: low density lipoprotein (Lipoprotein mit niedriger Dichte)
LTA	Lichttransmissionsaggregometrie
LVEF	Linksventrikuläre Ejektions Fraktion
MAF	Majorallelfrequenz

mAk	monoklonaler Antikörper
MALDI	Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung
MEA	Multiple electrode aggregometry
MCP	engl.: monocyte chemoattraction protein 1 (Monozyten chemotaktisches Protein 1)
MMP	Metalloproteinase
min	Minute
MI	Myokardinfarkt
ml	Milliliter
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
MS	Massenspektrometrie
mV	Millivolt
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
NSAID	engl.: non-steroidal anti-inflammatory drug (nichtsteroidales Antirheumatikum)
NSTE-ACS	engl.: acute coronary syndrome with Non-ST-elevation (akutes Koronarsyndrom ohne ST-Strecken-Hebung)
NSTEMI	engl.: Non-ST-elevation myocardial infarction (Nicht-ST-Hebungsinfarkt)
OR	engl.: odds ratio (Quotenverhältnis)
p.o.	lat.: per os (orale Medikamenteneinnahme)
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PCI	engl.: percutaneous coronary intervention (perkutane Koronarintervention)
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PEAR1	Platelet Endothelial Aggregation Receptor 1
PGI	Prostaglandin I
PJ/PY	Patientenjahre/ engl.: Patientyear
PR	engl.: Platelet reactivity (Thrombozytenreaktivität)
PSGL1	P-Selectin Glykoprotein Ligand 1

PTCA	Perkutane transluminale Koronarangioplastie
PTFE	Polytetrafluorethylen
r	Korrelationseffizient
RF	Risikofaktoren
RNA	Ribonukleinsäure
SD	engl.: standard deviation (Standardabweichung)
SMC	engl.: Smooth Muscle Cell (glatte Muskelzelle)
SNP	engl.: Single Nucleotid Polymorphismus (Einzelnukleotid-Polymorphismus)
STE-ACS	engl.: acute coronary syndrome with ST-elevation (akutes Koronarsyndrom mit ST-Strecken-Hebung)
STEMI	engl.: ST-elevation myocardial infarction (ST-Hebungsinfarkt)
T	Thymin
TJ	Tight Junctions
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNT	Troponin T
TOF	engl.: time of flight (Flugzeitanalyse)
TRAP	Thrombinrezeptor-aktivierendes Protein
TTP	Thrombotisch-thrombozytopenischer Purpura (Moschcowitz-Syndrom)
TuePIC	Tuebingen platelet investigative consortium
TXA₂	Thromboxan A ₂
VLDL	engl.: very low-density lipoprotein (Lipoprotein mit sehr niedriger Dichte)
vWF	von Willebrand Faktor
WHO	engl.: World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
WMW	Wilcoxon-Mann-Whitney
z.B.	zum Beispiel
μl	Mikroliter

1. Einleitung

1.1. Koronare Herzerkrankung

Trotz aller Forschungsfortschritte im Bereich der Herz- und Kreislauferkrankungen sind diese immer noch Haupttodesursache der westlichen Welt. Laut statistischem Bundesamt stellten sie im Jahre 2013 mit 39,7% den größten Anteil an Sterbefällen in Deutschland dar. Davon verstarben 13,3 % der Frauen und 15,6% der Männer an ischämischen Herzerkrankungen.¹

1.1.1. Definition

Die KHK wird durch eine Verengung der Herzkranzgefäße hervorgerufen. Dies führt zu einer Minderdurchblutung des Herzmuskels, was zu einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffverbrauch, einer Myokardischämie führt. In den meisten Fällen liegt der Myokardischämie eine Atherosklerose der Koronararterien zugrunde. Dabei handelt es sich um eine chronische, fortschreitende Entzündung der Koronargefäße, charakterisiert durch Lipidanlagerung, extrazelluläre fibröse Matrix und eingewanderte inflammatorische Zellen.²

Eine Myokardischämie kann jedoch auch durch eine Aortenstenose oder Koronarspasmen hervorgerufen werden.^{3 4 5}

1.1.2. Pathophysiologie

Der Arteriosklerose liegt ein chronischer Entzündungszustand der Gefäßintima zugrunde.⁶

Auslöser ist wahrscheinlich eine Endothelzellläsion. Diese kann beispielsweise durch mechanische Reizung bei Hypertonie entstehen.⁵ Thrombozyten lagern sich an solche Mikroläsionen an und setzen Mediatorsubstanzen, wie Adhäsionsmoleküle, Zytokine oder chemotaktische Stoffe, frei. Dadurch wandern Makrophagen ins Gewebe ein und proliferieren.

Durch Aufnahme von oxidierten LDL und VLDL-Molekülen entstehen Schaumzellen („foam cells“), welche als sogenannte „Fatty streaks“ die erste Vorstufe der Atherosklerose darstellen.⁷ Die „Fatty streaks“ sind klinisch nicht signifikant und reversibel.

Sie können in der Aorta und den Koronararterien schon in den ersten Dekaden festgestellt werden. Aus ihnen können sich jedoch sogenannte „fibrous lesions“ bzw. Plaques entwickeln, indem es zur fibrotischen Umwandlung der Initialläsion kommt. Dabei wandern glatte Muskelzellen in das Gewebe ein und bilden mit extrazellulärer kollagenreicher Matrix eine fibröse Kappe um die lipidreichen Zelltrümmer der zugrunde gegangenen Makrophagen.⁷

Diverse Risikofaktoren scheinen die Entstehung einer fibrotischen Läsion zu begünstigen. Dazu zählen ein erhöhter Homocysteinspiegel⁸ und erhöhter Blutdruck⁹. Andere Faktoren, wie zum Beispiel Östrogene, können die HDL Konzentration erhöhen und die LDL Konzentration erniedrigen, wodurch sie das Risiko an einer Atherosklerose senken.¹⁰

In weiteren Stadien können diese Plaques kalzifizieren und an der luminalen Seite ulzerieren.⁷

Bei Belastungen kann der Bedarf an Sauerstoff des Herzens bis zum 4-fachen ansteigen. Um diesem erhöhten Bedarf gerecht zu werden dilatieren die Koronargefäße. Bei herzgesunden Patienten kann die Perfusion über Erweiterung der Herzkranzgefäße (Koronarreserve) um das 4-fache ansteigen. Umso weiter die Atherosklerose der Koronarien fortschreitet, umso geringer wird die Koronarreserve. Ist diese bei an KHK erkrankten Patienten soweit reduziert, dass die Durchblutung nur noch verdoppelt werden kann, führt dies unter Belastung zu einer Myokardischämie. Der Patient beginnt unter körperlichen Belastungen – der Angina pectoris zu leiden.⁵

Angina pectoris Beschwerden werden wahrscheinlich durch Adenosin hervorgerufen, was vom ischämischen Myokard abgegeben wird und die A1-Rezeptoren der kardialen Nervenendigungen stimuliert.¹¹

Kommt es zur Ulzeration und Ausdünnung der fibrösen Kappe, entsteht eine vulnerable Plaque. Bei deren Ruptur kommt der Plaquekern mit der Blutbahn in Kontakt und es entsteht ein Thrombus, der einen Verschluss der Koronararterien bewirken kann, wodurch es zu einem akuten Myokardinfarkt kommt.⁷

1.1.3. Kardiovaskuläre Risikofaktoren

Für die vorzeitige Arteriosklerose gibt es beeinflussbare und nicht beeinflussbare kardiovaskuläre Risikofaktoren (RF). Zu den beeinflussbaren RF gehören LDL-Cholesterin-Erhöhung, HDL-Cholesterin-Erniedrigung, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Nikotinabusus, Übergewicht und Bewegungsmangel. Zu den nicht beeinflussbaren RF zählen genetische Disposition, männliches Geschlecht und Alter.⁵

1.1.4. Klinik

Die hervorgerufene Myokardischämie kann entweder symptomlos verlaufen (stumme Ischämie), was zum Beispiel bei Diabetikern und älteren Patienten der Fall sein kann oder es kommt zur symptomatischen KHK. Diese kann sich äußern als stabile Angina pectoris, akutes Koronarsyndrom (ACS), ischämische Herzmuskelschädigung, Herzrhythmusstörungen oder plötzlicher Herztod.⁵

Das wichtigste klinische Leitsymptom der Myokardischämie ist die Angina pectoris. Sie äußert sich durch retrosternalen Schmerz, Druck oder Engegefühl. Außerdem strahlen die Schmerzen häufig in den linken Arm, Unterkiefer, Schultern, Rücken und selten auch in den Bauchraum aus.⁵

1.1.5. Stabile Angina pectoris

Bei der stabilen Angina pectoris (SAP) werden diese Beschwerden oft durch körperliche Anstrengung, emotionalen Stress, Tachykardie, Kälte oder opulente Mahlzeiten hervorgerufen. Sie ebbten wenige Minuten nach Beendigung der Belastung oder nach Gabe von Nitroglycerin ab.³

Die Canadian Cardiovascular Society (CCS) teilt die Angina pectoris in 4 Schweregrade ein:

Tabelle 1: Einteilung Schweregrade der Angina Pectoris der Canadian Cardiovascular Society (CCS)¹²

Grad I	Symptomatik bei schwerer körperlicher Belastung, nicht bei normalen Aktivitäten wie gehen oder Treppen steigen
Grad II	Symptomatik bei moderater körperlicher Belastung, beim schnellen Gehen und Treppen steigen, bergauf gehen, bzw. unter extremeren Konditionen wie nach dem Essen, bei Kälte oder bei emotionalem Stress
Grad III	Symptomatik bei leichter körperlicher Belastung
Grad IV	Symptomatik in Ruhe

1.2. Akutes Koronarsyndrom

1.2.1. Definition

Unter dem ACS werden 3 Entitäten zusammengefasst, die durch die gleiche Ätiologie entstehen: die instabile Angina pectoris (IAP), der Myokardinfarkt ohne ST-Strecken-Hebung (NSTEMI) und der transmurale Myokardinfarkt mit ST-Strecken-Hebung (STEMI).

Bei dem akuten Koronarsyndrom handelt es sich um eine akute Manifestation einer kardialen Ischämie, bei der eine Ruptur bzw. eine Erosion einer vorbestehenden arteriosklerotischen Plaque vorliegt. Wie bei der stabilen Angina pectoris liegt ein Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffverbrauch und Sauerstoffangebot des Herzmuskels vor. Im Gegensatz dazu treten hier die Symptome allerdings nicht nur bei Belastung, sondern auch im Ruhezustand auf. Außerdem können sich die Beschwerden hier zusätzlich im EKG manifestieren und im Falle einer Myokardischämie können Herzenzyme im Blut nachgewiesen werden, die diagnostisch als Nekrosemarker dienen. Bei dem akuten Koronarsyndrom ohne ST-Strecken-Hebung können sich im EKG deszendierender ST-Segmente oder präterminale T-Negativierungen zeigen. Beim akuten Koronarsyndrom mit ST-Strecken-Hebung zeigen sich analog des Namens Hebungen im Bereich der ST-Strecke.^{5,13}

1.2.2. Pathogenese

Das ACS ist eine akute Manifestation der KHK. Durch Ruptur und Erosion einer vulnerablen Plaque kommt diese mit der freien Blutbahn in Kontakt und es kommt zu Thrombozytenaktivierung und-aggregation.¹³ Es bildet sich ein Thrombus, durch den es zu einem Verschluss der Koronarien kommt. Dadurch kommt es wie bei der SAP zu einem Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffzufuhr.¹³

1.2.3. Klinik

Führendes Symptom ist die Angina pectoris. Patienten klagen häufig über einen akuten Thoraxschmerz.¹⁴

Über ein Elektrokardiogramm (EKG) werden Betroffene in zwei Untergruppen aufgeteilt:

- Akutes Koronarsyndrom ohne ST-Strecken-Hebung (NSTE-ACS):
Hierzu zählen der Myokardinfarkt ohne ST-Strecken-Hebung (NSTEMI) und die instabile Angina pectoris (IAP).
Beim NSTEMI ist ein deutlicher Anstieg der kardialen Nekrosemarker, Troponin und CK-MB, im Blut zu messen.⁵ Zudem zeigt das EKG ST-Strecken-Senkungen, abnorme T-Wellen oder einen unauffälligen Befund.¹⁴ Bei der IAP bestehen die Beschwerden ohne Troponin-Anstieg.⁵

- Akutes Koronarsyndrom mit ST-Strecken-Hebung (STE-ACS):
Der ST-Strecken-Hebungsinfarkt (STEMI) kennzeichnet sich durch kompletten Gefäßverschluss mit Troponin-Anstieg und persistierender ST-Strecke über mehr als 20 Minuten.¹⁴ ¹³ Um eine schnelle Reperfusion zu gewährleisten, ist eine PTCA (Perkutane Transluminale Coronare Angioplastie) einzuleiten.

1.3. Thrombozyten

1.3.1. Rolle

Die Thrombozyten spielen bei der Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen eine entscheidende Rolle, indem sie sowohl die Entstehung einer Arteriosklerose, als auch die Thrombenbildung beeinflussen.¹⁵

1.3.2. Morphologie

Die Thrombozyten sind mit einem Durchmesser von circa 2-4 μm die kleinsten Zellen im Blutsystem.¹⁶ In einem μl Blut befinden sich 150.000 bis 300.000 Thrombozyten.¹⁷ Sie zirkulieren 7-10 Tage in der Blutbahn bis sie schließlich vom Monozyten-Makrophagen-System der Milz abgebaut werden, sofern sie nicht vorher an der Hämostase oder Thrombenbildung beteiligt waren.¹⁸ Thrombozyten entstehen im Knochenmark durch Abschnürungen von Megakaryozyten, die sich wiederum aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen entwickeln (Hämatopoese).¹⁹

1.3.3. Pathomechanismus

Unter physiologischen Bedingungen binden Thrombozyten nicht an das vaskuläre Endothel (Abb. 1: A).²⁰ Tritt allerdings eine Schädigung des Endothels auf, so werden die subendothelial gelegenen Membranproteine, wie der von Willebrand-Faktor (vWF) und Kollagen (Col), freigelegt und treten mit der Blutbahn in Kontakt.¹⁵ Ein Komplex der Glykoproteine (GP) Ib/V/IX der Thrombozyten bindet an den vWF und GP XI bindet an Col, wodurch eine Bindung zwischen Endothel und Thrombozyt entsteht (Abb. 1: B+C).¹⁵ Dadurch werden die Thrombozyten aktiviert, setzen ihre Granula frei, welche aus thrombozytenaktivierenden Substanzen wie ADP, Thromboxan A_2 und Serotonin bestehen (Abb. 1: D). Weitere Thrombozyten werden aktiviert und rekrutiert. Durch Kontakt mit subendothelialen Kollagenfasern, ADP und Adrenalin kommt es auf der Thrombozytenmembran zu einer Konformationsänderung der Glykoproteine. So entsteht der GP IIb/IIIa-Komplex, wodurch ein Netz aus Fibrinogen die Thrombozyten untereinander irreversibel verbindet (Abb. 1: E+F).^{20, 21} Es entsteht ein primärer noch instabiler Thrombozytenpfropf.

Die Thrombozyten sezernieren weiter Mikropartikel, die die Bildung von Thrombin aus Prothrombin und damit die Fibrinnetzstehung katalysieren (Abb. 1: E), wodurch der Plättchenthrombus zusätzlich stabilisiert wird.²¹

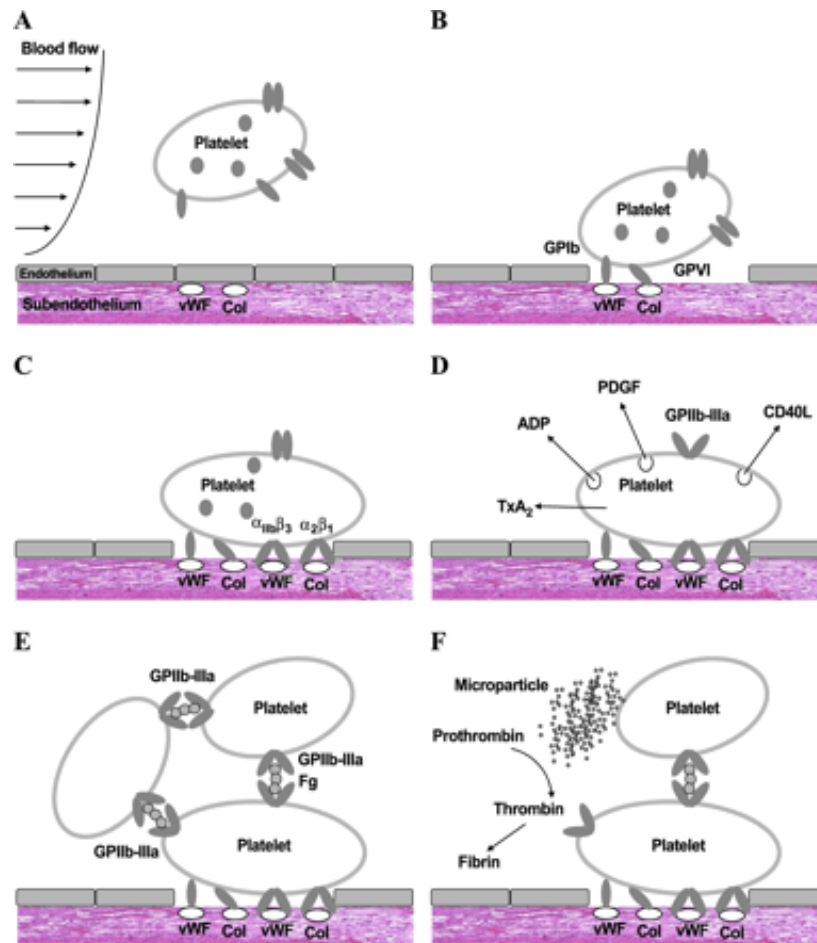


Abbildung 1: Mechanismus der Thrombozytenadhäsion und -aggregation

Col: Kollagen, vWF: von Willebrand-Faktor; GP: Glykoprotein; Quelle: modifiziert nach Gawaz 2004²¹

Dieser Prozess der primären Hämostase spielt bei der Inflammation und Atherogenese eine bedeutende Rolle. Adhärente, aktivierte Thrombozyten sezernieren proinflammatorische Mediatoren wie P-Selectin und CD40L. Hierdurch werden zirkulierende Leukozyten rekrutiert und an das geschädigte Endothel gebunden (Abbildung 2).¹⁵

Es kommt zu einer entzündlichen Reaktion über Rezeptorinteraktion und die Monozyten und Makrophagen transmigrieren durch das dysfunktionale Endothel in die Intima. Durch Phagozytose von oxidiertem Low Density Lipoprotein (LDL) werden diese zu sogenannten Schaumzellen. Im Folgenden kommt es zu Einlagerungen von weiteren Makrophagen, Leukozyten und Lipiden, wodurch eine fibröse Plaque mit Lipidkern entsteht, welche durch Lumeneinengung den Blutfluss behindert und durch Ruptur zu einem Thrombus führen kann.²⁰

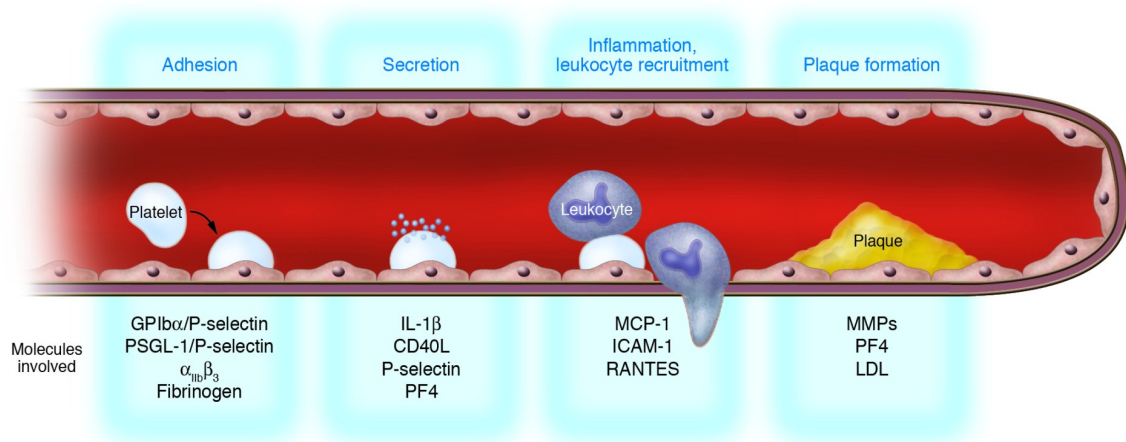


Abbildung 2: schematische Darstellung von Thrombozyten bei Entzündungsreaktionen und bei der Entstehung von Atherosklerose

GPIIb/IIIa: Glycoprotein IIb/IIIa, PSGL-1: P-selectin glycoprotein ligand-1, IL-1 β : Interleukin-1 β , PF4: Platelet factor 4, MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1, ICAM-1: Intercellular adhesion molecule-1, RANTES: Regulated on activation, normal T expressed and secreted, MMPs: Matrix metalloproteinase, LDL: Low density lipoprotein; Quelle: modifiziert nach Gawaz 2005¹⁵

1.4. Antithrombozytäre Therapie

Die antithrombozytäre Therapie ist ein wichtiger Ansatz zur Prophylaxe von arteriosklerotischen Plaques und zur Therapie der ACS. Die Thrombozytenfunktion lässt sich durch verschiedene Substanzklassen irreversibel oder reversibel beeinflussen. Die verschiedenen Medikamentenklassen greifen die unterschiedlichen Mechanismen der Thrombozytenaktivierung an. Über die 3 Hauptklassen (Acetylsalicylsäure, Fibrinogen-Rezeptor-Antagonisten und ADP-Rezeptor-Antagonisten) werden intrazelluläre Aktivierungsmechanismen oder Rezeptoren an der Thrombozytenoberfläche gehemmt.

1.4.1. Substanzen

1.4.1.1. ASS (Cyclooxygenase-Hemmer)

Acetylsalicylsäure gilt als Standardmedikation bei der Dauertherapie von koronarer Herzkrankheit um die Thrombozytenaggregation zu hemmen.²²

Die Wirkweise beruht auf der irreversiblen Hemmung der Cyclooxygenasen. In kleineren Dosen bis zu 100mg wird hauptsächlich die COX-1 gehemmt, wodurch wiederum die Prostaglandin H₂ Synthese gehemmt wird. Dadurch wird die Bildung des Botenstoffs Thromboxan A₂ verhindert. Thromboxan A₂ fördert die Thrombozytenaggregation und konstringiert gleichzeitig die Gefäße. Die Hemmung der COX durch ASS erfolgt irreversibel.²²

Da Thrombozyten keinen Zellkern haben, können sie keine Enzyme nachbilden, weswegen sie für ihre Lebensdauer von ca. 8 Tagen inaktiviert sind. Da allerdings die normale Hämostase schon bei einer Funktionsfähigkeit von 20% der Thrombozyten wiederbeginnen kann, ist eine tägliche Einnahme notwendig. Um eine Dauerprävention zu erreichen sollte die tägliche Dosis 75-150mg betragen.²²

Die präventive Gabe von ASS führt nachweislich zu einer signifikanten Reduktion der Thrombenbildung und damit Mortalität bei Hoch-Risiko-Patienten mit koronarer Herzkrankheit.^{23, 22}

1.4.1.2. ADP-Rezeptor-Antagonisten/ Thienopyridine/ P2Y₁₂-Rezeptor-Antagonisten

Zur Gruppe der Thienopyridine gehören Ticlopidin, Clopidogrel und Prasugrel.²² In Kombination mit ASS werden sie als duale antithrombozytäre Therapie (DAPT) bei Myokardinfarktpatienten im ersten Jahr oder nach koronarer Stentimplantation angewandt.²²

Sie sind sogenannte Prodrugs und werden erst in der Leber durch das Cytochrom P450-System oxidiert und hydrolysiert und somit zu ihrem aktiven Metaboliten umgewandelt.²⁴ Dieser hemmt selektiv die Bindung von ADP an die Thrombozytenoberfläche über den P2Y₁₂-Rezeptor, wodurch die Thrombozytenaktivierung unterbunden wird.²² Somit wird die Thrombozytenaggregation untereinander über den Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptor unterbunden.¹⁷ Die Blockierung erfolgt irreversibel.²⁴

Da das früher eingesetzte Ticlopidin zu unerwünschten lebensbedrohlichen Blutbildveränderungen wie Neutropenie und Thrombotisch-Thrombozytopenischer Purpura (TTP, Moschcowitz-Syndrom) führen kann, wurde es durch Clopidogrel ersetzt, welches nicht zu diesem Nebenwirkungsprofil führt.²² Prasugrel ist die dritte Generation der Thienopyridine. Es hat bessere antithrombozytäre Effekte, weniger interindividuelle Unterschiede bezüglich des Therapieansprechens und eine geringere Verzögerungszeit bis zum Wirkeintritt verglichen mit Clopidogrel.²⁵ In klinischen Studien ergab sich zwar ein höherer antithrombozytärer Effekt aber auch eine deutlich höhere Blutungsneigung vor allem bei Patienten höheren Alters, geringeren Gewichts oder mit vorausgegangen Infarkt. Deshalb ist Prasugrel heute für Patienten mit akutem Koronarsyndrom und akzeptablem Blutungsrisiko vorgesehen.²⁵

Bei einer täglichen Gabe von 75mg Clopidogrel dauert es 3-7 Tage bis die maximale Thrombozyteninhibition erreicht ist. Deshalb wird eine Initialdosis von 300-600 mg Clopidogrel empfohlen, wobei es nach 2 Stunden zu relevanten Inaktivierungen der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation kommt und nach 6 Stunden das Maximum erreicht ist.²²

Die Aufsättigungsdosis für Prasugrel beträgt 60 mg, woraufhin täglich 10 mg empfohlen werden.²⁶ Im Vergleich zu Clopidogrel wirkt Prasugrel schneller und es kommt zu einer stärkeren Thrombozytenhemmung, das zwar auch ein Prodrug ist, jedoch nur eine Biotransformation durchlaufen muss. 30 Minuten nach Einnahme kommt es schon zu einem Wirkeintritt.²⁷

Ebenfalls zur Gruppe der P2Y₁₂-Rezeptor-Antagonisten gehörig ist Ticagrelor, ein Cyclopentyltriazolo-Pyrimidine (CPTP). Im Gegensatz zu den Thienopyridinen wird Ticagrelor schon im aktiven Zustand aufgenommen, weshalb es keiner weiteren Metabolisierung in der Leber bedarf. Der Wirkeintritt wird nicht verzögert, sodass es nach 30 Minuten zur Wirkung kommt.²⁷ Da Ticagrelor den P2Y₁₂-Rezeptor im Gegensatz zu Clopidogrel und Prasugrel reversibel hemmt, liegt die Thrombozytenfunktion nach Absetzen in 1-3 Tagen wieder normal vor.²⁸

Bei Ticagrelor beträgt die Aufsättigungsdosis 180mg und die Erhaltungsdosis 90 mg zwei Mal täglich. Verglichen mit Clopidogrel ist der antithrombozytäre Effekt von Ticagrelor schneller und stärker. Die Blutungsneigung ist hingegen etwa gleich. Studien haben gezeigt, dass Ticagrelor nur mit geringen Dosen ASS (bis 100mg) eingenommen werden sollte, da ansonsten der antithrombozytäre Effekt vermindert wird.²⁸

Laut ESC-Leitlinien wird Ticagrelor bei moderatem bis hohem Risiko für ischämische Ereignisse empfohlen, unabhängig der initialen Therapie und auch bei Clopidogrel vorbehandelt wurde.¹⁴

1.4.1.3. Fibrinogenrezeptorantagonisten/GP IIb/IIIa-Rezeptor-Blocker

Die Fibrinogen-Rezeptor-Antagonisten blockieren die Endstrecke der Thrombozytenaggregation, unabhängig von dem Auslöser der Thrombozytenaktivierung.²² Der Fibrinogenrezeptor GP IIb/IIIa kommt ausschließlich auf der Membranoberfläche von Thrombozyten vor, weswegen er einen potenten selektiven Thrombozytenhemmer darstellt.²⁴ Die Fibrinogen-Rezeptor-Antagonisten blockieren den GP IIb/IIIa-Rezeptor irreversibel und hemmen somit die Fibrinogenvermittelte Aggregation aktivierter Thrombozyten.²⁴

Es werden 3 Klassen unterschieden: Abciximab, ein murines Antikörperfragment, das eine hohe Bindungsaffinität zum GP IIb/IIIa-Rezeptor besitzt, Tirofiban ein synthetisches Peptidomimetikum und Eptifibatid (Integrilin) ein Strukturteil von Fibrinogen, das an den GP IIb/IIIa Rezeptor bindet.^{24,22}

Die Fibrinogenrezeptor-Antagonisten werden intravenös verabreicht. Nach einer Initialdosis folgt eine kontinuierliche Verabreichung bis zu 72 Stunden. 24 Stunden nach Beenden der Infusion sind bereits mehr als die Hälfte der Thrombozyten reaktiviert. Nach 2 Tagen erholt sich die Thrombozytenfunktion.²²

Empfohlen wird eine Therapie mit den Fibrinogenrezeptor-Antagonisten in Kombination mit ASS und Heparin bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom, bei denen eine PCI durchgeführt wird. Die Initialdosis sollte 24 Stunden vor dem Eingriff verabreicht werden und postinterventionell bis zu 12 Stunden mit Abciximab bzw. 24 Stunden mit Tirofiban oder Eptifibatid weitergeführt werden.²²

Vor allem Patienten mit Diabetes profitieren von der Behandlung mit den GP IIb/IIIa Rezeptoren.²²

1.5. PEAR1

1.5.1. Allgemeines

In vorherigen Studien, die mit dem Ziel neue an der Thrombozytenaggregation beteiligte Membranproteine zu identifizieren, wurde PEAR1 (Platelet endothelial aggregation receptor 1) entdeckt.^{29, 30}

Bioinformatische Auswertungen ergaben, dass PEAR1 zur Familie der Typ-I-Transmembranproteine gehört und Sequenzen epidermalen EGF (engl: epidermal growth factor) enthält. In der extrazellulären Domäne enthält es 15 EGF-Wiederholungen und in der intrazellulären Domäne enthält es 5 prolinreiche Domänen. Es konnte gezeigt werden, dass PEAR1 auf Thrombozyten und Endothelzellen exprimiert wird.²⁹

Dextransulfate aktivieren PEAR1 direkt und induzieren somit die Thrombozytenaggregation.³¹

1.5.2. Aktuelle Studienlage

Diverse genomweite Assoziationsstudien (GWAS) zeigen Zusammenhänge zwischen Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl: single-nucleotide polymorphisms, SNPs) des *PEAR1*-Gens und der Thrombozytenfunktion:

In einer Studie von Herrera-Galeano wurden US-Amerikaner europäischer und afrikanischer Herkunft auf genetische *PEAR1* Polymorphismen und deren Assoziation mit Agonisten-induzierter Thrombozytenaggregation untersucht. Hierbei wurde zwischen gesunden Patienten und Patienten mit Einnahme von ASS differenziert. Es wurde festgestellt, dass *PEAR1* rs2768759 mit den meisten Thrombozytenaggregations-Phänotypen assoziiert ist. Dabei war die Prävalenz für den CC-Genotyp bei europäisch-stämmigen Probanden über 25-mal höher. Der CC-Genotyp war bei Probanden ohne Medikation sowohl bei den europäisch- als auch bei den afrikanisch-stämmigen Patienten mit einer erhöhten Thrombozytenaggregation im Beisein von Kollagen, Epinephrin und ADP verbunden. Bei der Einnahme von niedrig dosiertem ASS war dieser Effekt nochmal signifikant stärker. Folgend ließ sich ein Zusammenhang zwischen dem C-Allel und reduzierter Thrombozytenantwort auf ASS vermuten.³²

In einer Studie von Voora et al. wurde bei 3410 Patienten mit angiografisch bestätigter CAD (Stenose >75%) und ASS-Einnahme für dreieinhalb Jahre nachverfolgt und Assoziationen zwischen Ereignissen wie Myokardinfarkt, Schlaganfall oder Todesfall mit in-vitro Thrombozytenfunktion untersucht. Dabei konnte für kein untersuchtes SNP, darunter *PEAR1* rs2768759, ein höheres Risiko für das Auftreten oben genannter Ereignisse festgestellt werden.³³

Zum klinischen Outcome bei ACS mit PCI gibt es wenige Daten von Patienten, die unter KHK leiden und *PEAR1* SNPs tragen.³³

Die Auswirkungen genetischer Varianten des *PEAR1*-Gens auf die Thrombozytenantwort und das Outcome bei Patienten mit CAD und PCI unter P2Y₁₂-Rezeptor-Antagonisten-Therapie wurden bisher unzureichend untersucht.³⁴ In einer Studie von Xu K. et al wurden 2439 chinesische Probanden mit ACS oder KHK, bei denen eine Stentimplantation erfolgt war und welche Clopidogrel und ASS einnahmen, auf Assoziationen zwischen *PEAR1* rs12041331 und klinischem Outcome nach einer Follow-up-Zeit von 5 und 30 Tagen nach PCI untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass 38,3% der Probanden homozygote Träger des GG-Allels waren, 46,9% Träger des GA-Allels und 14,8 % des homozygoten AA-Allels. Bei den Trägern des homozygoten AA-Allels war das Risiko für kardiovaskuläre Events, wie Myokardinfarkt, Schlaganfall und Todesfall signifikant höher, als bei den nicht homozygoten AA-Allel Trägern. Des Weiteren war die Thrombozytenaggregation induziert durch ADP signifikant niedriger bei Trägern des homozygoten AA-Allels.³⁵

Langzeitdaten liegen nicht vor.

1.6. Ziel

Nach PCI werden Patienten mit einer dualen antithrombozytären Therapie behandelt, um durch Thrombozytenaggregationshemmung Stentthrombosen zu vermeiden.

Trotz leitliniengetreuer Therapie mittels DAPT nach erfolgter PCI treten bei den Patienten häufig im klinischen Verlauf Myokardinfarkt, Schlaganfall und andere Todesursachen auf.

In diversen Studien konnte eine Heterogenität bei nativen Thrombozyten, sowie bei Thrombozyten unter dem Einfluss von Thrombozytenaggregationshemmern, festgestellt werden.^{36,37,38} Gründe für die phänotypische Heterogenität sind nicht vollständig bekannt, genetische Faktoren sollen jedoch eine entscheidende Rolle spielen.

In vorherigen Studien konnte *PEAR1* als ein Membranprotein identifiziert werden, dass Einfluss auf die Thrombozytenaggregation hat.^{29,30} In darauffolgenden Studien wurden die Auswirkungen genetischer Phänotypen von *PEAR1* auf die Thrombozytenfunktion bei gesunden Probanden, sowie bei Probanden mit ASS-Einnahme untersucht.^{32,33}

Zu den Auswirkungen von SNPs im *PEAR1* Gen bei Patienten mit vorangegangener PCI und Einnahme einer dualen antithrombozytären Therapie liegen bisher wenige Studien vor. Um Risikopatienten zu identifizieren und eventuell Rückschlüsse auf die individuelle Prognose ziehen zu können, wurden in dieser Studie 582 solcher Patienten untersucht. Hierbei lag der Fokus darauf, folgende Punkte zu untersuchen:

1. Welche Auswirkungen haben die verschiedenen *PEAR1* SNPs auf den primären Endpunkt, bestehend aus Myokardinfarkt, Schlaganfall und anderen Todesursachen, sowie auf die sekundären Endpunkte: Myokardinfarkt, Schlaganfall und Tod?
2. Wie unterscheiden sich Major- und Minorallel verschiedener *PEAR1* SNPs bezüglich der in vitro Thrombozytenaggregation?

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Patientenkollektiv

An der medizinischen Universität Tübingen wurden von 2011 bis 2016 in der Abteilung für Innere Medizin III für Kardiologie und Angiologie (Ärztlicher Direktor Prof Dr. med. Meinrad Gawaz) 582 Patienten mit stabiler koronarer Herzerkrankung oder akutem Koronarsyndrom, die sich einer PCI unterzogen, konsekutiv untersucht. Im Rahmen der TuePIC-Studie (Tuebingen Platelet Investigative Consortium, Registernummer NCT01417884) wurden die Patienten auf PEAR-1 Single-Nukleotid-Polymorphismen untersucht. Neben dem Vorliegen der o.g. Erkrankungen und der geplanten PCI waren ein Mindestalter von 18 Jahren und eine schriftliche Einverständniserklärung nach Aufklärung des Patienten zur Blutentnahme und genetischen Tests Einschlusskriterium der Studie. Die Studie wurde durch die Ethik-Kommission an der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität und am Universitätsklinikum Tübingen (Ethiknummer: 270/2011BO1) genehmigt und erfüllt die Declaration of Helsinki und die Guidelines for Good clinical practice der WHO.^{39,40}

2.1.2. Studienprotokoll

Nachdem der Patient aufgeklärt wurde und seine schriftliche Einwilligung unterzeichnet hatte, erfolgte die erste von insgesamt 2 Blutentnahmen. Diese erfolgten über eine venöse Punktion und wurden dann in ein Proberöhrchen abgefüllt, welches das Antikoagulans Lepirudin (25 µg/ml; Refludan, Dynabyte, Munich, Germany) enthielt

Die erste Blutentnahme erfolgte vor der PCI, um eine Plättchenfunktionsmessung vor der Einnahme von Thrombozytenaggregationshemmern durchführen zu können. Gemäß den aktuellen Leitlinien wurden die Patienten mit einer dualen antithrombozytären Therapie während der PCI wie folgt behandelt:

1. Aufsättigungsdosis mit ASS 500 mg i.v., anschließende Erhaltungsdosis von 100mg pro Tag per os (p.o.)

2. Initiale Aufsättigungsdosis mit Clopidogel 600mg p.o. oder bei vorbestehender Clopidogrel Therapie 300mg p.o., anschließende Erhaltungsdosis von 75 mg pro Tag p.o. für 12 Monate

oder

Initiale Aufsättigungsdosis mit Prasugrel 60 mg p.o., anschließende Erhaltungsdosis von 10 mg pro Tag p.o. für 12 Monate

oder

Initiale Aufsättigungsdosis mit Ticagrelor 180 mg p.o., anschließende Erhaltungsdosis von 2*90 mg pro Tag p.o. für 12 Monate

Im Anschluss erfolgte die therapeutische Stentimplantation bei der Koronarangiographie. Die zweite Blutentnahme erfolgte mindestens 2 Stunden, durchschnittlich 12 Stunden, nach erfolgter Aufsättigungsdosis zur erneuten Plättchenfunktionsmessung. Die beiden Thrombozytenfunktionsmessungen, induziert durch Adenosindiphosphat (ADP), Arachidonsäure (AA), Kollagen und Thrombinrezeptor-aktivierendes Peptid (TRAP), wurden jeweils mittels der Multiplate[®]-Impedanzaggregometrie (Multiplate[®]-Analyzer, ROCHE) durchgeführt. Die Aggregation wurde als Area under the curve of aggregation Units (AU) quantifiziert.

Leitliniengetreu erfolgte die Diagnose eines akuten Koronarsyndroms (ACS) wie folgt:

- Instabile Angina Pectoris (IAP): klinische Symptome wie Brustschmerz und EKG-Veränderungen ohne Anstieg von Nekrosemarkern
- Akuter Myokardinfarkt mit Anstieg von Nekrosemarkern, entweder mit Hebung (STEMI) oder ohne Hebung (NSTEMI) der ST-Strecke

Die Diagnose einer stabilen KHK bzw. stabilen Angina Pectoris erfolgte auf Grund von belastungsabhängigen, nicht im Ruhezustand auftretenden Thoraxschmerzen.

Weitere relevante Daten wurden den Patientenakten entnommen.

Nach einem ausführlichen Aufklärungsgespräch wurde die Unterschrift der Patienten auf der Einverständniserklärung eingeholt.

2.1.3. Follow-up

365 Tage nach der initialen PCI, wurden bei allen Patienten schwerwiegende kardiovaskuläre Ereignisse erfasst, darunter alle kardiovaskulären Todesursachen, Myokardinfarkte und ischämische Schlaganfälle. Der primäre Endpunkt wurde als kombinierter Endpunkt bestehend aus einem der oben genannten Events festgelegt. Als sekundärer Endpunkt wurde das alleinige Auftreten eines Todesfalls, Myokardinfarktes und ischämischen Schlaganfalls definiert. Dokumentiert wurde dabei sowohl das genaue Ereignis als auch der Zeitpunkt dieses Ereignisses, gemessen in Tagen nach Ersteinlieferung, und die durchgeführte Intervention der kardiologischen Abteilung.

Das Follow-up wurde über Telefonate und/oder über die Patientenakten bei Wiederaufnahme in die Klinik erfasst. Das Follow-up für den primären kombinierten Endpunkt wurde nach dem ersten Auftreten eines der vordefinierten Endpunkte beendet. Die Studie wurde als Blindstudie durchgeführt, sodass den Untersuchern die Ergebnisse der Genotypisierung und der Thrombozytenfunktionsmessungen nicht bekannt waren.

Bei 56 Patienten, die für *PEAR1* rs2768759 genotypisiert wurden (7,3%), und bei 54 Patienten, die für *PEAR1* rs12566888 genotypisiert wurden (7,1%), konnten keine Follow-up Daten erhoben werden. Diese Patienten unterschieden sich nicht signifikant bezüglich ihrer Baseline Charakteristika, verglichen mit den Patienten, die in der Studie verblieben sind.

2.1.4. Geräte, Verbrauchsmaterialien und Software

1. Blood collection tube 4,5 ml
[Refludan, Dynabyte, Munich, Germany]
2. VenisystemTM Butterfly® -21
3. Multiplate[®] -Analyzer
[Roche Diagnostics International Ltd, Rotkreuz, Schweiz]
4. Multiplate[®] -eLINE Pipette
[Roche Diagnostics International Ltd, Rotkreuz, Schweiz]
5. Multiplate[®] -Messzellen
[Roche Diagnostics International Ltd, Rotkreuz, Schweiz]

6. Multiplate[®] -Vorwärmrohrchen
[Roche Diagnostics International Ltd, Rotkreuz, Schweiz]
7. Aliquotgefäße ADPtest grün
[Roche Diagnostics International Ltd, Rotkreuz, Schweiz]
8. Aliquotgefäße ASPItest rot
[Roche Diagnostics International Ltd, Rotkreuz, Schweiz]
9. Aliquotgefäße TRAPtest gelb
[Roche Diagnostics International Ltd, Rotkreuz, Schweiz]
10. Aliquotgefäße Coltest grau
[Roche Diagnostics International Ltd, Rotkreuz, Schweiz]
11. Pipettenspitzen 200 µl
[SARSTEDT AG & Co, Nürnberg, Deutschland]
12. Ratiolab Pipettenspitzen blau 100-1000 µl
[Ratiolab GmbH, Dreieich, Deutschland]
13. Ratiolab Pipettenspitzen Kristall –E- 0,5- 20 µl
[Ratiolab GmbH, Dreieich, Deutschland]
14. Microsoft Office 2013
[Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA]
15. SPSS Statistics-Software
[Version 21.0, IBM/SPSS Inc., Chicago, IL, USA]
16. Zotero
[Version 5.0, Center for History and New Media, George Mason University, USA]
17. R-3.3.2
[Version 3.3.2, R-package, www.r-project.org, R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich]
18. Genetics_1.3.8.1
[Version 1.3.8.1, R-package, www.cran.r-project.org/web/packages/genetics, R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich]

19. Quantreg_5.33

[Version 5.33, R-package, www.cran.r-project.org/web/packages/quantreg, R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich]

20. SNPAssoc_1.9-2

[Version 1.9-2, R-package, www.cran.r-project.org/web/packages/SNPAssoc, R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich]

21. Survival_2.41-3

[Version 2.41-3, R-package, www.cran.r-project.org, R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich]

2.1.5. Reagenzien

1. Multiplate[®] ADPtest

Adensindiphosphat, lypholisierte [0,2 mM] Testreagenz

LOT-Nr. 665 733-32

[Roche Diagnostics International Ltd, Rotkreuz, Schweiz]

2. Multiplate[®] ASPItest

Arachidonsäure, lypholisierte [15 mM] Testreagenz

LOT-Nr. 665 725-31

[Roche Diagnostics International Ltd, Rotkreuz, Schweiz]

3. Multiplate[®] Traptest

TRAP-6, lypholisierte [1 mM] Testreagenz

LOT-Nr. 665 726-32

[Roche Diagnostics International Ltd, Rotkreuz, Schweiz]

4. Multiplate[®] Coltest

Kollagen, entsprechend der Aktivität von 0,1 mg/ml, Testreagenz

LOT-Nr. 665 733-32

[Roche Diagnostics International Ltd, Rotkreuz, Schweiz]

5. Isotonische Kochsalzlösung

[Fresenius Kabi GmbH, Deutschland]

2.2. Methoden

2.2.1. Blutentnahme

Bei dem Patientenkollektiv wurden je zwei Blutentnahmen durchgeführt. Eine während der Koronarangiographie und eine nach der Initialgabe von 600mg Clopidogrel und 500mg Aspirin (Aufsättigungsdosis) frühestens 6 Stunden nach dem Eingriff. Ein thrombozytenhemmender Effekt wurde somit ausreichend gewährleistet.

Die Blutentnahme erfolgte aus venösen Gefäßen. Das Vollblut wurde in 4,5ml Monovetten bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Die Monovetten enthielten 25µl/ml Lepirudin als Antikoagulans. Es wurde auf die korrekte Füllmenge geachtet, um das richtige Mischverhältnis zwischen Vollblut und Antikoagulans zu erreichen. So werden die Ergebnisse der Thrombozytenfunktionsmessung nicht beeinflusst. Die Blutprobe wurde bei Raumtemperatur 30 Minuten bis zur Messung im Röhrchen gelagert.

2.2.2. Impedanzaggregometrie mittels Multiplate®-System

Mit Hilfe des Multiplate®-Systems wird die Thrombozytenfunktion im Vollblut bestimmt, wobei sich die Namensgebung aus „multiple platelet function analyser“ herleitet. Über die Zugabe verschiedener Thrombozytenagonisten kann quantitativ die Thrombozytenfunktion und somit die Wirkung verschiedener Gerinnungshemmer patientenindividuell bestimmt werden.

Es stellt eine neue Methode dar, die auf der Weiterentwicklung der Impedanzaggregometrie von Cardinal und Flower, aus den 80er Jahren beruht.^{41,42} Sie verwendet die *multiple electrode aggregometry* (MEA). Die Thrombozytenaggregation erfolgt hierbei auf der Oberfläche ähnlich wie im menschlichen Körper.

Unter normalen Bedingungen zirkulieren die Thrombozyten inaktiv und frei im Blut. Durch bestimmte Agonisten werden sie aktiviert und exponieren Oberflächenrezeptoren, welche im menschlichen Organismus an Gefäßverletzungen adhären. Das Messprinzip des Multiplate®-Systems basiert darauf, dass die Thrombozyten hier an körperfremde Materialien, nämlich den Sensoreinheiten der Messzellen, adhären und somit deren Funktion bestimmt werden kann.

Die Impedanzaggregometrie wird in einer Einweg-Multiplate[®]-Messzelle analysiert. Diese Messzelle beinhaltet zwei Sensoreinheiten, jeweils bestehend aus einem silberbeschichteten Elektrodenpaar mit Kathode und Anode, und einen Polytetrafluorethylen (PTFE) –beschichteten Rührstab. Die Sensoreinheiten sind voneinander unabhängig und sorgen so bei jeder Messung für eine interne Qualitätskontrolle. Es kann in insgesamt 5 verschiedenen Messkanälen gleichzeitig gemessen werden. Über diverse Agonisten werden die Thrombozyten aktiviert, wodurch sie bestimmte Rezeptoren exprimieren und an der Sensoroberfläche der Multiplate[®]-Messzelle haften. Es bildet sich eine Isolationsschicht der aggregierten Thrombozyten auf der Sensoroberfläche, wodurch der elektrische Widerstand, also die Impedanz, zwischen den Elektroden erhöht wird. Die Zunahme des Widerstandes kann durch die Elektroden über Wechselspannung abgeleitet werden. Die Widerstandsänderung wird mit Hilfe der Multiplate[®]-Software gegen die Zeit in einer sogenannten Aggregationskurve aufgezeichnet. Die Fläche unter der Aggregationskurve (AU= „Area under the curve“) stellt somit ein Maß für die Plättchenaggregation pro Zeit dar (AU x min).

Über die zur Verfügung stehenden Agonisten ADP, ASPI, Col und TRAP kann die Thrombozytenfunktion und somit die Medikamentenwirkung diverser dem Patienten präoperativ verabreichten Gerinnungshemmer differenziert analysiert werden.

Im ADPtest wird dem Vollblut ADP [0,2 mM] hinzugefügt. Wenn der ADP-Rezeptor auf der Thrombozytenoberfläche nicht durch ein Medikament blockiert ist, wird er aktiviert und es kommt zur Aggregation. Durch Medikamente wie Clopidogrel, Prasugrel und andere Thienopyridine wird der wichtigste ADP-Rezeptor (P2Y₁₂) blockiert. Eine normwertige Aggregation würde also für eine unvollständige Blockade der ADP-Rezeptoren sprechen. Der Patient gehört dann zu den sogenannten „Non-Respondern“.

Beim ASPI-Test wird der Blutprobe Arachidonsäurereagenz [15 mM] hinzugefügt. Die Arachidonsäure ist das Substrat der Cyclooxygenase (COX). COX wiederum bildet Thromboxan A₂ (TXA₂), welches einen potenten Thrombozytenaktivator darstellt. Über COX-Hemmer wie ASS und NSAIDs wird die COX gehemmt.

Im TRAP-Test wird dem Patientenblut Thrombinrezeptor-aktivierendes Protein-6 (TRAP-6) [1 mM] hinzugefügt. Dieses bindet an den Thrombinrezeptor und aktiviert somit die Plättchenaggregation. So wird die Wirkung der GPIIb/IIIa-Antagonisten geprüft. Da TRAP-6 ein sehr potenter Thrombozytenaktivator ist, kann die Wirkung auch unter ASS- und Clopidogrelgabe getestet werden.

Beim COL-Test werden die Thrombozyten durch hinzugefügtes Kollagen aktiviert. Es kommt intrazellulär zur Freisetzung von Arachidonsäure, welche wiederum durch die COX zu TXA₂ umgewandelt wird. Dieses wird freigesetzt und aktiviert über den TXA₂-Rezeptor die Aggregation. Hiermit kann ebenfalls die Wirkung von ASS überprüft werden.⁴³

Nach der Blutentnahme wurde zwischen 30 Minuten und spätestens 3,5 Stunden die Thrombozytenfunktionsanalyse mittels Multiplate[®]-Analyzer durchgeführt. Hierbei wurde die Multiplate[®] elektronische E-line-Pipette verwendet, um jeweils die notwendige Menge an Reagenzien umzufüllen.

Zunächst wurden die Einwegmesszellen in den Heizblock des Gerätes eingesteckt um eine Messtemperatur von 37°C zu gewährleisten. Mit einer automatischen Pipette wurden dann 300µl 0,9%ige NaCl-Lösung zusammen mit 300µl des Vollblut-Hirudin-Gemischs in die jeweiligen Multiplate[®]-Messzellen pipettiert und für 3 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurde in die dafür vorgesehene Messzelle 20µl des vom Hersteller vorbereiteten jeweiligen Thrombozytenaktivators (ADPtest, ASPItest, TRAPtest und Coltest) hinzugegeben. Nun erfolgte die Impedanzmessung über 6 Minuten. Währenddessen wurden die Reagenzien mit 800 Umdrehungen pro Minute durch den magnetischen PTFE-beschichteten Rührstab gemischt. Es wurden pro Messzelle jeweils zwei Messaufzeichnungen durch die voneinander unabhängigen Elektrodenpaare durchgeführt.

Auf dem Bildschirm wurden die Aggregationskurven mit der *Area under the curve* (AUC) -Angabe angezeigt, sowie der Unterschied zwischen den beiden Einzelmessungen angegeben.

Sollten diese um mehr als 20% voneinander abgewichen sein, meldete dies die Software mit einer Fehlermeldung und die Messung musste wiederholt werden. Die Messergebnisse wurden mit Schaubildern der Aggregationskurven und AU-Angabe ausgedruckt.

Das Multiplate[®]-System zeichnet die Aggregationskurve auf. Die Widerstandsänderung wird in sogenannten *aggregation units* (AU) angegeben, wobei 8 AU etwa 1Ω entsprechen. Die berechnete Fläche unterhalb der Aggregationskurve (*area under the curve* = AUC) ist abhängig von der Geschwindigkeit der Aggregation und der maximal erreichten Aggregation. Die AUC wird in AU*min angegeben. Die Software bietet die Möglichkeit diese Einheit in „Units“ = U umzurechnen, wobei 10 AU*min = 1 U sind. Die Normwerte der Aggregation befinden sich im Bereich von 500-1500 AU*min. Aus Übersichtsgründen kann man die Fläche in U umrechnen. Zusätzlich berechnet die Multiplate[®]-Software die Aggregation, welche der maximalen Höhe der Kurve entspricht, und die Velocity, welche die maximale Steigung der Kurve angibt. Sie werden mit RUO („Research Use Only“) betitelt.

Die untenstehende Abbildung 3 zeigt Beispiele.

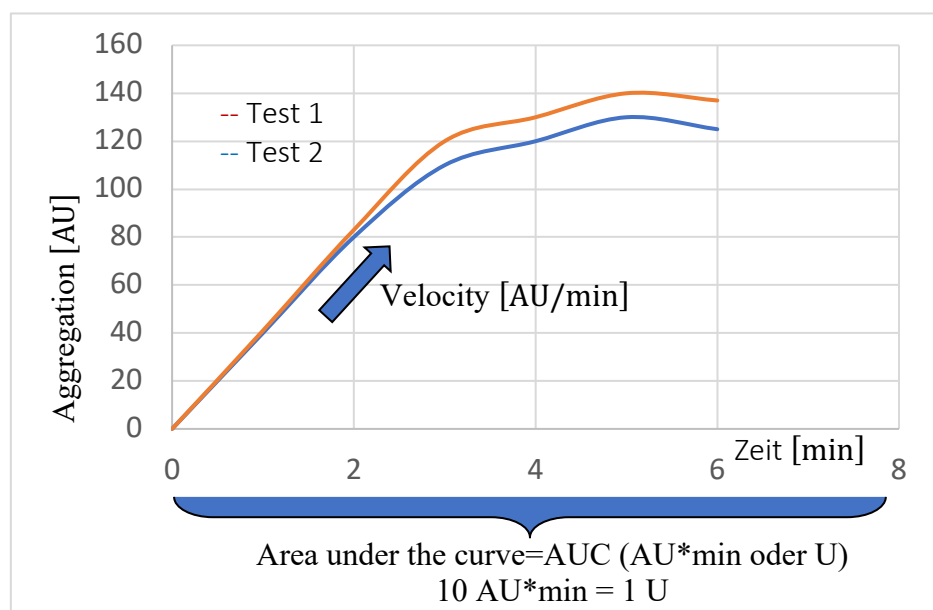


Abbildung 3: Aggregometrie Kurve mittels Multiplate[®]-System

AU: aggregation unit; min: Minute; AUC: Area under the curve; Velocity: (engl.) Geschwindigkeit

2.2.3. Genotypisierung

Sequenzierung von PEAR-1 (Margarete Fischer-Bosch-Institut Stuttgart Prof. Schwab) EDTA (Ethylenediamintetraessigsäure)- Blutproben wurden gesammelt und die Genom DNA wurde mit Hilfe des QIAmp® DNA Blood Mini Kit System (Qiagen, Hilden, Germany) isoliert.

Auf der Basis von systematischer Literatursuche, wurden Kandidaten, die Genvarianten des *PEAR1* von funktioneller bzw. klinischer Relevanz und repräsentative Allel Frequenzen aufwiesen, ausgewählt.⁴⁴ So wurden die folgenden Polymorphismen von *PEAR1* analysiert: rs12566888, rs2768759, rs41273215, rs3737224 und rs822442.

Während des Genotypisierungsvorgangs war das Studienpersonal, welches die Ergebnisse beurteilte, gegenüber den Genotypinformationen der Patienten verblindet.

Die Genotypisierung wurde mit Hilfe der Matrix-unterstützten Laser-Desorption/Ionisation Flugzeitmassenspektrometrie (MALDI-TOF MS) durchgeführt, wobei das MassARRAY® Compact System (Sequenom, CA, USA) verwendet wurde. Zur Qualitätskontrolle wurden 10% der Proben nochmals typisiert. In Tabelle 2 werden die Hauptallelfrequenzen dargestellt. Tabelle 3 zeigt das Kopplungsungleichgewicht (engl: Linkage disequilibrium, LD).

Tabelle 2: Majorallelfrequenzen der *PEAR1* Varianten rs12566888, rs2768759 and rs41273215 in der Kohorte verglichen mit dem 1000 Genomen Projekt (EUR, n=1006)

MAF=Majorallelfrequenz (engl: Major allele frequency), HWE=Hardy-Weinberg equilibrium, A=Adenin, C=Cytosin, T=Thymin, G=Guanin⁴⁵

	Allele	MAF	HWE <i>p</i> -Wert	MAF 100 Genomen; EUR
<i>PEAR1</i> rs12566888	G/T	91,1	0,439	90,8
<i>PEAR1</i> rs2768759	C/A	74,2	0,914	72,0
<i>PEAR1</i> rs41273215	C/T	88,5	0,0397	89,7

Tabelle 3: Kopplungsanalysen zwischen den *PEAR1* Varianten rs12566888, rs2768759, rs41273215, rs3737224 und rs822442

Der Korrelationskoeffizient (r) ist hellgrau markiert bei Werten $>0,4$ und dunkelgrau bei Werten $>0,8$; D = Korrelationskoeffizient, r = Korrelationskoeffizient, n = Anzahl an untersuchten Patienten⁴⁵

	<i>PEAR1</i> rs2768759	<i>PEAR1</i> rs41273215	<i>PEAR1</i> rs3727224	<i>PEAR1</i> rs822442
<i>PEAR1</i> rs12566888	D=0,779 r'=0,413 n=579	D=0,631 r'=-0,071 n=579	D=0,612 r'=-0,068 n=570	D=0,996 r'=-0,114 n=579
<i>PEAR1</i> rs2768759		D=0,417 r'=0,255 n=582	D=0,428 r'=0,259 n=573	D=0,410 r'=0,254 n=582
<i>PEAR1</i> rs41273215			D=0,973 r'=0,961 n=573	D=0,906 r'=0,894 n=582
<i>PEAR1</i> rs3737224				D=0,878 r'=0,856 n=573

2.2.4. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit IBM SPSS Statistics Version 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) und R-3.3.2⁴⁶, einschließlich genetics_1.3.8.1⁴⁷, quantreg_5.33⁴⁸, SNPAssoc_1.9-2⁴⁹, und survival_2.41-3⁵⁰ durchgeführt.

Retrospektiv wurden in unserer Kohorte genaue Tests des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts und des Kopplungsungleichgewichts zwischen den SNPs mit Hilfe des R-packages SNPAssoc und genetics berechnet.

Zusätzlich wurde LDlink (<https://analysistools.nci.nih.gov/LDlink>) genutzt, um das Kopplungsungleichgewicht in der vorliegenden Studie zu untersuchen. Das in dieser internetbasierten Anwendung genutzte Datenmaterial über Genotypen der Population entstammt dem 1000 Genomen Projekt (EUR, n=1006; Phase 3, V1; build 144; <http://www.internationalgenome.org>)^{51, 52}

In allen weiteren Auswertungen wurden die *PEAR1* SNPs in dominanten (homozygoten Trägern des Majorallels vs. Minorallelträger) oder rezessiven (Majorallelträger vs. homozygote Träger des Minorallels) genetischen Modellen untersucht. Assoziationen zwischen SNPs und Ereignisraten von primären und sekundären Endpunkten wurden

mit Hilfe des Fisher's exact Test beurteilt. Die Auswirkungen der SNPs auf plättchenassoziierte Endpunkte wurden durch den Wilcoxon-Mann-Whitney Test untersucht, sowie die mittlere Regression bezüglich der folgenden Kovariablen: P2Y₁₂ Antagonisten, Aufnahmegrund (stabile KHK/ ACS), arterielle Hypertension, Hyperlipidämie, Nikotinabusus, Diabetes mellitus, Medikation (ASA, ACE-Hemmer, β -Blocker, Statine), Alter, Geschlecht und LEVF.

Der Fisher's exact Test, sowie der Wilcoxon-Mann-Whitney Test wurden angewandt, um die Zusammenhänge zwischen SNPs und klinischen Variablen oder Baseline-Charakteristika zu untersuchen. Kaplan-Meier-Analysen und uni- bzw. multivariable Cox-Regressionsanalysen wurden genutzt um Assoziationen zwischen den Variablen, welche den o.g. der mittleren Regression entsprechen, und dem primären bzw. sekundären Endpunkt zu prüfen.

Alle statistischen Tests waren zweiseitig und das Signifikanzlevel wurde mit 5 % definiert. Wenn nicht anders angegeben, wurden p-Werte für multiple Tests nicht korrigiert.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der Studienpopulation

Im Rahmen der Studie wurden konsekutiv 582 Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit oder akutem Koronarsyndrom, bei denen eine PCI durchgeführt wurde und mit ASS und Clopidogrel, Prasugrel oder Ticagrelor behandelt wurden, auf Single-Nukleotid-Polymorphismen der thrombozytären Transmembranproteine *PEAR1* untersucht.

Über die Patientencharakteristika wurden Alter, Geschlecht, kardiovaskuläre Risikofaktoren, der Aufnahmegrund und die Medikation bei Aufnahme erfasst, was in Tabelle 4-6 dargestellt wird.

Kopplungsanalysen zeigten starke Assoziationen zwischen *PEAR1* rs41273215, rs3737224 und rs822442, während nur ein schwacher Zusammenhang zwischen diesen SNPs mit rs12566888 oder rs2768759 festgestellt wurde (Tabelle 3). Deshalb wurden folgend nur rs41273215, rs12566888 und rs2768759 untersucht.

Tabelle 3: Kopplungsanalysen zwischen den *PEAR1* Varianten rs12566888, rs2768759, rs41273215, rs3737224 und rs822442

Der Korrelationskoeffizient (r) ist hellgrau markiert bei Werten >0,4 und dunkelgrau bei Werten >0,8; D= Korrelationskoeffizient, r= Korrelationskoeffizient, n= Anzahl an untersuchten Patienten⁴⁵

	<i>PEAR1</i> rs2768759	<i>PEAR1</i> rs41273215	<i>PEAR1</i> rs3727224	<i>PEAR1</i> rs822442
<i>PEAR1</i> rs12566888	D=0,779 r'=0,413 n=579	D=0,631 r'=-0,071 n=579	D=0,612 r'=-0,068 n=570	D=0,996 r'=-0,114 n=579
<i>PEAR1</i> rs2768759		D=0,417 r'=0,255 n=582	D=0,428 r'=0,259 n=573	D=0,410 r'=0,254 n=582
<i>PEAR1</i> rs41273215			D=0,973 r'=0,961 n=573	D=0,906 r'=0,894 n=582
<i>PEAR1</i> rs3737224				D=0,878 r'=0,856 n=573

3.2. Baseline-Charakteristika

Es wurden Alter, kardiovaskuläre Risikofaktoren, Medikation bei Aufnahme und Aufnahmegrund für die folgenden SNPs von *PEAR1* erhoben: rs12566888, rs2768759, rs41273215.

3.2.1. rs12566888

Es wurden 579 Patienten für rs12566888 genotypisiert, davon waren 482 homozygot Träger des Majorallels und 97 waren Träger des Minorallels. Durchschnittlich lag das Alter beim homozygoten Majorallelträger bei 69 Jahren, beim Minorallelträger 67 Jahren. In beiden Gruppen waren 73% (n=352 bzw. n=71) der Patienten männlich, 27% weiblich. Bei 50 Patienten (10%) der homozygoten Majorallelträgern lag ein STEMI vor, bei 103 (21%) ein NSTEMI, bei 102 (21%) eine instabile KHK und bei 227 (47%) eine stabile KHK. Bei den Minorallelträgern lag bei 11 Patienten (11%) ein STEMI, bei je 23 (24%) ein NSTEMI bzw. eine instabile KHK und bei 40 (41%) eine stabile KHK vor.

Tabelle 4: Baselinecharakteristika der für *PEAR1* rs12566888 genotypisierten Patienten.⁴⁵

rs12566888	Hz Majorallelträger (n=482)	Minorallelträger (n=97)	p -Wert
männlich	352 (73%)	71 (73%)	1
weiblich	130 (27%)	26 (27%)	1
Alter [Jahre]	69 (±11)	67 (±12)	0,24
CVRF			
Arterielle Hypertonie	414 (86%)	76 (78%)	0,063
Hyperlipidämie	295 (62%)	61 (63%)	0,91
Diabetes mellitus	162 (34%)	33 (34%)	1
Nikotinabusus	202 (42%)	42 (44%)	0,82
KHK in	125 (27%)	31 (33%)	0,26
Familienanamnese			
BMI	27 (±7)	27 (±6)	0,73
Klinische Faktoren			
Vorhofflimmern	103 (21%)	19 (20%)	0,79

Ergebnisse

LVEF	239 (50%)	51 (53%)	0,58
(Beeinträchtigung)			
Renale Funktion	1 (\pm 0)	1 (\pm 0)	0,36
(Kreatinin)			
Vorherige PCI	184 (38%)	39 (40%)	0,65
Vorherige CABG	44 (9%)	7 (7%)	0,69
Vorheriger MI	141 (29%)	30 (31%)	0,81
Medikation bei Aufnahme			
ASS	284 (59%)	54 (56%)	0,65
Clopidogrel	63 (13%)	14 (15%)	0,93
Prasugrel	7 (1%)	1 (1%)	
Ticagrelor	17 (4%)	2 (2%)	
P2Y₁₂	395 (82%)	79 (82%)	
Orale	42 (9%)	9 (9%)	0,84
Antikoagulanzen			
ACE-Hemmer	203 (42%)	39 (41%)	0,82
AT1-Rezeptorblocker	96 (20%)	20 (21%)	0,89
Ca-Kanal-Blocker	101 (21%)	24 (25%)	0,42
Betablocker	287 (60%)	62 (65%)	0,42
Statine	237 (49%)	50 (52%)	0,66
Thrombozytenanzahl	250 (\pm 83)	237 (\pm 72)	0,28
[Anzahl/μl]			
Thrombozytengröße	13 (\pm 15)	15 (\pm 22)	0,6
[fl]			
Aufnahmegrund			
STEMI	50 (10%)	11 (11%)	0,75
NSTEMI	103 (21%)	23 (24%)	
Instabile KHK	102 (21%)	23 (24%)	
Stabile KHK	227 (47%)	40 (41%)	

3.2.2. rs2768759

582 Patienten wurden für rs2768759 genotypisiert. Wovon 543 Majorallelträger waren, während 39 homozygot Minorallelträger waren. Bei den Majorallelträgern lag das durchschnittliche Alter bei 69 Jahren, bei den homozygoten Minorallelträgern bei 67 Jahren. 394 (73%) der Majorallelträger waren männlich und bei den homozygoten Minorallelträgern waren 31 (79%) männlich. Der Grund der Aufnahme lag bei den Majorallelträgern zu 10% (n=56) bei STEMI, zu 21% (n=116) bei NSTEMI, zu 22% (n=118) bei instabiler KHK, zu 47% (n=253) bei stabiler KHK. Bei den homozygoten Minorallelträgern lag der Aufnahmegrund zu 13% (n=5) bei STEMI, zu 26% bei NSTEMI, zu 21% bei instabiler KHK und bei 41% bei stabiler KHK.

Tabelle 5: Baselinecharakteristika der für *PEAR1* rs41273215 genotypisierten Patienten.⁴⁵

rs2768759	Majorallelträger (n=543)	Hz Minorallelträger (n=39)	p-Wert
männlich	394 (73%)	31 (79%)	0,46
weiblich	149 (27%)	8 (21%)	0,46
Alter [Jahre]	69 (±11)	67 (±13)	0,36
CVRF			
Arterielle Hypertonie	462 (85%)	31 (79%)	0,35
Hyperlipidämie	336 (62%)	22 (56%)	0,5
Diabetes mellitus	185 (34%)	11 (28%)	0,49
Nikotinabusus	228 (42%)	16 (41%)	1
KHK in Familienanamnese	148 (29%)	9 (23%)	0,58
BMI	27 (±7)	28 (±4)	0,6
Klinische Faktoren			
Vorhofflimmern	115 (21%)	7 (18%)	0,84
LVEF (Beeinträchtigung)	270 (50%)	21 (54%)	0,74
Renale Funktion (Kreatinin)	1 (±0)	1 (±1)	0,62
Vorherige PCI	210 (39%)	15 (38%)	1

Ergebnisse

Vorherige CABG	48 (9%)	4 (10%)	0,77
Vorheriger MI	162 (30%)	10 (26%)	0,72
Medikation bei Aufnahme			
ASS	317 (58%)	23 (59%)	1
Clopidogrel	72 (13%)	5 (13%)	0,89
Prasugrel	8 (1%)	0 (0%)	
Ticagrelor	18 (3%)	2 (5%)	
P2Y₁₂	444 (82%)	32 (82%)	
Orale	49 (9%)	3 (8%)	1
Antikoagulanzen			
ACE-Hemmer	229 (42%)	15 (38%)	0,74
AT1-Rezeptorblocker	107 (20%)	9 (23%)	0,68
Ca-Kanal-Blocker	116 (21%)	11 (28%)	0,32
Betablocker	329 (61%)	22 (56%)	0,61
Statine	271 (50%)	19 (49%)	1
Thrombozytenanzahl	248 (\pm 81)	247 (\pm 79)	0,98
[Anzahl/μl]			
Thrombozytengröße	13 (\pm 14)	22 (\pm 33)	0,68
[fl]			
Aufnahmegrund			
STEMI	56 (10%)	5 (13%)	0,81
NSTEMI	116 (21%)	10 (26%)	
Instabile KHK	118 (22%)	8 (21%)	
Stabile KHK	253 (47%)	16 (41%)	

3.2.3. rs41273215

Bei den Patienten, die für rs41273215 genotypisiert wurden, waren 461 Träger des homozygoten Majorallels, während 121 Träger des Minorallels waren. Bei den homozygoten Majorallelträgern lag das durchschnittliche Alter bei 68 Jahren, bei den Minorallelträgern bei 70 Jahren. 74% (n=339) der homozygoten Majorallelträgern und 71% (n=86) waren männlich. Bei den homozygoten Majorallelträgern lag in 11% (n=50) ein STEMI vor, in 22% (n=100) ein NSTEMI, in 21% (n=95) eine instabile KHK und in 47% (n=216) eine stabile KHK vor.

Bei den Minorallelträgern lag zu 9% (n=11) ein STEMI, zu 21% (n=26) ein NSTEMI, zu 26% (n=31) eine instabile KHK und zu 44% (n=53) eine KHK vor.

Tabelle 6: Baselinecharakteristika der für *PEAR1* rs41273215 genotypisierten Patienten.⁴⁵

rs41273215	Hz Majorallelträger (n=461)	Minorallelträger (n=121)	p-Wert
männlich	339 (74%)	86 (71%)	0,65
weiblich	122 (26%)	35 (29%)	0,65
Alter [Jahre]	68 (±11)	70 (±12)	0,11
CVRF			
Arterielle Hypertonie	397 (86%)	96 (79%)	0,064
Hyperlipidämie	293 (64%)	65 (54%)	0,057
Diabetes mellitus	160 (35%)	36 (30%)	0,33
Nikotinabusus	201 (44%)	43 (36%)	0,12
KHK in Familienanamnese	123 (28%)	34 (29%)	0,82
BMI	27 (±7)	27 (±5)	0,56
Klinische Faktoren			
Vorhofflimmern	99 (21%)	23 (19%)	0,62
LVEF (Beeinträchtigung)	234 (51%)	57 (47%)	0,54
Renale Funktion (Kreatinin)	1 (±0)	1 (±0)	0,75
Vorherige PCI	186 (40%)	39 (32%)	0,092
Vorherige CABG	36 (8%)	16 (13%)	0,076
Vorheriger MI	143 (31%)	29 (24%)	0,15
Medikation bei Aufnahme			
ASS	267 (58%)	73 (60%)	0,68
Clopidogrel	65 (14%)	12 (10%)	0,45
Prasugrel	7 (2%)	1 (1%)	
Ticagrelor	14 (3%)	6 (5%)	
P2Y₁₂	374 (81%)	102 (84%)	

Ergebnisse

Orale	41 (9%)	11 (9%)	1
Antikoagulanzen			
ACE-Hemmer	193 (42%)	51 (42%)	1
AT1-Rezeptorblocker	88 (19%)	28 (23%)	0,37
Ca-Kanal-Blocker	101 (22%)	26 (21%)	1
Betablocker	282 (61%)	69 (57%)	0,4
Statine	233 (51%)	57 (47%)	0,54
Thrombozytenanzahl	249 (\pm 72)	244 (\pm 109)	0,028
[Anzahl/μl]			
Thrombozytengröße	14 (\pm 18)	10 (\pm 1)	0,18
[fl]			
Aufnahmegrund			
STEMI	50 (11%)	11 (9%)	0,67
NSTEMI	100 (22%)	26 (21%)	
Instabile KHK	95 (21%)	31 (26%)	
Stabile KHK	216 (47%)	53 (44%)	

Zwischen den Baseline-Charakteristika und den untersuchten SNPs gab es keinen signifikanten bzw. relevanten Zusammenhang. Weitere Daten können den jeweils beigefügten Baseline Charakteristika, dargestellt in den Tabellen 4, 5 und 6 entnommen werden.

Aus der untenstehenden Tabelle 2 geht hervor, dass in unserer Kohorte, welche hauptsächlich aus Kaukasiern besteht, die Frequenzen der Majorallelträger mit denen der europäischen Population des 1000 Genomen Projekts übereinstimmen. Die Tabelle zeigt zudem, dass sich die Population im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befindet (rs1266888 $p=0,439$; rs2768759 $p=0,914$; rs41273215 $p=0,0397$).

Tabelle 2: Majorallelfrequenzen der *PEAR1* Varianten rs12566888, rs2768759 and rs41273215 in der Kohorte verglichen mit dem 1000 Genomen Projekt (EUR, n=1006)

MAF: Majorallelfrequenz (engl: Major allele frequency), HWE: Hardy-Weinberg equilibrium, A: Adenin, C: Cytosin, T: Thymin, G: Guanin⁴⁵

	Allele	MAF	HWE <i>p</i> -Wert	MAF 100 Genomen; EUR
<i>PEAR1</i> rs12566888	G/T	91,1	0,439	90,8
<i>PEAR1</i> rs2768759	C/A	74,2	0,914	72,0
<i>PEAR1</i> rs41273215	C/T	88,5	0,0397	89,7

Insgesamt konnten 6,8% der Patienten (n=40 von insgesamt n=582) nicht mit in die Studie einbezogen werden, da sie im Laufe des Follow-ups verloren gingen. Diese unterschieden sich, bezüglich ihrer Baseline Charakteristika, nicht wesentlich von der in der Studie verbliebenen Gruppe an Patienten.

3.3. Ergebnisse der Genotypisierung bezogen auf den primären Endpunkt

Mittels multivariaten Cox-Regressionsanalysen wurden bezüglich des primären kombinierten Endpunkts Alter, Geschlecht, LLVF, ACS-Typ oder stabile KHK kardiovaskulären Risikofaktoren wie Hypertonie, Hyperlipoproteinämie, Rauchen oder Diabetes, sowie die Medikation (ACE-Hemmer, Betablocker, Statine und antithrombozytäre Therapie) erfasst. In untenstehender Tabelle 7 können die Ergebnisse entnommen werden.

Tabelle 7: multivariate Cox-Regressionsanalysen des primären und sekundären Endpunkts

rs12566888 stellt hierbei ein dominantes Model dar, da homozygote Majorallelträger verglichen werden mit Minorallelträgern; rs2768759 und rs41273215 stellen rezessive Modelle dar, da Majorallelträger mit homozygoten Minorallelträgern verglichen werden
HR: Hazard Ratio, CI: Confidence Intervall

*mit Kovariaten P2Y₁₂-Antagonisten, Aufnahmegrund (stabile KHK/ ACS), arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie, Nikotinabusus, Diabetes mellitus, Medikation (ASS, ACE-Hemmer, Betablocker, Statine), Alter, Geschlecht und LVEF⁴⁵

Endpunkt	HR	85% CI	p-Wert (Wald Test)
rs12566888			
Kombinierter Endpunkt	1,69	0,87; 3,27	0,122
Myokardinfarkt	1,67	0,74; 3,77	0,221
Todesfall			
rs2768759			
Kombinierter Endpunkt	3,16	1,4; 7,13	0,006
Myokardinfarkt	3,44	1,3; 9,11	0,013
Todesfall	3,62	1,0; 13,12	0,051
rs41273215			
Kombinierter Endpunkt	0,76	0,38; 1,54	0,451
Myokardinfarkt	0,92	0,4; 2,14	0,849
Todesfall	0,52	0,14; 1,91	0,328

Diese zeigten bezüglich des primären kombinierten Endpunktes einen signifikanten Unterschied zwischen Majorallelträgern und homozygoten Minorallelträgern des *PEAR1* rs2768759. Wie in Abbildung 4 und Tabelle 8 dargestellt, war es für die homozygoten Minorallelträger signifikant wahrscheinlicher einen primären Endpunkt zu erreichen, als für Majorallelträger (Wald-Statistik $p=0,006$).

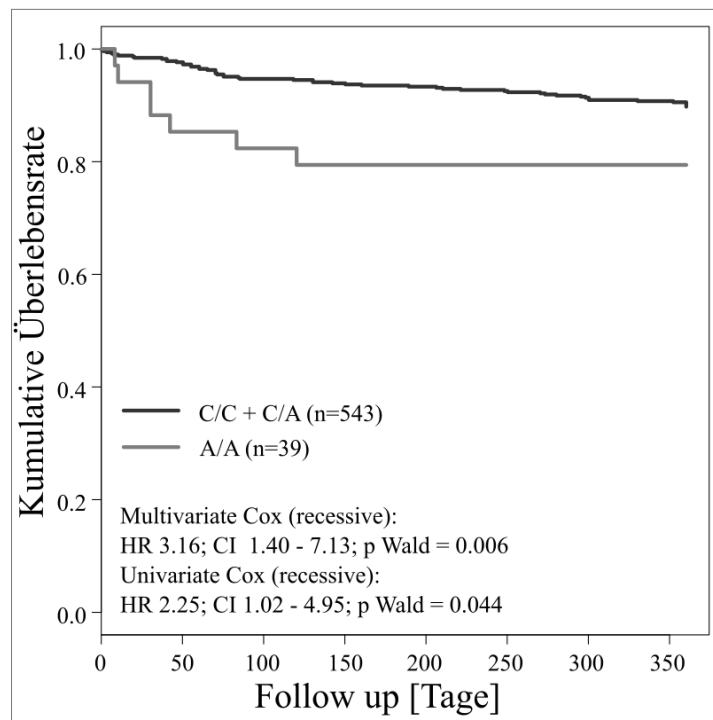


Abbildung 4: Kaplan-Meier Kurven für den primären Endpunkt bei *PEAR1* rs2768759

Dargestellt wird der signifikante Unterschied zwischen *PEAR1* rs2768759 Majorallelträgern (schwarze Kurve) und homozygoten Minorallelträgern (graue Kurve) bezogen auf den primären Endpunkt (Todesfall und/oder Myokardinfarkt und/oder ischämischer Schlaganfall). Es war für die homozygoten Minorallelträger signifikant wahrscheinlicher einen primären Endpunkt zu erreichen; HR: Hazard Ratio, CI: Confidence Intervall.⁴⁵

Tabelle 8: Endpunkte und Häufigkeitsraten (IR)/100 Patientenjahren bei rs2768759

IR: Incident rate (Häufigkeitsrate), PJ: Patientenjahren, hz: homozygot⁴⁵

	rs2768759 Majorallelträger		rs2768959 hz Minorallelträger		P (Fisher's exact test)
	Anzahl an Ereignissen	IR/ 100 PJ	Anzahl an Ereignissen	IR/100 PJ	
Todesfall	22	3,8	3	0,5	0,202
Schlaganfall	9	1,5	0	0,3	1
Myokardinfarkt	33	5,7	5	0,9	0,08
Kombinierter Endpunkt	52	8,9	7	1,2	0,081

Ein ähnlicher Unterschied konnte zwischen Minorallelträgern und homozygoten Majorallelträgern von *PEAR1* rs12566888 festgestellt werden. Diese Abweichung erwies sich jedoch hinsichtlich der gesamten Kohorte nicht als signifikant (Wald-Statistik $p=0,122$), wie in Abbildung 5 und Tabelle 9 dargestellt.

Geschlechterspezifische Cox-Regressionsanalysen ergaben eine signifikante Assoziation zwischen dem kombinierten Endpunkt und *PEAR1* rs12566888 bei männlichen Probanden (Wald Test $p=0,045$). Bei weiblichen Probanden ergab sich kein signifikanter Zusammenhang (Wald Test $p=0,352$).

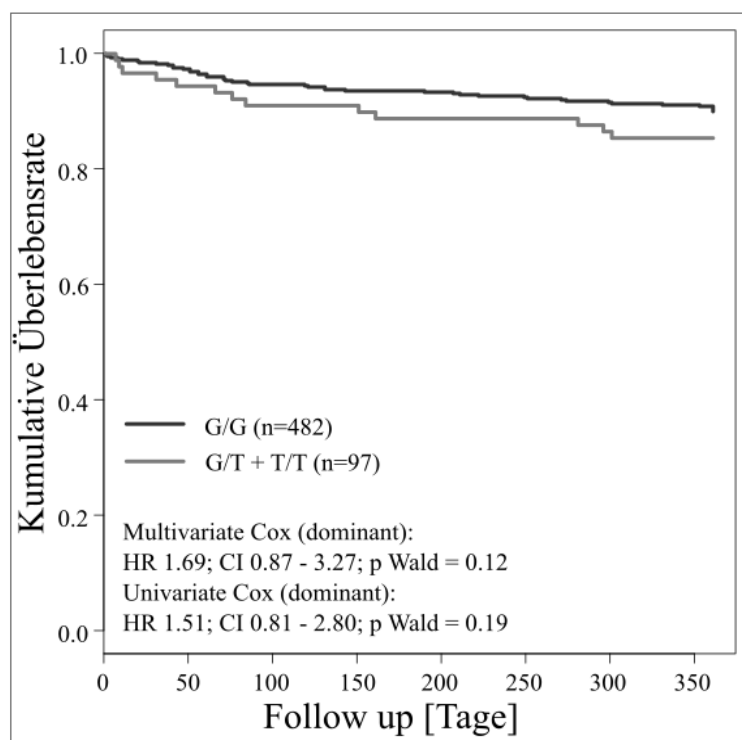


Abbildung 5: Kaplan-Meier Kurven für den primären Endpunkt bei *PEAR1* rs12566888

Dargestellt wird der Unterschied zwischen *PEAR1* rs12566888 homozygoten Majorallelträgern (schwarze Kurve) und Minorallelträgern (graue Kurve) bezogen auf den primären Endpunkt (Todesfall und/oder Myokardinfarkt und/oder ischämischer Schlaganfall). Es war für die Minorallelträger wahrscheinlicher einen primären Endpunkt zu erreichen, dieser Zusammenhang erwies sich jedoch als nicht signifikant; HR: Hazard Ratio, CI: Confidence Intervall⁴⁵

Tabelle 9: Endpunkte und Häufigkeitsraten (IR)/100 Patientenjahre bei rs12566888

IR: Incident rate (Häufigkeitsrate), PJ: Patientenjahre, hz: homozygot.⁴⁵

	rs12566888 Majorallelträger		rs12566888 hz Minorallelträger		P (Fisher's exact test)
	Anzahl an Ereignissen	IR/ 100 PY	Anzahl an Ereignissen	IR/100 PY	
Todesfall	20	3,525	5	8,6	0,585
Schlaganfall	7	1,2	2	0,3	0,648
Myokardinfarkt	28	4,8	9	1,6	0,175
Kombinierter Endpunkt	45	7,8	13	2,2	0,194

Bei *PEAR1* rs41273215 homozygoten Majorallelträgern und Minorallelträgern hingegen zeigte sich keinerlei Assoziation mit dem primären kombinierten Endpunkt (Wald-Statistik $p=0,45$). Die Ergebnisse können der untenstehenden Abbildung 6 und Tabelle 10 entnommen werden.

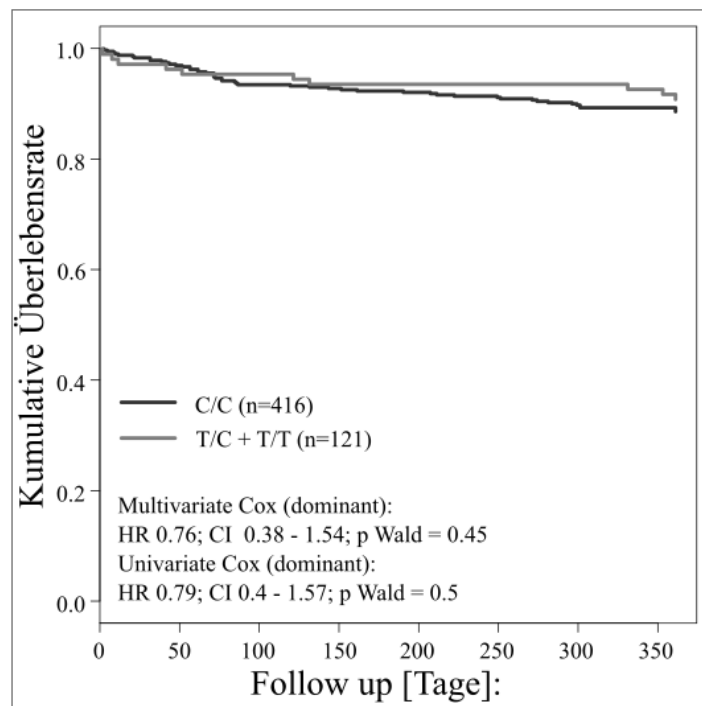


Abbildung 6: Kaplan-Meier Kurven für den primären Endpunkt bei *PEAR1* rs41273215

Dargestellt wird der Unterschied zwischen *PEAR1* rs41273215 homozygoten Majorallelträgern (schwarze Kurve) und Minorallelträgern (graue Kurve) bezogen auf den primären Endpunkt (Todesfall und/oder Myokardinfarkt und/oder ischämischer Schlaganfall). Es zeigten sich keine Assoziationen; HR: Hazard Ratio, CI: Confidence Intervall⁴⁵

Tabelle 10: Endpunkte und Häufigkeitsraten (IR)/100 Patientenjahre bei rs41273215IR: Incident rate (Häufigkeitsrate), PJ: Patientenjahre⁴⁵

	rs41273215 hz Majorallelträger		rs41273215 Minorallelträger		<i>P</i> (Fisher's exact test)
	Anzahl an Ereignissen	IR/100 PY	Anzahl an Ereignissen	IR/100 PY	
Todesfall	22	3,8	3	0,5	0,444
Schlaganfall	8	1,4	1	0	0,694
Myokardinfarkt	31	5,3	7	1,2	1
Kombinierter Endpunkt	49	8,4	10	1,7	0,608

3.4. Ergebnisse der Geotypisierung bezogen auf den sekundären Endpunkt

Auch der sekundäre Endpunkt unterschied sich zwischen *PEAR1* rs2768759 Majorallelträgern und homozygoten Minorallelträgern. Hierbei erwiesen multivariate Cox-Regressionsanalysen eine signifikante Assoziation dieser SNPs mit Myokardinfarkten (Wald-Statistik: $p=0,013$). Zudem ergab sich ein grenzwertig signifikanter Zusammenhang zwischen rs2768759 SNPs und der Gesamtmortalität (Wald-Statistik $p=0,051$).

Zwischen dem sekundären Endpunkt und *PEAR1* rs12566888 bzw. rs41273215 konnte kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden.

Tabelle 7: multivariate Cox-Regressionsanalysen des primären und sekundären Endpunkts

rs12566888 stellt hierbei ein dominantes Model dar, da homozygote Majorallelträger verglichen werden mit Minorallelträgern; rs2768759 und rs41273215 stellen rezessive Modelle dar, da Majorallelträger mit homozygoten Minorallelträgern verglichen werden
HR: Hazard Ratio, CI: Confidence Intervall

*mit Kovariaten P2Y₁₂-Antagonisten, Aufnahmegrund (stabile KHK/ ACS), arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie, Nikotinabusus, Diabetes mellitus, Medikation (ASS, ACE-Hemmer, Betablocker, Statine), Alter, Geschlecht und LVEF⁴⁵

Endpunkt	HR	85% CI	P-Wert (Wald Test)
rs12566888			
Kombinierter Endpunkt	1,69	0,87; 3,27	0,122
Myokardinfarkt	1,67	0,74; 3,77	0,221
Todesfall	2,10	0,73; 6,09	0,170
rs2768759			
Kombinierter Endpunkt	3,16	1,4; 7,13	0,006
Myokardinfarkt	3,44	1,3; 9,11	0,013
Todesfall	3,62	1,0; 13,12	0,051
rs41273215			
Kombinierter Endpunkt	0,76	0,38; 1,54	0,451
Myokardinfarkt	0,92	0,4; 2,14	0,849
Todesfall	0,52	0,14; 1,91	0,328

3.5 Ergebnisse der Thrombozytenfunktionsanalyse in Abhängigkeit vom Genotyp

Die Thrombozytenfunktionsanalyse mittels Impedanzaggregometrie Multiplate®-Systems erfasste den Thrombozytenaggregationstest, der mit verschiedenen Agonisten (ADP, Arachidonsäure, TRAP und Kollagen) durchgeführt wurde. Zusätzlich wurden im Zentrallabor Thrombozytengröße und -anzahl erfasst.

Bei *PEAR1* rs12566888 Minorallelträgern und homozygoten Majorallelträgern ergab sich weder für Thrombozytengröße, -menge oder -funktion ein signifikanter Unterschied. Auch bei *PEAR1* rs2768759 Majorallelträgern und homozygoten Minorallelträgern konnte keine Assoziation festgestellt werden.

Bei *PEAR1* rs41273215 hingegen konnte gezeigt werden, dass die Thrombozytenanzahl bei Minorallelträgern signifikant niedriger war als bei homozygoten Majorallelträgern. Bei den Nebenallelträgern lag die mittlere Anzahl bei 218.000/ μ l und bei den homozygoten Majorallelträgern bei 243.000/ μ l. Damit ergab sich mittels des Wilcoxon-Mann-Whitney Tests eine Signifikanz von $p=0,028$ (mediane Regression 0,036).

Die durch TRAP induzierte Thrombozytenaggregation zeigte bei *PEAR1* rs41273215 eine geringere Thrombozytenreaktivität bei Minorallelträgern verglichen mit den homozygoten Majorallelträgern. Bei den Minorallelträgern lag der Wert bei 75 AU x min und bei den homozygoten Majorallelträgern bei 83 AU x min. Mittels des Wilcoxon-Mann-Whitney Tests wurde eine Signifikanz von $p=0,0094$ berechnet. Bei der multivariaten Cox- Regressionsanalyse ergab sich ein Medianwert von $p=0,0042$.

Hinsichtlich der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation ergaben sich bei der gesamten Kohorte keine Assoziationen mit den hier untersuchten *PEAR1* SNPs.

Geschlechterspezifische Analysen ergaben eine leicht signifikant erniedrigte Thrombozytenaggregation bei männlichen *PEAR1* rs41273215 Minorallelträgern (mediane Regression $p=0,047$). Bei weiblichen Probanden ergab sich hierbei keine Signifikanz (mediane Regression $p=0,14$).

Die durch Arachidonsäure und Kollagen ausgelöste Thrombozytenaggregation bei dualer antithrombozytärer Therapie erwiesen keinerlei signifikante Assoziation mit den verschiedenen hier untersuchten *PEAR1* SNPs.

Die Parameter können der untenstehenden Tabelle 11 und Abbildung 7 entnommen werden.

Tabelle 11: Thrombozytenfunktionsanalyse für rs12566888, rs2768759 und rs41273215

WMW: Wilcoxon-Mann-Whitney, Hz: homozygot, CI: Confidence Intervall, ADP: Adenosindiphosphat, TRAP: Thrombinrezeptor-aktivierendes Protein

*mit Kovariaten P2Y₁₂-Antagonisten, Aufnahmegrund (stabile KHK/ ACS), arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie, Nikotinabusus, Diabetes mellitus, Medikation (ASS, ACE-Hemmer, Betablocker, Statine), Alter, Geschlecht und LVEF⁴⁵

rs12566888	Hz Major- allelträger median	Minor- allelträger median	Unterschied in Lokation	Niedriger/ hoher 95% CI	WMW test <i>p</i>- Wert	Mediane Regres- sion <i>p</i>- Wert
Mittleres Thrombozyten- volumen	9,8	5,9	0,2	-0,6; 1	0,6	0,31
Thrombozyten- anzahl	238	226	8	-6, 23	0,28	0,083
Thrombozytenaggregationstest						
ADP	34	24	4	0,9	0,065	0,13
Arachidon- Säure	13	12	1	-1,3	0,33	0,43
TRAP	82	79	5	-1.11	0,09	0,15
Kollagen	36	33	4	-5,15	0,37	0,88
rs2768759	Major- allelträger median	Hz Minor- allelträger median	Unterschied in Lokation	Niedriger/ hoher 95% CI	WMW test <i>p</i>- Wert	Mediane Regres- sion <i>p</i>- Wert*
Mittleres Thrombozyten- volumen	8,9	9,6	0,2	-0,9; 0,9	0,68	0,056
Thrombozyten- anzahl	236	240	0	-26,26	0,98	0,89
Thrombozytenaggregationstest						
ADP	32	24	4	-3,12	0,25	0,21
Arachidon- Säure	13	11,50	2	-1,5	0,12	0,63
TRAP	82	75,5	3	-6,12	0,49	0,14
Kollagen	37	33	6	-6,24	0,32	0,35

Ergebnisse

rs41273215	Hz Major- allelträger median	Minor- allelträger median	Unterschied in Lokation	Niedriger/ hoher 95% CI	WMW test <i>p</i> - Wert	Mediane Regression <i>p</i> -Wert
Mittleres Thrombozyten- volumen	9,9	9,55	0,3	-0,2; 0,8	0,18	0,12
Thrombozyten- anzahl	243	218	14	1,27	0,028	0,036
Thrombozytenaggregationstest						
ADP	33	26	4	-1,8	0,1	0,13
Arachidon- Säure	13	13	1	-1,2	0,45	0,3
TRAP	83	75	7	-2,12	0,0094	0,0042
Kollagen	37	30	7	-2,18	0,13	0,73

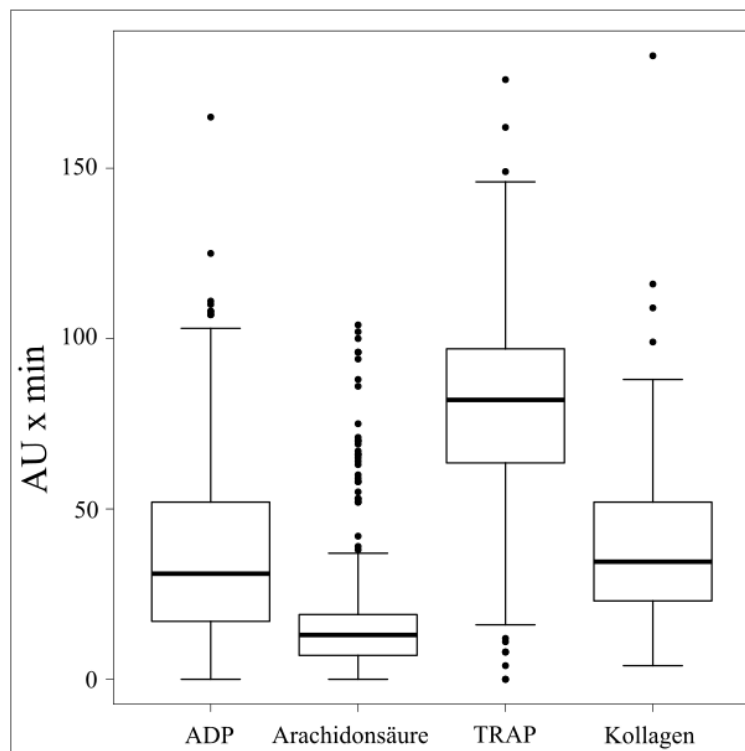


Abbildung 7: Boxplot der Thrombozytenaggregationsanalyse mittels Multiplate-Analyse

Der dicke schwarze horizontale Querstrich stellt den Medianwert dar, der obere Balken das 75%-Quartil, der untere das 25%-Quartil. Die Länge der Whisker (Antennen) entspricht dem 1,5-fachen des Interquartilsabstands, die einzelnen Punkte stellen Extreme (Ausreißer) dar [AU x min]; AU: Area under the curve, ADP: Adenosindiphosphat, TRAP: Thrombinrezeptor-aktivierendes Protein.

Insgesamt wurden 66% der hier untersuchten Patienten mit Clopidogrel behandelt, 15% mit Prasugrel und 18% mit Ticagrelor.

4. Diskussion

4.1. Allgemeines

Die kardiovaskulären Erkrankungen stellen in den Industrieländern nach wie vor die Haupttodesursache dar. Als Hauptursache hierfür gilt die Atherosklerose. Thrombozyten spielen bei der Entstehung eine entscheidende Rolle, durch Aggregation an der initialen Endothelzellläsion.⁵³ Es besteht eine große Heterogenität bezüglich der Thrombozytenaggregation. Die Gründe hierfür sind allerdings noch nicht vollständig bekannt, man geht allerdings davon aus, dass genetische Faktoren eine große Rolle spielen.⁵⁴ Deshalb wurden in verschiedenen Studien Polymorphismen der Thrombozytenmembranoberflächen untersucht. Hierbei wurde in genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) gezeigt, dass verschiedene genetische *PEAR1* SNPs mit der Thrombozytenaggregation assoziiert sind.^{32, 55}

4.2. Auswirkungen von *PEAR1* Genvarianten auf Thrombozyten

PEAR1 (platelet endothelial aggregation receptor 1) wird sowohl auf Thrombozyten als auch auf Endothelzellen exprimiert. Es stellt einen Transmembran-Protein-Rezeptor dar, welcher über Thrombozytenkontakt aktiviert wird und darüber an der weiteren Thrombozytenaktivierung beteiligt ist.²⁹ Das für *PEAR1* codierende Gen liegt beim Menschen auf dem Chromosom 1q23.1. In vorherigen Studien wurden diverse SNPs bereits erforscht.

In einer Studie von Lewis et al. wurde 2013 nachgewiesen, dass *PEAR1* SNPs mit einem höheren Risiko eines Myokardinfarkts assoziiert sind und die Varianten des *PEAR1* Gens mit einem unterschiedlichen Ansprechen auf die duale antithrombozytäre Therapie assoziiert sind.^{56, 32}

Des Weiteren konnte von Herrera-Galeano et al. 2008 in einer Studie an 1486 gesunden Individuen gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen *PEAR1* SNPs und durch Agonisten indizierte Thrombozytenaggregation besteht. So ergaben sich Assoziationen zwischen dem C-Allel von *PEAR1* rs2768759 SNPs und erhöhter Thrombozytenaggregation unter Kollagen, Epinephrin, und ADP.

Mit der Einnahme von ASS wurde dieser Effekt verstärkt, was auf einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem ASS-response Phänotyp und dem C-Allel von *PEAR1* rs2768759 SNPs schließen ließ, wobei ein reduziertes Ansprechen auf ASS festgestellt wurde.³²

Jones et al hat in einer Studie von 500 gesunden Individuen eine Assoziation zwischen rs41299597 SNPs und einer erhöhten Expression von *PEAR1* in aktivierten Thrombozyten festgestellt, sowie eine erhöhte Antwort auf den Glykoprotein-5-Rezeptor der Initiation der Grinnungskaskade.³⁰

In einer Metaanalyse einer genomweiten Assoziationsstudie analysierten Johnson et al 2010 bei 4000 herzgesunden Patienten europäischer Herkunft Assoziationen zwischen 2,5mio unterschiedlichen SNPs und der Thrombozytenreaktion auf 3 Agonisten: ADP, Epinephrin und Kollagen. Hierbei konnte eine signifikante Assoziation zwischen *PEAR1* SNP rs12566888 und der Thrombozytenaggregation unter ADP festgestellt werden ($p=3,4 \times 10^{-12}$). Die epinephrininduzierte Thrombozytenaggregation konnte mit *PEAR1* rs12566888 assoziiert werden ($p=8,8 \times 10^{-7}$).⁵⁷

Eicher et al. führten eine großangelegte ExomeChip-Metaanalyse mit 157293 Individuen durch. Es wurden sowohl Thrombozytenanzahl, als auch die mediane Thrombozytengröße auf Assoziationen mit genetischen Varianten untersucht. Hierbei zeigten sich Assoziationen zwischen *PEAR1* SNPs und sowohl der Thrombozytengröße bzw. -anzahl, sowie der Thrombozytenreaktivität.⁵⁸ In einer weiteren Studie konnte in thrombozytenreichem Blutplasma eine starke Assoziation zwischen *PEAR1* SNP rs12566888 und ADP-induzierter ($p=1,51 \times 10^{-7}$), sowie Thrombin-induzierter ($p=1,91 \times 10^{-6}$) Thrombozytenreaktivität festgestellt werden.⁵⁹

Diverse Studien genetischer Variationen von *PEAR1* identifizierten rs12041331 im Intron 1 als Herkunft von $\leq 15\%$ der gesamten phänotypischen Variationen der Thrombozytenfunktionen. Variationen im *PEAR1* rs12041331-Gen waren signifikant mit der phänotypischen Ausprägung der Thrombozytenfunktion assoziiert ($p=2,7 \times 10^{-6}$).

Mittels Western blotting und ELISA konnte gezeigt werden, dass dosis-abhängige Assoziationen zwischen der Anzahl an G-Majorallelen im rs12041331 SNP und Expression von *PEAR1* Proteinen in Thrombozyten bestehen.^{60,61}

4.3. Auswirkungen von *PEAR1* Genvarianten auf Endothelzellen

PEAR1 wird nicht nur auf der Oberfläche von Thrombozyten exprimiert, sondern auch bei Endothelzellen.²⁹ Auch hier liegen mehrere Studien vor, die zeigen, dass verschiedene SNPs mit der Endothelzellfunktion assoziiert sind. Die *PEAR1* Expression erwies sich bei G Majorallelträgern von rs12041331 laut einer Studie von Izzi et al nicht nur bei Thrombozyten, sondern auch bei Endothelzellen als höher, als beim A Minorallel.⁵⁵

Fisch et al. konnten feststellen, dass *PEAR1* Variationen die Endothelzellfunktion signifikant bestimmen. In 641 Individuen wurde eine signifikante Assoziation zwischen *PEAR1* rs12041331 und der flussvermittelten Vasodilatation der Arteria brachialis nachgewiesen. In weiterführenden Metaanalysen wurde der Zusammenhang zwischen *PEAR1* Expression und diversen Genen, die eine wichtige Rolle für die Endothelzellfunktion spielen, untersucht. Hierbei wurde eine Assoziation mit ANG2 (Angiopoetin 2), ACVRL1 (Acitivin A receptor like type 1) und ENG festgestellt. Zudem wird die Endothelzellmigration, sowie die Angiogenese durch *PEAR1* signifikant beeinflusst.⁶²

Vandenbriele et al. führten sowohl in vivo-, als auch in vitro-Versuche an Mäusen durch, um den Zusammenhang zwischen *PEAR1* und Endothelzellen, sowie der Angiogenese zu untersuchen. In beiden Studien konnte eine inverse Korrelation zwischen *PEAR1* Expression und vaskulärer Zusammenstellung festgestellt werden.⁶³

4.4. Auswirkungen von *PEAR1* SNPs bei Patienten unter Medikation mit Thrombozytenaggregationshemmern

In weiteren Studien wurde festgestellt, dass genetische Variationen von *PEAR1* die Thrombozytenreaktivität bei Patienten, die mit ASS allein oder in Kombination mit Clopidogrel behandelt werden, beeinflussen könnten und so mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Events assoziiert sein können.

Herrera-Galeano et al haben eine Assoziation zwischen Thrombozytenaggregation und *PEAR1* rs2768759 und rs12041331 bei gesunden Patienten mit ASS Einnahme festgestellt.³²

Würtz et al. untersuchten Assoziationen zwischen Thrombozytenaggregation und *PEAR1* bei Patienten mit KHK und ASS Einnahme. Dabei wurde *PEAR1* rs12041331 mit einer reduzierten Thrombozytenaggregation und erhöhter Thrombozytenaktivierung assoziiert.⁶⁴

Bei rs12041331 A-Allel-Trägern mit ASS-Einnahme wurde auch bei Lewis et al. in der INVEST-GENE-Study (International Verapamil SR/Trandolapril Study) ein signifikant höheres Risiko für einen Myokardinfarkt gegenüber homozygoten GG-Allelträgern festgestellt (odds ratio, 2.03; 95% CI, 1.01-4.09; $P=0.048$). Dies wurde bei Probanden ohne ASS-Medikation nicht festgestellt.⁵⁶

Rs12041331 war zudem bei Probanden mit dualer antithrombozytärer Therapie mit der Thrombozytenantwort assoziiert. Bei Patienten, die mit PCI therapiert wurden, war die Wahrscheinlichkeit für ein kardiovaskuläres Ereignis oder Todesfall bei A-Allel-Trägern höher, als bei homozygoten GG-Allel-Trägern (HR, 2.62; 95% CI, 0.96–7.10; $p = 0.059$; HR, 3.97; 95% CI, 1.10–14.31; $P = 0.035$).⁵⁶

Zusätzlich hatten rs12041331 A-Allel-Träger unter ASS-Einnahme ein höheres Risiko für einen Todesfall, Myokardinfarkt und Schlaganfall, als ohne ASS-Einnahme (OR = 0.54, 95% CI 0.22-1.31, $P = 0.16$).

Bei Probanden mit angiografisch festgestellter KHK und ASS-Medikation konnte für Träger des *PEAR1* SNPs rs2768759 in einer Studie von Voora et al kein Zusammenhang mit einem höheren Risiko für Versterben, Myokardinfarkt oder Schlaganfall festgestellt werden.³³

4.5. Auswirkung von *PEAR1* SNPs auf Thrombozytengröße und – anzahl

In unserer Kohorte wurden keine Assoziationen zwischen *REAR1* SNPs und mittlerem Thrombozytenvolumen oder Thrombozytenanzahl festgestellt. Diese Ergebnisse stimmen mit denen einer großangelegten Metastudie von Eicher et al. überein.⁵⁸

4.6. Auswirkungen von *PEAR1* SNPs bei Patienten unter Medikation mit Thrombozytenaggregationshemmern auf die Thrombozytenfunktion

In der vorliegenden Studie konnte bei Trägern des *PEAR1* rs41273215 Minorallels eine verminderte TRAP-induzierte Thrombozytenaggregation festgestellt werden. Für die anderen untersuchten *PEAR1* SNPs wurden keine signifikanten Auswirkungen auf die Thrombozytenreaktivität befunden.

Gegensätzlich zu unserer Studie steht die Aussage einer Studie von Herrera-Galeano et al. Hierbei wurde bei Patienten mit KHK und ASS-Medikation das C-Allel von *PEAR1* rs2768759 mit einer erhöhten Thrombozytenaggregation assoziiert.³²

Auch bei Eicher et al. konnte eine Assoziation zwischen *PEAR1* SNP rs12566888 und ADP- bzw. thrombin-induzierter Thrombozytenreaktivität festgestellt werden. Probanden in diesen Studien standen unter ASS-Medikation. Die in diese Studien einbezogenen Probanden nahmen keine P2Y₁₂-Rezeptor-Antagonisten ein und es war im Voraus keine PCI durchgeführt worden. Bei Eicher et al. wurden zusätzlich nur männliche Probanden untersucht.⁶⁵

Weitere Analysen unserer Kohorte zeigten, dass rs12566888 bei männlichen Probanden signifikant mit der Thrombozytenfunktion, induziert durch TRAP, assoziiert ist ($p=0,016$). Bei weiblichen Probanden konnte dies nicht festgestellt werden ($p=0,78$), was auf unterschiedliche Effekte zwischen weiblichem und männlichem Geschlecht schließen lässt.

Die Effekte von rs12566888 in Kombination mit ADP, sowie die Effekte von rs2768759 auf die Thrombozytenaggregation, erwiesen sich bei weiteren geschlechtsspezifischen Untersuchungen als nicht signifikant.

4.7. Auswirkungen von *PEAR1* SNPs bei Patienten unter Medikation mit Thrombozytenaggregationshemmern und mit vorausgegangener PCI

Wie in diversen Studien gezeigt werden konnte, hatten Patienten, bei denen eine PCI durchgeführt wurde und die Träger des *PEAR1* SNPs rs12041331 waren, ein höheres Risiko für das Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen und Todesfall.⁵⁶ Basierend auf den Daten des 1000 Genomenprojekts (EUR, n=1006), konnte mit Hilfe von LDlink gezeigt werden, dass bei Kaukasiern das *PEAR1* SNP rs12041331 und das in unserer Studie untersuchte *PEAR1* SNP rs12566888 stark miteinander verknüpft sind.⁵²

In unserer Studie konnten wir zeigen, dass *PEAR1* rs2768759 signifikant mit dem primären Endpunkt, bestehend aus Todesfall, Myokardinfarkt und Schlaganfall, assoziiert war. Bei Trägern des homozygoten Minorallels lag die Inzidenzrate für den primären Endpunkt bei 8,9/100 PY, bei Trägern des Majorallels dagegen bei 1,2/100 PY. Somit lag insgesamt die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines primären Endpunkts bei Trägern des rs2768759 SNPs höher, als bei Nichtträgern. Bei den rs2768759 Trägern selbst war die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines primären Endpunkts bei homozygoten Minorallelträgern höher als bei Majorallelträgern. Über multivariable Cox-Regressionsanalysen mit Justierung auf kardiovaskuläre Risikofaktoren konnte für diesen Unterschied eine Wahrscheinlichkeit von $p=0,006$ berechnet werden.

Auch bezüglich des sekundären Endpunkts Myokardinfarkt konnte diese Assoziation festgestellt werden. Mit einer IR von 5,7/100 PY der homozygoten Minorallelträgern gegenüber 0,9/100 PY der Majorallelträgern (Wald Test $P=0,013$).

Entgegen unserer Ergebnisse berichteten Voora et al., dass bei Patienten mit angiografisch bestätigter KHK und ASS-Einnahme keine Assoziationen zwischen *PEAR1* SNPs und einem höheren Risiko für den Todesfall, Myokardinfarkt oder Schlaganfall festgestellt werden konnte.³³ In unserer Studie wurden jedoch Patienten mit Einnahme von P2Y₁₂-Rezeptor-Antagonisten und ohne vorangegangene PCI untersucht. Bei Voora et al. beschränkte sich die Kohorte auf Probanden mit vorangegangener PCI und ASS-Einnahme.⁶⁶

In diversen Studien wurde die Vermutung aufgestellt, dass das *PEAR1* SNP rs12566888 ein Gen sei, welches in Zusammenhang mit kardiovaskulären Komplikationen bei Kaukasiern steht. In unserer Kohorte konnten wir zwar eine Assoziation zwischen homozygoten Majorallelträgern von rs12566888 und einem erhöhten Risiko für das Auftreten des primären Endpunkts feststellen. Mit einer IR von 7.8/100 PY bei homozygoten Majorallelträgern gegenüber 2.2/100PY bei Minorallelträgern stellte sich dieser Zusammenhang bei multivariablen Cox-Regressionsanalysen jedoch als statistisch nicht signifikant dar (Wald Test $p=0,122$).⁶⁷ Dass in unserer Studie kein signifikanter Zusammenhang zwischen primärem Endpunkt und *PEAR1* rs12566888 festgestellt werden konnte, mag unter anderem auf die moderate Probandenanzahl unserer Studie zurückzuführen sein. Hinzu kommt ein möglicher geschlechtsspezifischer Effekt. So konnte in unserer Studie mit Hilfe von multivariaten Cox-Analysen bei männlichen Probanden eine signifikante Assoziation zwischen rs12566888 und dem kombinierten Endpunkt festgestellt werden ($P=0,045$). Bei Frauen hingegen konnte keine Assoziation festgestellt werden ($P=0,352$).

Yang et al. konnten ebenso keine Assoziationen zwischen dem SNP rs12566888 und dem Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen feststellen.⁶⁷ Gegenätzlich zu unserer Studie wurden bei Yang et al. jedoch keine Probanden mit vorausgegangener PCI untersucht.

Im Unterschied zu den geschlechtsspezifischen Ergebnissen von *PEAR1* rs12566888 und dem kombinierten Endpunkt, waren die Effekte auf Myokardinfarkt und alle anderen Todesursachen weder geschlechterspezifisch noch in der gesamten Kohorte signifikant.

Zum Vergleich lag der Anteil von Männern bei Yang et al. bei 48,7% und bei Lewis et al. bei 60%, der Patienten mit vorausgegangener PCI.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass der Effekt von rs12566888 noch weiteren Untersuchungen bedarf, um eine relevante Aussage über die Auswirkung bei Patienten mit vorangegangener PCI zu treffen.

4.8. Auswirkungen von *PEAR1* SNPs bei Patienten unter Medikation mit Thrombozytenaggregationshemmern und vorausgegangener PCI auf Thrombozytenfunktion

In einer Studie von Yao et al. wurden 405 chinesische Probanden untersucht, welche alle mit PCI und dualer Antithrombozytärer Therapie mit ASS und Clopidogrel therapiert wurden. Hierbei wurde bei *PEAR1* rs41273215 Minorallelträgern eine höhere Thrombozytenreaktivität festgestellt ($p=0,025$).⁴⁴ In unserer Studie, welche aus Kaukasiern bestand, wurde keine Assoziation zwischen Thrombozytenreaktivität und Minorallelträgern von *PEAR1* rs41273215 erfasst. Die TRAP-induzierte Thrombozytenreaktivität war jedoch bei Trägern dieses SNPs signifikant niedriger. Die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation war bei männlichen Trägern des *PEAR1* SNPs rs41273215 Minorallelträgern signifikant niedriger ($p=0,047$). Bei weiblichen Probanden war dies nicht der Fall ($p=0,14$).

Bei einer Studie von Jones et al. konnte in einer Kohorte von gesunden Probanden für *PEAR1* rs41273215 Träger eine erhöhte Thrombozytenreaktivität, im Sinne einer erhöhten P-Selektin Expression als Antwort auf CRP-XL, festgestellt werden.³⁰

Um unser Studienmodell zu bestärken, wurde der Faktor kardiovaskuläre Komedikation durch andere kardiovaskuläre Komorbiditäten, wie vorheriger Myokardinfarkt, Linksventrikeljektionsfraktion und arterielles Vorhofflimmern, ersetzt. Hierbei ergab sich kein Unterschied bezüglich der Assoziationen von *PEAR1* SNPs mit Faktoren der Thrombozytenfunktion, sowie dem klinischen Verlauf.

4.9. Limitationen der Studie

In der vorliegenden Studie können keine Einflüsse anderer Genvarianten, welche nicht untersucht worden sind, ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse wurden nicht durch eine unabhängige Kohorte oder eine genomweite Assoziationsstudie bestätigt. Die Berechnung der Stichprobengröße mit Hilfe des Log-Rank-Tests ergab, dass um den Effekt von rs2768759 mit 80%iger Aussagekraft und einem Signifikanzlevel von 5% zu bestätigen, eine zusätzliche Kohorte von mindestens $n=737$ Patienten benötigt werden würde (hazard ratio 3.2, Eventrate 11%).

Die vorliegende Studiengruppe entspricht mit n=582 Patienten einer moderaten Größe und stellt Beobachtungen auf. Um die Ergebnisse zu bestätigen, braucht es allerdings größer angelegte Studien.

Unserer Patientenkohorte wurden vorwiegend Kaukasier eingeschlossen, weshalb die Ergebnisse und daraus folgende Rückschlüsse auch nur für diese ethnische Gruppe geltend gemacht werden können. Um Rückschlüsse für andere ethnische Gruppen zu treffen, sollten weiterführende Studien durchgeführt werden.

4.10. Schlussfolgerung

Die vorliegende Studie untersuchte erstmals die Auswirkungen verschiedener *PEAR1* SNPs auf Probanden mit KHK oder ACS mit vorangegangener PCI und antithrombozytärer Therapie.

Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass *PEAR1* rs2769759 Träger eine höhere Wahrscheinlichkeit für das Auftreten des sekundären Endpunkts Myokardinfarkt im klinischen Verlauf hatten. Zusätzlich zeigen unsere Ergebnisse eine signifikante Assoziation dieses *PEAR1* SNPs mit dem kombinierten Endpunkt, bestehend aus Myokardinfarkt, Schlaganfall und allen Todesursachen. Hieraus könnte man nach größer angelegten Studien sogenannte Risikopatienten nach Genotypisierung identifizieren.

Das in vorherigen Studien identifizierte *PEAR1* SNP rs41273215 zeigte in unserer Studie keinerlei Assoziation mit dem kardiovaskulären klinischen Verlauf. Dies vermag an der moderaten Probandengruppe liegen und müsste in größer angelegten Studien nochmals untersucht werden.

Geschlechterspezifische Auswertungen ergaben für männliche Träger des *PEAR1* SNPs 12566888 eine leicht signifikant höhere Wahrscheinlichkeit für das Auftreten des kombinierten Endpunkts. Auch um diese Ergebnisse zu bestätigen müssten größer angelegte Studien durchgeführt werden. Diese Patienten könnten im klinischen Alltag als Risikopatienten identifiziert werden.

Bezüglich der Thrombozytenaggregation stellte sich diese bei *PEAR1* rs41273215 Minorallelträgern im Beisein von TRAP erniedrigt dar. Auch bei männlichen rs12566888 Minorallelträgern war die TRAP-induzierte Thrombozytenaggregation erniedrigt.

Die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation stellte sich bei *PEAR1* rs41273215 Minorallelträgern erniedrigt dar. Nach weiteren größer angelegten Studien könnte hieraus eine individuelle Form der antithrombozytären Therapie resultieren.

5. Zusammenfassung

5.1. Hintergrund und Fragestellung

Bei der Behandlung der koronaren Herzkrankheit konnten mit Stentimplantation und der dualen antithrombozytären Therapie mit Clopidogrel und ASS deutliche Fortschritte erzielt werden. Dennoch gibt es erhebliche Unterschiede bezüglich des Auftretens von kardiovaskulären Ereignissen nach PCI. Aus vorherigen Studien ging hervor, dass *PEAR1* SNPs mit der Thrombozytenfunktion assoziiert sind.³² Hierbei konnte gezeigt werden, dass *PEAR1* rs2768759 und rs12566888 bei gesunden Patienten und Patienten unter ASS mit einer erhöhten Thrombozytenaggregation einhergehen.^{32,30,58} In einer Studie von Voora konnte hingegen gezeigt werden, dass für *PEAR1* rs2768759 bei Patienten mit angiografisch bestätigter KHK und ASS- Einnahme kein höheres Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse wie Tod, Myokardinfarkt oder Schlaganfall besteht.³³

Zu Patienten mit akutem Koronarsyndrom und PCI lagen wenige Daten zu Zusammenhängen von klinischem Verlauf und *PEAR1* SNPs vor.

Der Zusammenhang verschiedener SNPs mit der Thrombozytenfunktion und dem klinischen Outcome von Patienten, die unter KHK leiden und mit PCI und P2Y₁₂-Inhibitoren behandelt wurden, wurde bis jetzt nicht genügend untersucht.³⁴

In der vorliegenden Studie sollten diese Zusammenhänge weiter erforscht werden.

5.2. Ergebnisse

In der vorliegenden Studie wurden SNPs von *PEAR1* bei 582 Patienten mit stabiler koronarer Herzerkrankung oder akutem Koronarsyndrom, behandelt mit PCI und dualer antithrombozytärer Therapie, untersucht. Über einen Zeitraum von 365 Tagen nach initialer PCI wurde ein Follow-up durchgeführt, wobei der primäre Endpunkt, definiert war als kombinierter Endpunkt bestehend aus Tod, Myokardinfarkt oder ischämischem Schlaganfall. Als sekundäre Endpunkte wurde das alleinige Auftreten von Tod, Myokardinfarkt oder ischämischer Schlaganfall beobachtet. Außerdem wurden Thrombozytenfunktionsanalysen mittels Impedanzaggregometrie durchgeführt und auf Zusammenhänge mit den verschiedenen *PEAR1* SNPs untersucht.

Dabei zeigte sich bei homozygoten *PEAR1* rs2768759 Minorallelträgern ein signifikant höheres Risiko für das Auftreten eines primären Endpunkts (HR=3,16, 95% Konfidenzintervall: 1,4-7,13, $p=0,006$). Auch für *PEAR1* rs12566888 Minorallelträger erwies sich bei allen Patienten das Risiko als erhöht (hazard ratio, 1.69; 95% confidence interval, 0.87–3.27, $p = 0.122$). Dieses Ergebnis erwies sich statistisch als nicht signifikant. Geschlechterspezifische Untersuchungen ergaben eine geringfügige Signifikanz bei männlichen *PEAR1* rs12566888 Minorallelträgern mit dem primären Endpunkt (hazard ratio, 2.12; 95% confidence interval, 1.02–4.43, $p = 0.045$; $n = 425$). Zwischen primärem Endpunkt und *PEAR1* rs41273215 konnte kein Zusammenhang ermittelt werden. ($p = 0.45$).

Des Weiteren konnte eine Assoziation zwischen *PEAR1* rs2768759 SNPs und dem sekundären Endpunkt festgestellt werden. Es konnte festgestellt werden, dass Träger dieses SNPs ein signifikant höheres Risiko hatten einen Myokardinfarkt zu erleiden ($p = 0.013$), sowie eine grenzwertig signifikant erhöhte Sterblichkeitsrate aufwiesen ($p = 0.051$). Für Träger von *PEAR1* rs12566888 und rs41273215 SNPs wurden keine Assoziationen festgestellt.

Es zeigte sich bei *PEAR1* rs41273215 Minorallelträgern eine signifikant geringere Anzahl an Thrombozyten (218.000 μ l), als bei homozygoten Majorallelträgern (243.000 μ l, $p= 0.028$). Bei rs12566888 und rs2768759 SNPs wurde kein Zusammenhang festgestellt.

Außerdem konnte bei *PEAR1* rs41273215 Minorallelträgern für die durch TRAP initiierte Thrombozytenaggregation eine geringere Thrombozytenreaktivität festgestellt werden (75), als bei den homozygoten Majorallelträgern (83, $p= 0.0094$). Die durch ADP, Arachidonsäure und Kollagen induzierte Thrombozytenaggregation erwies keinerlei Assoziation mit den verschiedenen *PEAR1* SNPs auf. Auch bei rs12566888 und rs2768759 SNPs konnte kein Zusammenhang festgestellt werden.

5.3. Schlussfolgerung

In der vorliegenden Studie wurden erstmals die Auswirkungen ausgewählter *PEAR1* SNPs auf das klinische Outcome bei kardiovaskulären Patienten mit stabiler KHK oder ACS, bei denen eine PCI durchgeführt wurde und die mit einer dualen antithrombozytären Therapie behandelt wurden, untersucht.

Es wurde gezeigt, dass das *PEAR1* SNP rs2768759 in Zusammenhang mit dem klinischen Verlauf, bezogen auf das Eintreten eines Myokardinfarkts, steht. Darüber hinaus ist dieses SNP mit dem kombinierten Endpunkt, bestehend aus Myokardinfarkt, Schlaganfall und allen weiteren Todesursachen, assoziiert.

Das *PEAR1* SNP rs12566888 stand bei männlichen Probanden in grenzwertigem Zusammenhang mit dem kombinierten Endpunkt.

Eine Assoziation zwischen *PEAR1* SNP rs41273215 und kardiovaskulären Ereignissen konnte jedoch nicht gezeigt werden. Dies vermag auf die mäßige Probandenanzahl unserer Kohorte zurückzuführen sein.

Die TRAP-induzierte Thrombozytenaggregation war signifikant niedriger bei rs41273215 Minorallelträgern. Bei männlichen Probanden war diese zudem bei Minorallelträgern von rs12566888 herabgesetzt. Des weiteren war unter den männlichen Probanden die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation bei rs41273215 Minorallelträgern erniedrigt.

6. Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt. Kapitel 2.1.3 Todesursachen [Gesundheit in Deutschland, 2015]. http://www.gbe-bund.de/gbe10/ergebnisse.prc_tab?fid=25074&suchstring=&query_id=&sprache=D&fund_typ=TXT&methode=&vt=&verwandte=1&page_ret=0&seite=1&p_lfd_nr=2&p_new_s=&p_sprachkz=D&p_uid=gastd&p_aid=65124696&hlp_nr=2&p_janein=J (17 March 2017)
2. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;**420**:868–874.
3. Task Force Members, Montalescot G, Sechtem U, Achenbach S, Andreotti F, Arden C, Budaj A, Bugiardini R, Crea F, Cuisset T, Di Mario C, Ferreira JR, Gersh BJ, Gitt AK, Hulot J-S, Marx N, Opie LH, Pfisterer M, Prescott E, Ruschitzka F, Sabaté M, Senior R, Taggart DP, Wall EE van der, Vrints CJM, ESC Committee for Practice Guidelines, Zamorano JL, Achenbach S, Baumgartner H, Bax JJ, et al. 2013 ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease: the Task Force on the management of stable coronary artery disease of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2013;**34**:2949–3003.
4. Davies SW. Clinical presentation and diagnosis of coronary artery disease: stable angina. *Br Med Bull* 2001;**59**:17–27.
5. Herold G. Innere Medizin. 2016th ed. Verlag Dr. med. Gerd Herold, Köln, Deutschland;
6. Geisler T, Bhatt DL. The role of inflammation in atherothrombosis: current and future strategies of medical treatment. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res* 2004;**10**:RA308-316.
7. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000;**407**:233–241.
8. Gerhard GT, Duell PB. Homocysteine and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1999;**10**:417–428.
9. Negoro N, Kanayama Y, Haraguchi M, Umetani N, Nishimura M, Konishi Y, Iwai J, Okamura M, Inoue T, Takeda T. Blood pressure regulates platelet-derived growth factor A-chain gene expression in vascular smooth muscle cells in vivo. An autocrine mechanism promoting hypertensive vascular hypertrophy. *J Clin Invest* 1995;**95**:1140–1150.
10. Nathan L, Chaudhuri G. Estrogens and atherosclerosis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997;**37**:477–515.
11. Crea F, Gaspardone A. New look to an old symptom: angina pectoris. *Circulation* 1997;**96**:3766–3773.
12. [Ang_Gui_1976.pdf](#).
13. Roffi M, Patrono C, Collet J-P, Mueller C, Valgimigli M, Andreotti F, Bax JJ, Borger MA, Brotons C, Chew DP, Gencer B, Hasenfuss G, Kjeldsen K, Lancellotti P, Landmesser U, Mehilli J, Mukherjee D, Storey RF, Windecker S. [2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC)]. *G Ital Cardiol* 2016;**17**:831–872.

14. e.V DG für K-HK. Pocket-Leitlinie: Akutes Koronarsyndrom ohne ST-Hebung (NSTE-ACS).
15. Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest* 2005;**115**:3378–3384.
16. Frojmovic MM, Milton JG. Human platelet size, shape, and related functions in health and disease. *Physiol Rev* 1982;**62**:185–261.
17. Gachet C. Regulation of platelet functions by P2 receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2006;**46**:277–300.
18. George JN. Platelets. *Lancet Lond Engl* 2000;**355**:1531–1539.
19. Schulze H, Shivdasani RA. Mechanisms of thrombopoiesis. *J Thromb Haemost JTH* 2005;**3**:1717–1724.
20. Gawaz null, Neumann null, Schomig null. Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease: consequences for diagnosis and therapy. *Circulation* 1999;**99**:E1–E11.
21. Gawaz M. Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovasc Res* 2004;**61**:498–511.
22. Hankey GJ, Eikelboom JW. Antiplatelet drugs. *Med J Aust* 2003;**178**:568–574.
23. Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy--II: Maintenance of vascular graft or arterial patency by antiplatelet therapy. Antiplatelet Trialists' Collaboration. *BMJ* 1994;**308**:159–168.
24. Phillips DR, Conley PB, Sinha U, Andre P. Therapeutic approaches in arterial thrombosis. *J Thromb Haemost JTH* 2005;**3**:1577–1589.
25. Tomasello SD, Tello-Montoliu A, Angiolillo DJ. Prasugrel for the treatment of coronary thrombosis: a review of pharmacological properties, indications for use and future development. *Expert Opin Investig Drugs* 2011;**20**:119–133.
26. Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH, Montalescot G, Ruzyllo W, Gottlieb S, Neumann F-J, Ardissino D, De Servi S, Murphy SA, Riesmeyer J, Weerakkody G, Gibson CM, Antman EM, TRITON-TIMI 38 Investigators. Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2007;**357**:2001–2015.
27. Droppa M, Geisler T. Loading mit Thrombozytenaggregationshemmern beim akuten Koronarsyndrom. *Kardiologie Up2date* 2013;**09**:165–171.
28. Juneja S, Gupta K, Kaushal S. Ticagrelor: An emerging oral antiplatelet agent. *J Pharmacol Pharmacother* 2013;**4**:78–80.
29. Nanda N, Bao M, Lin H, Clauser K, Komuves L, Quertermous T, Conley PB, Phillips DR, Hart MJ. Platelet endothelial aggregation receptor 1 (PEAR1), a novel epidermal growth factor repeat-containing transmembrane receptor, participates in platelet contact-induced activation. *J Biol Chem* 2005;**280**:24680–24689.
30. Jones CI, Bray S, Garner SF, Stephens J, Bono B de, Angenent WGJ, Bentley D, Burns P, Coffey A, Deloukas P, Earthrowl M, Farndale RW, Hoylaerts MF, Koch K, Rankin A, Rice CM, Rogers J, Samani NJ, Steward M, Walker A, Watkins NA, Akkerman J-W, Dudbridge F, Goodall AH, Ouwehand WH, Bloodomics Consortium. A functional genomics approach reveals novel quantitative trait loci associated with platelet signaling pathways. *Blood* 2009;**114**:1405–1416.

31. Vandenbriele C, Sun Y, Criel M, Cludts K, Van Kerckhoven S, Izzi B, Vanassche T, Verhamme P, Hoylaerts MF. Dextran sulfate triggers platelet aggregation via direct activation of PEAR1. *Platelets* 2016;**27**:365–372.
32. Herrera-Galeano JE, Becker DM, Wilson AF, Yanek LR, Bray P, Vaidya D, Faraday N, Becker LC. A novel variant in the platelet endothelial aggregation receptor-1 gene is associated with increased platelet aggregability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;**28**:1484–1490.
33. Voora D, Horton J, Shah SH, Shaw LK, Newby LK. Polymorphisms associated with in vitro aspirin resistance are not associated with clinical outcomes in patients with coronary artery disease who report regular aspirin use. *Am Heart J* 2011;**162**:166-172.e1.
34. Xiang Q, Cui Y, Zhao X, Zhao N. Identification of PEAR1 SNPs and their influences on the variation in prasugrel pharmacodynamics. *Pharmacogenomics* 2013;**14**:1179–1189.
35. Xu K, Ye S, Zhang S, Yang M, Zhu T, Kong D, Chen J, Xu L, Li J, Zhu H, Wang F, Yang L, Zhang J, Fan Y, Ying L, Hu X, Zhang X, Chan NC, Li C. Impact of Platelet Endothelial Aggregation Receptor-1 Genotypes on Platelet Reactivity and Early Cardiovascular Outcomes in Patients Undergoing Percutaneous Coronary Intervention and Treated With Aspirin and Clopidogrel. *Circ Cardiovasc Interv* 2019;**12**:e007019.
36. Faraday N, Becker DM, Becker LC. Pharmacogenomics of platelet responsiveness to aspirin. *Pharmacogenomics* 2007;**8**:1413–1425.
37. Faraday N, Becker DM, Yanek LR, Herrera-Galeano JE, Segal JB, Moy TF, Bray PF, Becker LC. Relation between atherosclerosis risk factors and aspirin resistance in a primary prevention population. *Am J Cardiol* 2006;**98**:774–779.
38. Freedman JE. The aspirin resistance controversy: clinical entity or platelet heterogeneity? *Circulation* 2006;**113**:2865–2867.
39. WMA - The World Medical Association-WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects.
40. ICH harmonized tripartite guideline: Guideline for Good Clinical Practice. - J Postgrad Med. <http://www.jpgmonline.com/article.asp?issn=0022-3859;year=2001;volume=47;issue=1;spage=45;epage=50;aualast=> (8 January 2019)
41. Tóth O, Calatzis A, Penz S, Losonczy H, Siess W. Multiple electrode aggregometry: a new device to measure platelet aggregation in whole blood. *Thromb Haemost* 2006;**96**:781–788.
42. Cardinal DC, Flower RJ. The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behavior in blood. *J Pharmacol Methods* 1980;**3**:135–158.
43. GmbH RDD. Multiplate® Analyzer - Gerinnungsdiagnostik. Roche Diagn. <https://www.roche.de/diagnostics/systeme/gerinnungsdiagnostik/multiplate-analyzer.html> (14 August 2017)
44. Yao Y, Tang X-F, Zhang J-H, He C, Ma Y-L, Xu J-J, Song Y, Liu R, Meng X-M, Song L, Chen J, Wang M, Xu B, Gao R-L, Yuan J-Q. Association of PEAR1 genetic variants with platelet reactivity in response to dual antiplatelet therapy with aspirin and clopidogrel in the Chinese patient population after percutaneous coronary intervention. *Thromb Res* 2016;**141**:28–34.

45. Stimpfle F, Bauer M, Rath D, Schaeffeler E, Schwab M, Gawaz M, Winter S, Geisler T. Variants of PEAR1 Are Associated With Outcome in Patients With ACS and Stable CAD Undergoing PCI. *Front Pharmacol* 2018;**9**:490.
46. R: a language and environment for statistical computing. <https://www.gbif.org/tool/81287/r-a-language-and-environment-for-statistical-computing> (8 January 2019)
47. Warnes G, Gorjanc with contributions from G, Leisch F, Man and M. genetics: Population Genetics. 2013.
48. Koenker R, code) SP (Contributions to CQ, code) PTN (Contributions to SQ, code) AZ (Contributions to dynrq code essentially identical to his dynlm, code) PG (Contributions to nlrq, advice) BDR (Initial (2001) R port from S (to my everlasting shame--how could I have been so slow to adopt R and for numerous other suggestions and useful. quantreg: Quantile Regression. 2018.
49. González JR, Armengol L, Solé X, Guinó E, Mercader JM, Estivill X, Moreno V. SNPassoc: an R package to perform whole genome association studies. *Bioinforma Oxf Engl* 2007;**23**:644–645.
50. Modeling Survival Data: Extending the Cox Model | Terry M. Therneau | Springer. <https://www.springer.com/de/book/9780387987842> (8 January 2019)
51. 1000 Genomes Project Consortium, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, Marchini JL, McCarthy S, McVean GA, Abecasis GR. A global reference for human genetic variation. *Nature* 2015;**526**:68–74.
52. Machiela MJ, Chanock SJ. LDlink: a web-based application for exploring population-specific haplotype structure and linking correlated alleles of possible functional variants. *Bioinforma Oxf Engl* 2015;**31**:3555–3557.
53. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). *N Engl J Med* 1992;**326**:310–318.
54. Heritability of platelet function in families with premature coronary artery disease - BRAY - 2007 - Journal of Thrombosis and Haemostasis - Wiley Online Library. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1538-7836.2007.02618.x> (5 April 2019)
55. Izzi B, Pistoni M, Cludts K, Akkor P, Lambrechts D, Verfaillie C, Verhamme P, Freson K, Hoylaerts MF. Allele-specific DNA methylation reinforces PEAR1 enhancer activity. *Blood* 2016;**128**:1003–1012.
56. Lewis JP, Ryan K, O’Connell JR, Horenstein RB, Damcott CM, Gibson Q, Pollin TI, Mitchell BD, Beitelshes AL, Pakzy R, Tanner K, Parsa A, Tantry US, Bliden KP, Post WS, Faraday N, Herzog W, Gong Y, Pepine CJ, Johnson JA, Gurbel PA, Shuldiner AR. Genetic variation in PEAR1 is associated with platelet aggregation and cardiovascular outcomes. *Circ Cardiovasc Genet* 2013;**6**:184–192.
57. Johnson AD, Yanek LR, Chen M-H, Faraday N, Larson MG, Tofler G, Lin SJ, Kraja AT, Province MA, Yang Q, Becker DM, O’Donnell CJ, Becker LC. Genome-wide meta-analyses identifies 7 loci associated with platelet aggregation in response to agonists. *Nat Genet* 2010;**42**:608–613.

58. Eicher JD, Chami N, Kacprowski T, Nomura A, Chen M-H, Yanek LR, Tajuddin SM, Schick UM, Slater AJ, Pankratz N, Polfus L, Schurmann C, Giri A, Brody JA, Lange LA, Manichaikul A, Hill WD, Pazoki R, Elliot P, Evangelou E, Tzoulaki I, Gao H, Vergnaud A-C, Mathias RA, Becker DM, Becker LC, Burt A, Crosslin DR, Lytikäinen L-P, Nikus K, et al. Platelet-Related Variants Identified by Exomechip Meta-analysis in 157,293 Individuals. *Am J Hum Genet* 2016;**99**:40–55.
59. Eicher JD, Xue L, Ben-Shlomo Y, Beswick AD, Johnson AD. Replication and hematological characterization of human platelet reactivity genetic associations in men from the Caerphilly Prospective Study (CaPS). *J Thromb Thrombolysis* 2016;**41**:343–350.
60. Faraday N, Yanek LR, Yang XP, Mathias R, Herrera-Galeano JE, Suktitipat B, Qayyum R, Johnson AD, Chen M-H, Tofler GH, Ruczinski I, Friedman AD, Gylfason A, Thorsteinsdottir U, Bray PF, O'Donnell CJ, Becker DM, Becker LC. Identification of a specific intronic PEAR1 gene variant associated with greater platelet aggregability and protein expression. *Blood* 2011;**118**:3367–3375.
61. Kunicki TJ, Williams SA, Nugent DJ. Genetic variants that affect platelet function. *Curr Opin Hematol* 2012;**19**:371–379.
62. Fisch AS, Yerges-Armstrong LM, Backman JD, Wang H, Donnelly P, Ryan KA, Parihar A, Pavlovich MA, Mitchell BD, O'Connell JR, Herzog W, Harman CR, Wren JD, Lewis JP. Genetic Variation in the Platelet Endothelial Aggregation Receptor 1 Gene Results in Endothelial Dysfunction. *PloS One* 2015;**10**:e0138795.
63. Vandenbrielle C, Kauskot A, Vandersmissen I, Criel M, Geenens R, Craps S, Lutun A, Janssens S, Hoylaerts MF, Verhamme P. Platelet endothelial aggregation receptor-1: a novel modifier of neoangiogenesis. *Cardiovasc Res* 2015;**108**:124–138.
64. Würtz M, Nissen PH, Grove EL, Kristensen SD, Hvas A-M. Genetic determinants of on-aspirin platelet reactivity: focus on the influence of PEAR1. *PloS One* 2014;**9**:e111816.
65. Eicher JD, Chami N, Kacprowski T, Nomura A, Chen M-H, Yanek LR, Tajuddin SM, Schick UM, Slater AJ, Pankratz N, Polfus L, Schurmann C, Giri A, Brody JA, Lange LA, Manichaikul A, Hill WD, Pazoki R, Elliot P, Evangelou E, Tzoulaki I, Gao H, Vergnaud A-C, Mathias RA, Becker DM, Becker LC, Burt A, Crosslin DR, Lytikäinen L-P, Nikus K, et al. Platelet-Related Variants Identified by Exomechip Meta-analysis in 157,293 Individuals. *Am J Hum Genet* 2016;**99**:40–55.
66. Voora D, Horton J, Shah SH, Shaw LK, Newby LK. Polymorphisms associated with in vitro aspirin resistance are not associated with clinical outcomes in patients with coronary artery disease who report regular aspirin use. *Am Heart J* 2011;**162**:166-172.e1.
67. Yang W-Y, Petit T, Cauwenberghs N, Zhang Z-Y, Sheng C-S, Thijs L, Salvi E, Izzi B, Vandenbrielle C, Wei F-F, Gu Y-M, Jacobs L, Citterio L, Delli Carpini S, Barlassina C, Cusi D, Hoylaerts MF, Verhamme P, Kuznetsova T, Staessen JA. PEAR1 is not a major susceptibility gene for cardiovascular disease in a Flemish population. *BMC Med Genet* 2017;**18**:45.

7. Erklärungen zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Universitätsklinikum Tübingen Innere Medizin III, Abteilung für Kardiologie und Angiologie, unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Gawaz durchgeführt.

Das Studienkonzept wurde von Herrn Prof. Dr. Meinrad Gawaz und Herrn Prof. Dr. Tobias Geisler entworfen. Betreut wurde die Arbeit von Herrn Dr. Fabian Stimpfle und Herrn Dr. Dominik Rath, ärztliche Mitarbeiter.

Die Versuche zur Thrombozytenfunktionsanalyse wurden nach Einweisung von Frau Lydia Laptev (Medizinisch-technische Assistentin) durch mich und andere studentische Mitarbeiter der Arbeitsgruppe durchgeführt.

Die zur Datenerfassung verwendete Datenbank wurde durch Herrn Dr. Eick zur Verfügung gestellt. Die Einpflegung der Daten erfolgte nach Einweisung von Herrn Dr. Eick und Herrn Dr. Dominik Rath durch mich und andere studentische Mitarbeiter.

Die Patientenauswahl erfolgte durch Herrn Dr. Fabian Stimpfle.

Die Genotypisierung wurde durch Frau Elke Schaeffeler, Mitarbeiterin des Dr.-Margarete Fischer-Bosch Institut für Klinische Pharmakologie (IKP) am Robert-Bosch-Krankenhaus in Stuttgart, durchgeführt.

Die statistische Analyse erfolgte in Zusammenarbeit von Dr. Fabian Stimpfle, ärztlicher Mitarbeiter, und Stefan Winter, Mitarbeiter am Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für klinische Pharmakologie (IKP) am Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart.

Das Follow-up wurde durch mich und andere studentische Mitarbeiter der Arbeitsgruppe durchgeführt.

Ich versichere die Dissertation eigenständig nach Anleitung durch Dr. Fabian Stimpfle und Dr. Dominik Rath verfasst zu haben und keine weiteren Quellen, als die angegebenen, verwendet zu haben.

Tübingen, den 23.10.19

8. Publikationen

In der folgenden Publikation wurden weite Teile der vorliegenden Arbeit bereits veröffentlicht:

Stimpfle F, Bauer M, Rath D, Schaeffeler E, Schwab M, Gawaz M, Winter S, Geisler T, *Variants of PEAR1 Are Associated With Outcome in Patients With ACS and Stable CAD Undergoing PCI.* Front Pharmacol. 2018 May 15;9:490. doi: 10.3389/fphar.2018.00490. eCollection 2018.

9. Anhang

9.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mechanismus der Thrombozytenadhäsion und -aggregation.....	18
Gawaz M. Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. <i>Cardiovasc Res</i> 2004; 61 :498–511. Licence Number: 4680120045121	
Abbildung 2: schematische Darstellung von Thrombozyten bei Entzündungsreaktionen und bei der Entstehung von Atherosklerose	19
Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. <i>J Clin Invest</i> 2005; 115 :3378–3384. License Number: 4680121245772	
Abbildung 3: Aggregometriekurve mittels Multiplate [®] -System.....	35
Abbildung 4: Kaplan-Meier Kurven für den primären Endpunkt bei PEAR1 rs2768759.....	48
Abbildung 5: Kaplan-Meier Kurven für den primären Endpunkt bei PEAR1 rs12566888.....	49
Abbildung 6: Kaplan-Meier Kurven für den primären Endpunkt bei PEAR1 rs41273215.....	50
Abbildung 7: Boxplot der Thrombozytenaggregationsanalyse mittels Multiplate-Analyse	55

9.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung Schweregrade der Angina Pectoris der Canadian Cardiovascular Society (CCS).....	14
Tabelle 2: Majorallelfrequenzen der PEAR1 Varianten rs12566888, rs2768759 and rs41273215 in der Kohorte verglichen mit dem 1000 Genomen Projekt.....	36
Tabelle 3: Kopplungsanalysen zwischen den PEAR1 Varianten rs12566888, rs2768759, rs41273215, rs3737224 und rs822442.....	37
Tabelle 4: Baselinecharakteristika der für PEAR1 rs12566888 genotypisierten Patienten.....	40
Tabelle 5: Baselinecharakteristika der für PEAR1 rs41273215 genotypisierten Patienten.....	42
Tabelle 6: Baselinecharakteristika der für PEAR1 rs41273215 genotypisierten Patienten.....	44
Tabelle 7: multivariate Cox-Regressionsanalysen des primären Endpunkts und sekundären Endpunkts.....	47
Tabelle 8: Endpunkte und Häufigkeitsraten (IR)/100 Patientenjahren bei rs2768759.....	48
Tabelle 9: Endpunkte und Häufigkeitsraten (IR)/100 Patientenjahren bei rs12566888.....	50
Tabelle 10: Endpunkte und Häufigkeitsraten (IR)/100 Patientenjahren bei rs41273215.....	51
Tabelle 11: Thrombozytenfunktionsanalyse für rs12566888, rs2768759 und rs41273215.....	54

9.3. Danksagung

Zunächst gilt mein herzlicher Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Tobias Geisler für die Überlassung dieser interessanten Arbeit und die freundliche Unterstützung während der Durchführung.

Herrn Prof. Dr. med. Meinrad Gawaz, ärztlicher Direktor der Abteilung für Kardiologie und Angiologie, möchte ich danken für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Abteilung anzufertigen, sowie für alle verwendeten Forschungsmittel.

Ein besonderer Dank gilt meinen Betreuern Herrn Dr. Fabian Stimpfle und Herrn Dr. Dominik Rath für die guten Ratschläge und Hilfestellungen bei der Umsetzung meiner Arbeit. Für die statistischen Auswertungen bin ich Herrn Dr. Fabian Stimpfle und Herrn Stefan Winter zu großem Dank verpflichtet.

Zudem möchte ich mich bei der gesamten AG Geisler bedanken für die freundliche Zusammenarbeit, insbesondere bei Frau Lydia Laptev für die Einweisung und Unterstützung im Labor.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, Christine und Jürgen Bauer, die mich auf meinem Weg durch das Studium begleitet haben. Nur durch ihre Unterstützung und Motivation konnte mir mein bisheriger Lebensweg und die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht werden.

9.4. Lebenslauf

Name	Bauer
Vorname	Maike
Geburtsdatum	31.01.1992
Geburtsort	Heidelberg
Schulbildung	
1998-2002	Grundschule Gauangelloch
2002-2011	Abitur am Gymnasium Bammental
Berufliche Laufbahn	
2012-2018	Studium der Zahnmedizin, Medizinische Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen
11. September 2013	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
1. Oktober 2015	Zahnärztliche Vorprüfung
September 2016	4-wöchige Famulatur im Angkor Hospital for Children, Kambodscha
29. Mai 2018	Zahnärztliche Prüfung (Note: sehr gut)
25. Juni 2018	Approbation als Zahnärztin
seit 15. Oktober 2018	Tätigkeit als Assistenz Zahnärztin in der Universitätsklinik für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde Tübingen, Abteilung Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik

Tübingen, den 23.10.19