

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

Technische Universität München

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Schömig)

Einfluss des -1051G/A vWF Polymorphismus auf den klinischen Verlauf nach koronarer Stentimplantation

Daniela Neher

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. N. C. W. v. Beckerath
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. H. Deppe

Die Dissertation wurde am 13.07.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 23.09.2009 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen	4
1. Einleitung	6
1.1 Koronare Herzerkrankung	6
1.2 Genpolymorphismen	7
1.3 Therapie der KHK	8
1.4 Subakute Stenthrombose	10
1.5 Restenose nach Stentimplantation	13
1.6 von Willebrand Faktor	16
1.6.1 Funktion des von Willebrand Faktors	18
1.6.2 von Willebrand Faktor Gen	23
2. Methoden	27
2.1 Patienten und DNA-Extraktion	27
2.2 Antithrombotische Therapie	28
2.3 Definitionen	29
2.4 Studienendpunkte	31
2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)	32
2.6 Restriktionsenzymanalyse zur vWF -1051G/A Genotypisierung	34
2.7 TaqMan-Verfahren	37
2.8 Bestimmung des vWF -1051G/A Genotyps mittels TaqMan-Verfahren	39
2.9 Materialien und Geräte	42
2.10 Statistik	45

3. Ergebnisse	46
3.1 Eigenschaften der Patienten	46
3.2 Eigenschaften der Läsionen und Interventionen	49
3.3 Akute und subakute thrombotische Ereignisse nach Stentimplantation	52
3.4 Restenose	54
3.5 Langfristiger klinischer Verlauf (1 Jahr) nach Stentimplantation	56
4. Diskussion	57
4.1 Thrombotische Frühkomplikationen	58
4.2 Restenose	60
4.3 Spätkomplikationen	62
4.4 Weitere Befunde zur Bedeutung des -1051 G/A vWF Polymorphismus	63
4.5 Stellenwert der Ergebnisse	65
5. Zusammenfassung	67
6. Literaturverzeichnis	70
Danksagung	90

Verzeichnis der Abkürzungen

ADP	- Adenosindiphosphat
Ag	- Antigen
AS	- Aminosäure
Bp	-Basenpaar
BMS	- bare metal stent
DES	- drug eluting stent
DNA	- Desoxyribonukleinsäure
EKG	- Elektrokardiogramm
Fg	- Fibrinogen
GP	- Glycoprotein
kDA	- Kilodalton
KHK	- koronare Herzerkrankung
LP	- Lipoprotein
MI	- Myokardinfarkt
mRNA	- messenger (Boten-)Ribonukleinsäure
PCR	- Polymerasekettenreaktion
PDGF	- platelet derived growth factor
PTCA	- perkutane Koronarintervention
SMC	- smooth muscle cell
SNP	- single nucleotide polymorphism
TUM	- Technische Universität München
TxA	- Thromboxan A
UV	- ultraviolett

vWF - von Willebrand Faktor
WHO -World health organisation

1. Einleitung

1.1 Koronare Herzerkrankung

Bei der koronaren Herzerkrankung (KHK) liegt eine Störung des Gleichgewichts zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffverbrauch des Myokards vor, so dass es zu einem akuten oder chronischen Sauerstoffmangel kommt. Ursächlich hierfür sind, unter anderem, arteriosklerotische Verengungen an den Herzkranzgefäßen.

Diese Erkrankung hat vor allem in den westlichen Industrienationen große epidemiologische Bedeutung, da etwa ein Drittel aller Todesfälle auf den Auswirkungen einer KHK beruhen.

Die KHK ist eine Erkrankung komplexer Genese. Durch epidemiologische Studien konnten beeinflussbare (z.B. Diabetes mellitus, Bluthochdruck, Hypercholesterinämie, Nikotinabusus) und nicht beeinflussbare (z.B. erbliche Belastung, männliches Geschlecht, Alter) Risikofaktoren identifiziert werden (Fuster et al., 1996).

In den letzten Jahren beschäftigt sich die Humangenetik immer stärker mit der Identifizierung von Genen, die an der Genese komplexer Erkrankungen und Krankheitszuständen beteiligt sind. Ein Zweig dieser Forschung beschäftigt sich damit, Assoziationen zwischen häufig vorkommenden DNA-Varianten (Genpolymorphismen) und komplexen Erkrankungen nachzuweisen.

Dieser Ansatz wurde in der vorliegenden Arbeit gewählt, um nach genetischen Faktoren für die Entstehung von Restenosen und akuten Thrombosen nach koronaren Interventionen zu suchen.

1.2 Genpolymorphismen

Genpolymorphismen sind häufig vorkommende Varianten der genomischen DNA. Die Definition beinhaltet, dass ein Gen dann als polymorph gilt, wenn das seltenere Allel mit einer Frequenz von mehr als 1% auftritt. Polymorphismen kommen durchschnittlich im Abstand von 1000 Basen im menschlichen Genom vor. Polymorphismen, die auf dem Austausch oder der Deletion nur einer Base beruhen, werden Einzelbasenpolymorphismen (Single Nucleotide Polymorphisms kurz SNP's) genannt. Die Bedeutung der meisten ist noch nicht bekannt.

Polymorphismen können vielfältige Auswirkungen auf das Genprodukt haben.

Zum einen können sie die Menge (Quantität), zum anderen die Eigenschaften (Qualität) des Genproduktes beeinflussen.

Es können Veränderungen der Bindungsstelle für eine oder mehrere Transkriptions- und Expressionsfaktoren auftreten (van't Hooft et al., 1999). Auch konnte gezeigt werden, dass Polymorphismen einen Einfluss auf das Spleißen und die Stabilität der mRNA haben können (Siffert et al., 1998). Es kann aber auch zum Austausch einer Aminosäure des Genproduktes kommen, welcher einen Einfluss auf die Proteinfunktion hat (Tesauro et al., 2000; Nicolaes et al., 2002).

Durch eine Vielzahl von Studien konnte der Einfluss von Genpolymorphismen auf die Entstehung komplexer Erkrankungen, bzw. deren Faktoren, nachgewiesen werden.

Es ist anzunehmen, dass Genpolymorphismen auch auf die entsprechenden Therapieformen komplexer Erkrankungen bzw. deren Risiken und Komplikationen Einfluss haben.

1.3 Therapie der KHK

Perkutane Koronarinterventionen nehmen heute eine zentrale Rolle bei der Behandlung der koronaren Herzerkrankungen ein. Den Anfang machte Gruentzig 1977. Er führte die erste Ballondilatation durch (Gruentzig, 1981). Hierbei konnte gleichzeitig mit der Darstellung der Koronararterien der verengte Gefäßabschnitt erweitert werden.

Die Probleme dieser „einfachen“ PTCA lagen in einem erneuten Gefäßverschluss, ausgelöst durch progrediente Intimadissektion und in dem „elastic recoil“, dem elastischen Zurückschnurren der Gefäßwand nach erfolgter Dehnung.

Durch das Einbringen intrakoronarer Gefäßstützen (Stents) konnte dieses Problem Ende der 80er Jahre gelöst werden. Dies wiederum hat jedoch große Auswirkungen auf die Gefäßwand.

Durch die Ballondilatation und die nachfolgende Stentimplantation kommt es zusätzlich zu der bereits bestehenden arteriosklerotischen Läsion zu einer akuten Verletzung der Gefäßwand und zu einer kompletten Zerstörung der Endothelzellschicht. Die Gefäßwandreaktion läuft in 3 aufeinander folgenden Phasen ab, wie durch Untersuchungen an Arteriensegmenten von Verstorbenen, welchen zu Lebzeiten Koronarstents implantiert wurden, gezeigt werden konnte (Grewe et al., 2001). In der Frühphase der Stentimplantation (bis zu 6 Wochen) kommt es innerhalb der ersten Woche zu der Ausbildung eines membranartigen, plättchenreichen Thrombus auf der Stentoberfläche und im Bereich der Läsion. Gleichzeitig kommt es zu einer Entzündungsreaktion mit Infiltration der Läsion mit Leukozyten sowie Lymphozyten. In den folgenden Wochen kommt es zur Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen, die zusätzlich überschießende Matrix produzieren. In dieser Phase sind keine Endothelzellen im Implantationsgebiet nachweisbar. Die Intermediärphase zwischen der

6. und der 12. Woche ist gekennzeichnet durch ein dichtes Bindegewebsgeflecht mit vielen darin eingebetteten glatten Muskelzellen. Des Weiteren finden sich vermehrt Endothelzellinseln auf der Oberfläche der Neointima. Erst in der Spätphase, d.h. nach mehr als drei Monaten, ist die Neointima komplett reendothelialisiert.

Diese Gefäßwandreaktion birgt zwei Risiken der heutigen perkutanen Stentimplantation: die akute Stentthrombose sowie die In-Stent Restenose.

1.4 Subakute Stentthrombose

Die gefährlichste Komplikation der koronaren Stentimplantation, die mit sehr hoher Mortalität behaftet ist, ist die subakute Stentthrombose, also der thrombotische Verschluss des behandelten Gefäßes innerhalb der ersten 30 Tage nach Stentimplantation. Andere thrombotische Frühkomplikationen sind thrombotische Seitastverschlüsse und die Embolisation von Plättchenaggregaten, die zu einem vorübergehenden Ansteigen der Herzenzyme (Kreatinkinase und Troponin) führen. Um in klinischen Studien alle relevanten thrombotischen Ereignisse zu erfassen, wird für die Analyse oft ein zusammengesetzter Endpunkt, bestehend aus Tod, Myokardinfarkt (unter Berücksichtigung der Herzenzyme), angiographisch dokumentierte Stentthrombose und dringliche Revaskularisierung des Zielgefäßes innerhalb der ersten 30 Tage nach Implantation, verwendet. Es treten aber auch noch nach 30 Tagen thrombotische Ereignisse auf. Die Thrombozyten nehmen eine zentrale Rolle bei diesen Vorgängen ein.

Wie schon geschildert führt jede Stentimplantation zu einer Thrombusbildung im Bereich des gestenteten Areals und zu einer massiven Thrombozytenaktivierung (Gawaz et al., 1996). Bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom (Myokardinfarkt, instabile Angina pectoris) liegt zusätzlich schon eine massive Thrombozytenaktivierung vor (Gawaz et al., 1996). Es konnte gezeigt werden, dass die Thrombozyten im Bereich der behandelten Plaque aktiviert werden (Neumann et al., 1996). Für das Auftreten der subakuten Stentthrombose ist das Ausmaß dieser Thrombozytenaktivierung prognostisch aussagekräftig (Gawaz et al., 1996). Des Weiteren erwies sich die metallene Oberfläche des Stents als im hohen Maße thrombogen (Herrmann et al., 1998).

So kommt es bereits in der Frühphase zur Bildung einer Thrombusschicht auf der Oberfläche der Stentstreben (Abbildung 1) (Gonschior et al., 1995; Grewe et al., 1997).

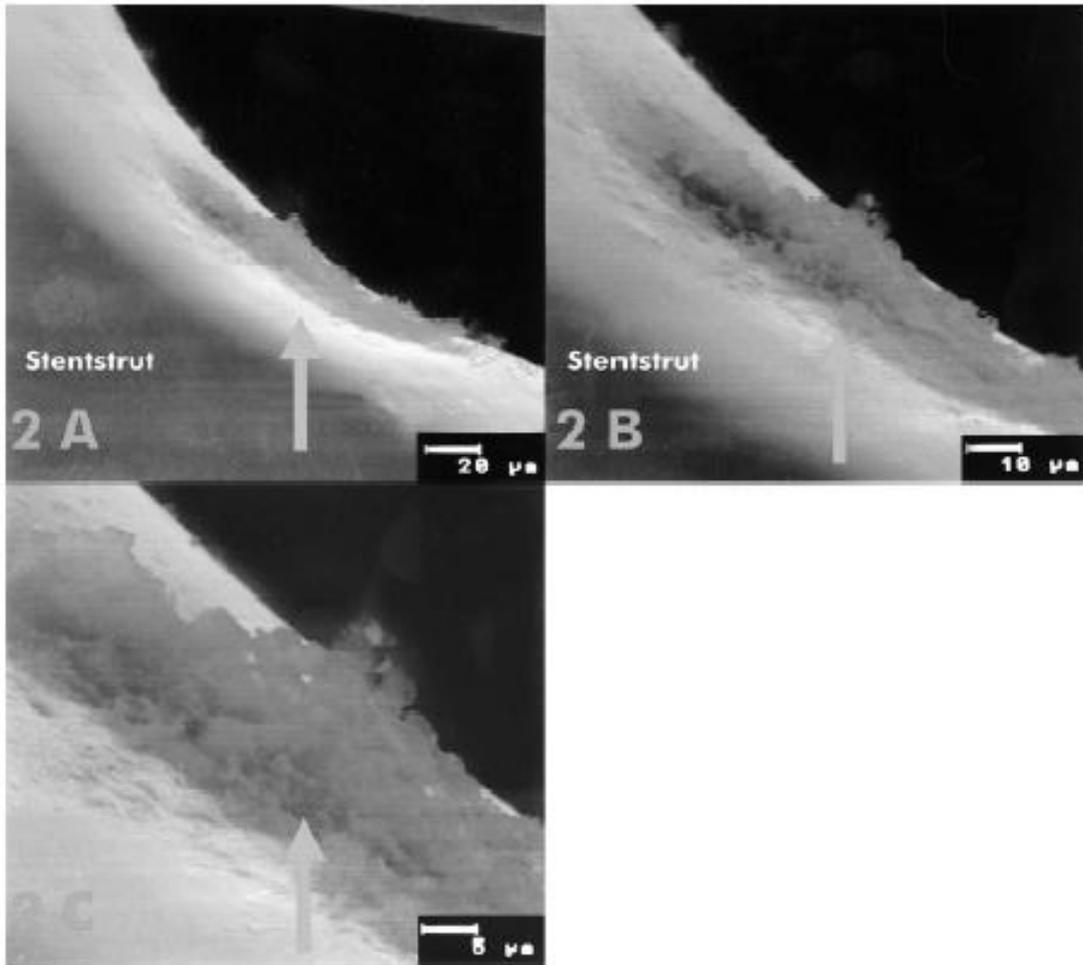


Abbildung 1: *Thrombotische Auflagerungen im Bereich einer Stentstrebe 48 Stunden nach Implantation. Der 68-jährige Patient, bei dem im kardiogenen Schock die Stentimplantation durchgeführt worden war, verstarb 48 Stunden nach Implantation.*

A, Ausschnittsvergrößerung einer Stentstrebe (500fach). B, bei stärkerer Vergrößerung kann eine Schichtung des thrombotischen Materials erkannt werden (100fach). C, das Metall ist von einer dünnen Proteinschicht überzogen. Erst in einer äußeren Schicht des Thrombus finden sich Erythrozyten (300fach). Aus (Grewe et al., 1997)

In den Anfängen der Stentimplantationen lagen die Stentthromboseraten bei über 6% (Schömig et al., 1996). Mit der Ablösung der antikoagulatorischen Therapie (Heparin zusätzlich zu Aspirin und überlappend Marcumar) durch die duale antithrombozytäre Therapie (Aspirin und Thienopyridin, ggf. ergänzt durch einen GP IIb/IIIa Antagonisten) konnte die Inzidenz der subakuten Stentthrombose auf 1-2% gesenkt werden (Lefkovitis et al., 1997; Gawaz et al., 1998; The EPISTENT Investigators, 1998; Schömig et al., 2000; Neumann et al., 2001).

Trotz sofortiger Maßnahmen wie rePTCA, Lyse oder auch Bypassoperation ist die subakute Stentthrombose immer noch mit einer hohen Mortalität behaftet. Die Patienten mit einer akuten Stentthrombose haben auch ein wesentlich schlechteres langfristiges Outcome. Die Ein-Jahr-Überlebensrate liegt bei diesen Patienten bei nur 80% im Gegensatz zu 97% bei Patienten ohne Stentthrombose. Auch die Infarktrate schwankt von 62% bei Patienten mit, bis zu 4% bei Patienten ohne vorherige Stentthrombose (Kastrati et al., 1998).

Dies zeigt, wie wichtig es ist, alle Risikofaktoren der Stentthrombose, vor allem auch die genetischen, herauszufinden, um so gezielter therapieren zu können.

1.5 Restenose

Die Restenose stellte zum Zeitpunkt dieser Studie mit einer Inzidenz von 20-50% ein weitgehend ungelöstes Problem der interventionellen Kardiologie dar. Man spricht von einer Restenose, wenn nach den ersten 6 Monaten nach Implantation eine Reduktion des Gefäßwanddurchmessers von mehr als 50% im behandelten Abschnitt zu verzeichnen ist (angiographische Definition), oder eine Reintervention während des ersten Jahres nach Intervention nötig war (Schömig et al., 1997).

Der Restenose liegt eine Neointimabildung zu Grunde, wodurch der initial gewonnene Lumendurchmesser wieder verloren geht. Die Ursache hierfür liegt in einer massiven Aktivierung der normalerweise ortsständigen und hochdifferenzierten glatten Gefäßmuskelzellen aus der Media. Dies führt zu einer Migration der nun phänotypisch veränderten, entdifferenzierten glatten Muskelzellen, welche wiederum große Mengen an extrazelluläre Matrix synthetisieren (MacLeod et al., 1994; Hoffmann et al., 1996; Komatsu et al., 1998).

Als auslösende Faktoren dieser exzessiven Aktivierung gelten

- 1) die Zerstörung des Endothels,
- 2) die initiale Interaktion von Thrombozyten mit der verletzten Gefäßwand und
- 3) die Infiltration von Leukozyten.

Das Endothel besitzt unter anderem die wichtige Funktion der Bildung einer antithrombotischen Oberfläche und der Regulation des Gefäßtonus. Darüber hinaus reguliert es die Funktion der glatten Gefäßmuskulatur.

Wie schon beschrieben erfolgt die vollständige Abdeckung der Neointima mit Endothel erst nach über 3 Monaten (Farb et al., 1999, Grewe et al., 2000). Es wird angenommen, dass ein Fehlen der Endothelzellschicht in der Früh- und Intermediärphase der Stentheilung einen

Kofaktor für die exzessive Proliferation der glatten Gefäßmuskulatur darstellt (van Beusekom et al., 1998).

Der Thrombozytenreaktion wird eine zentrale Rolle in der Aktivierung zugeschrieben. In Versuchen konnte durch Zugabe von thrombotischem Material in das Kulturmedium die Proliferationsrate der aus Neointima gewonnenen glatten Gefäßmuskelzellen deutlich erhöht werden (MacLeod et al., 1994)). Auch der von aktivierten Thrombozyten und auch Leukozyten ausgeschüttete platelet derived growth factor (PDGF) stellte sich aufgrund seiner chemotaktischen Wirkung auf SMCs (Ferns et al., 1991; Jawien, 1992) als ein wichtiger Faktor heraus. Durch Versuche in einem Angioplastiemodell der Ratte konnte nachgewiesen werden, dass eine Blockade dieses Faktors eine Hemmung der Neointimabildung verursacht (Ferns et al., 1991).

Die Ausbildung einer Restenose durch Neointimabildung dauert durchschnittlich 3-6 Monate (Kastrati et al., 1993; Grewe et al., 2000).

Wie Roller et al 2001 ausführten, stellen ein fortgeschrittenes Stadium der Erkrankung wie auch das weibliches Geschlecht klinische Risikofaktoren zur Entwicklung einer Restenose dar. Des weiteren führt eine erhöhte Plasmakonzentration von Fibrinogen, Lp(a), CRP, sowie ein Anstieg der vWF und PAI-1 Antigen Plasmakonzentration nach der Intervention zu einer schlechteren klinischen Prognose (Roller et al., 2001).

In einer Studie von Schömig et al 1997 konnte gezeigt werden, dass personengebundene aber unbekannte (möglicherweise genetische) Faktoren das Restenoserisiko beeinflussen müssen (Schömig et al., 1997). Eine weitere Studie zeigte, dass ein erhöhtes Risiko einer Restenose bei Patienten vorliegt, die bereits zuvor eine Restenose in einem anderen Gefäßabschnitt

entwickelt haben, unabhängig von den bekannten Risikofaktoren wie z.B. Nikotinabusus (Kastrati et al., 2000).

Somit scheint es sehr wichtig, das individuelle Risiko eines Patienten vorher bestimmen zu können, um Risikopatienten zu identifizieren.

Durch die Einführung der DES (drug eluting stents) konnten die Restenoseraten im Vergleich zu den BMS (bare metal stents) drastisch gesenkt werden (Eisenberg et al., 2006). DES geben bioaktive antiproliferative oder immunsuppressive Agentien lokal in hoher Konzentration direkt in die Gefäßwand ab und können so lokal auf den proliferativen Prozess einwirken (Douglas et al., 2007). Doch durch die steigende Anzahl an Interventionen und die Therapie immer komplexerer Erkrankungen mittels interventioneller Kardiologie bleibt die Restenose ein Risiko.

1.6 von Willebrand Faktor (vWF)

Der von Willebrand Faktor ist ein Glycoprotein und wurde von Zimmerman 1971 isoliert (Zimmermann et al., 1971).

Man findet ihn zirkulierend im Plasma, in den alpha-Granula der Thrombozyten und in der subendothelialen Matrix, dort auch gespeichert in Weibel-Körperchen.

Der vWF existiert in einer Reihe von Multimeren unterschiedlicher molekularer Größe, welche aus identischen Untereinheiten von ca. 250 kDA zusammengesetzt sind. Die Untereinheiten sind durch Disulfidbrücken miteinander verbunden.

Die maximale Anzahl von Untereinheiten in den größten Multimeren erreicht 50 bis 100. Die molekulare Masse reicht von ungefähr 500 kDA der kleinsten Einheit, eines Dimers, bis zu mehreren Tausend kDa des größten Moleküls (Peret et al., 1979; Ruggeri et al., 1981; Dent et al., 1991).

Die Größe des reifen vWF Multimers scheint, abhängig von der anatomischen Lokalisation des Moleküls, zu variieren. Die größten Multimere mit dem höchsten thrombogenen Potential befinden sich in den Zellen, das heißt also in den Endothelzellen und in den alpha-Granula der Thrombozyten, und nicht im Plasma (Sporn et al., 1986). Dies impliziert, dass die kleineren Multimere erst bei oder nach der Sekretion aus endothelialen Zellen erzeugt werden.

Die Hauptursache, wenn nicht sogar die einzige, für die Verkleinerung der großen vWF Multimere im Plasma ist die proteolytische Spaltung der Untereinheiten durch eine Metalloproteinase an der Bindungsstelle zwischen Tyr842 und Met843 (Furlan et al., 1996; Tsai et al., 1996).

Die Wirkung dieses Enzyms wird in vivo durch abscherende Kräfte gefördert, welche die dreidimensionale Form des vWF verändern und so die Bindungsstelle freilegen (Tsai et al., 1996).

In den Endothelzellen steuert der vWF nicht nur die Formation seiner eigenen Speichergranula, den Weibel-Körperchen, sondern steuert darüber hinaus die Speicherung anderer Proteine, wie z.B. P-Selektin, in diesen Granula (Denis CV, 2002).

1.6.1 Funktionen des vWF

Er besitzt 3 wesentliche Funktionen in der Hämostase:

1. Förderung der Thrombozytenadhäsion an Stellen, an denen die Gefäßwand verletzt ist.
2. Förderung der Thrombozytenaggregation während des Thrombuswachstums.
3. Er ist der Träger für den Gerinnungsfaktor VIII im Plasma und verlängert die Lebenszeit dieses Faktors im Plasma.

Die Hauptaufgabe des vWF besteht in der Einleitung der Adhäsion von zirkulierenden Thrombozyten an der verletzten Gefäßwand. Eine Verletzung des Endothels führt zu einer Freisetzung des vWF aus den Weibel-Körperchen und ermöglicht so die Bindung dessen an subendotheliales Bindegewebe, vor allem an Kollagen. Der vWF wird immobilisiert und seine Bindungsstellen für Thrombozyten freigelegt. Die hohe Affinität des thrombozytären vWF-Rezeptors, des Glykoproteins Ib/V/IX (siehe Abbildung 2) zu seinem Liganden ermöglicht die erste Adhäsion der Plättchen, ein Rollen auf der Gefäßwand (Kontaktphase) (Savage et al., 1998).

Dieser initiale Schritt der Thrombozytengefäßwandinteraktion kann bei hohem Scherstress, wie er unter anderem auf der Oberfläche der das Lumen bereits teilweise okkludierenden Koronarthromben vorliegt, durch keine andere Interaktion ersetzt werden, wie in der Studie von Frederickson et al gezeigt werden konnte (Fredrickson et al., 1998).

Auch die hereditären Erkrankungen, die mit einer erhöhten Blutungsneigung einhergehen, bei Mangel oder Störung des vWF (von Willebrand-Jörgens-Syndrom) oder bei der Störung des

vWF-Rezeptors (Bernard-Soullier-Syndrom) unterstreichen die enorme Bedeutung dieser Interaktion (Nurden et al., 1999).

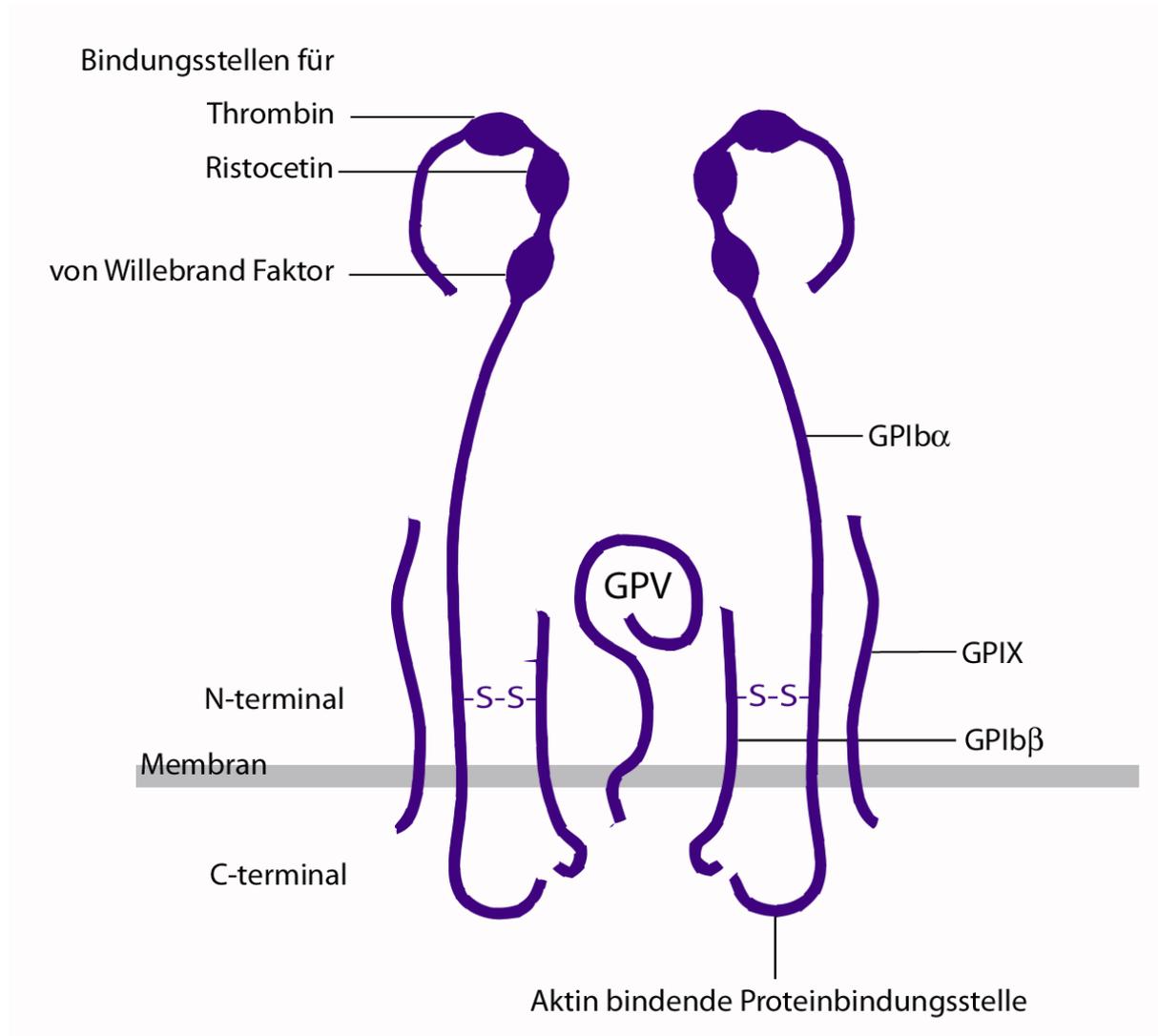


Abbildung 2: Struktur des Glycoprotein Ib-V-IX Rezeptors (vWF Rezeptor)

In einer Studie konnte gezeigt werden, dass sich unter dem Einfluss von hohem Scherstress die vWF-Multimere zu gestreckten linearen Molekülen entfalten (Siedlecki et al., 1996).

In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass auch im Plasma zirkulierender vWF eine neu erkannte Rolle bei der Adhäsion spielt. Versuche ergaben, dass vWF, gelöst im Plasma, sich für kurze Zeit an bereits gebundenen vWF binden kann und so auch wiederum die

Plättchenadhäsion vermitteln kann. Diese Selbstanordnung von vWF-Multimeren an der verletzten Gefäßwand könnte ein wichtiger Faktor sein, der die Adhäsion von Thrombozyten an der Gefäßwand entgegen der hämodynamischen Kräfte ermöglicht und somit auch das Thrombuswachstum fördert (Savage et al., 2002).

Die dauerhafte Adhäsion (Stabilisierungsphase) wird durch thrombozytäre Kollagenrezeptoren wie GP Ia/IIa oder GP VI, den Fibronektin- und den Lamininrezeptor, vermittelt. Erstere leiten wiederum zusätzlich die Aktivierung und Formveränderung der Thrombozyten ein (Moroi et al., 1997).

Freigesetztes Thromboxan A₂ und ADP fördern die auto- und parakrin bereits in Gang gesetzte Aktivierung (auch durch Sekretion der u.a. vWF enthaltenden alpha-Granula), was die Aggregation einleitet. Der thrombozytäre Fibrinogenrezeptor GP IIb/IIIa wird in einen fibrinogen-bindenden Zustand überführt und daraus resultiert die Vernetzung der Thrombozyten über Fibrinogenbrücken (Gawaz et al., 1991). Der aktivierte GPIIa/IIIb kann auch vWF binden, was besonders bei hohem Scherstress eine wichtige Rolle spielt (Ruggeri et al., 1999). Die Bindung von Fibrinogen und vWF an den GP IIa/IIIa-Rezeptor führt zu weiteren Aktivierungsschritten (outside-in signaling) und leitet die irreversible Aggregation ein. Wie unentbehrlich dieser Rezeptor für die Blutgerinnung ist, wird dadurch klar, dass eine genetische Störung eine der beiden Untereinheiten zu erhöhten Blutungsneigungen führt (Thrombasthenie Glanzmann).

An diese primäre Hämostase schließt sich die sekundäre Hämostase an, die vor allem durch die Bildung von mechanisch stabilem Fibrin gekennzeichnet ist. Diese wird durch enzymatisch aktives Thrombin vermittelt, welches aus Fibrinogen niedermolekulare Peptide abspaltet. Es bilden sich so Fibrinmonomere, die durch die Wirkung des Faktor XIII (aktiviert durch Thrombin) kovalente Bindungen untereinander eingehen. Inaktives Prothrombin wird durch eine Enzymaktivierung in aktives Thrombin überführt.

okkludierenden Koronarthrombus zu erzeugen (Nichols et al., 1990; Nichols et al., 1993). In mindestens zwei unabhängigen Studien wurde von einem Zusammenhang zwischen erhöhten Konzentrationen des vWF im Plasma und ischämischer Herzerkrankung berichtet. (Meade et al., 1994; Rumley et al., 1999). Des Weiteren wurden erhöhte vWF-Plasmakonzentrationen auch mit erhöhter Sterblichkeit nach Herzinfarkt, mit Reinfarkt und erhöhter Sterblichkeit bei Überlebenden eines Herzinfarktes in Verbindung gebracht (Jansson et al., 1991, Thompson et al., 1995).

Die Signifikanz des vWF bei der Entstehung einer Restenose oder Thrombose nach einem koronaren Eingriff wird durch eine Studie von Kageyama verdeutlicht. Nach Endothelverletzung durch Ballondilatation wurde durch die Gabe von AfvWF-2, einem monoklonalen Antikörper gegen menschlichen vWF, die Anlagerung von adhäsiven Proteinen wie auch die Formation eines organisierten Thrombus und folglich auch die Bildung einer Neointima verhindert (Kageyama et al., 2000). Recchia et al zeigten in Studien mit hypercholesterolämischen Schweinen, dass der Grad der Restenose bei Läsionen, die einen Thrombus enthalten, wesentlich größer war, als bei denen, die keinen enthielten (Recchia et al., 1995). In einer weiteren Studie gab es klinische Beobachtungen, dass die Anwesenheit eines angiographisch identifizierbaren Thrombus zum Zeitpunkt der angiographischen Prozedur mit höheren Restenoserraten assoziiert war (Violaris et al., 1996).

Die Variabilität der vWF Plasmakonzentrationen ist zu 75 % auf genetische und zu 25% auf umweltbedingte Ursache zurückzuführen (de Lange et al., 2001). Dieser starke genetische Einfluss unterstreicht wie wichtig es ist, genetische Variablen weiter zu erforschen.

1.6.2 von Willebrand Faktor Gen

Das vWF-Gen ist mit einer Länge von 180kb sehr groß. Es befindet sich am Ende des kurzen Armes des Chromosom 12. Das Gen beinhaltet 52 Exons.

Die Expression des vWF- Gens ist auf Megakaryozyten und Endothelzellen beschränkt.

Prepro-vWF ist das cDNA Produkt der Translation, ein Vorläuferpolypeptid, das aus 2813 Aminosäureresten besteht, mit einem 22 AS langen Signalpeptid. Das mit 741 AS-Resten ungewöhnlich große Propeptid, bestehend aus den Domänen D1-D2, welches während der Biosynthese vom Muttermolekül abgespalten wird, ist identisch mit dem von Willebrand Faktor Antigen II. Die reife vWF Untereinheit beinhaltet 2050 Aminosäurenreste. (Titani et al., 1986)

Der Aufbau des Prepro-vWF-Peptids und des vWF ist der nachfolgenden Grafik zu entnehmen.

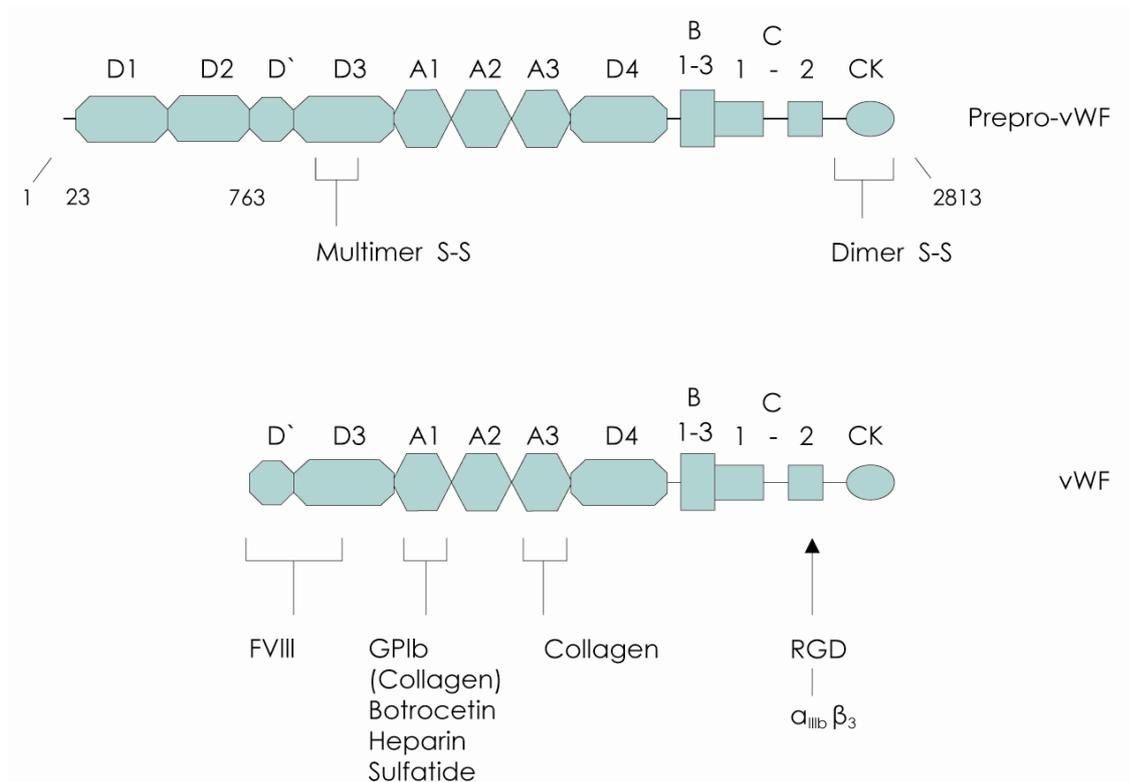


Abbildung 4: *Aufbau des vWF. Dargestellt sind der Aufbau des Prepro-vWF mit den Domänen A-D und der des reifen vWF. Im endoplasmatischen Retikulum entstehen die über Disulfidbrücken verbundenen Dimere. Disulfidbrücken, die zur Bildung von Multimeren führen, erscheinen erst spät im Absonderungsprozess. Es werden die zwei Rezeptoren für die Plättchenbindung gezeigt, GPIb und alphaIIb/beta3. Letztere enthält die Integrin Tripeptid Bindungsstelle (ArgGlyAsp). Andere interaktive molekulare Bereiche werden ebenso dargestellt. Nach Sadler et al., 1998.*

Die Domänen, die an Matrix- und Plättcheninteraktionen beteiligt sind, wurden bereits identifiziert. Die Domäne A3 spielt die wichtigste Rolle bei der Bindung von vWF an Kollagen (Huizinga et al., 1997) und die Domäne A1 bindet an das GP Ib des VWF-Rezeptors der Thrombozyten (Miyata et al., 1999). Die Sequenz Arg-Gly-Asp, die den Resten 1744 bis 1746 im Carboxyl-Ende der C1 Domäne entspricht (Titani et al., 1986), repräsentiert die wichtigste, wenn nicht sogar einzige Bindungsstelle für GP alphaIIb/beta3 (Plow et al., 1984). Die Bindungsstelle für Faktor VIII liegt zwischen den Aminosäuren 1-272 auf der D´ Domäne. Diese liegt am Amino-Ende und beinhaltet Disulfidbrücken zwischen den Ketten, welche anscheinend für die Bindung von Faktor VIII essentiell sind (Foster et al., 1987).

In Studien von Keightley et al 1999 und Harvey et al 2000, wurden 4 SNP's im vWF Promotergen identifiziert: -1793G/C, -1234C/T, -1185A/G und -1051G/A, welche sich in zwei bestimmte Haplotypen aufspalten: -1793G/-1234C/-1185A/-1051G (Haplotyp 1) und -1793C/-1234T/-1185G/-1051A (Haplotyp 2) (Keightley et al., 1999; Harvey et al., 2000). Es wurde eine signifikante Beziehung zwischen dem Promoter Genotyp und der Konzentration von Plasma-vWF-Ag festgestellt. Personen die homozygot für den Haplotyp 1 waren, hatten die höchsten Plasma-vWF-Ag Konzentrationen, während Personen die homozygot für den Haplotyp 2 waren, die geringsten Plasma-vWF-Ag-Konzentrationen aufwiesen. Die Möglichkeit, dass diese Variationen der Nucleotide direkt die Promoterfunktion und so auch die Höhe des zirkulierenden vWF im Plasma beeinflussen könnte, wird dadurch gestärkt, dass nukleare Proteine abhängig vom Genotyp unterschiedlich an 3 dieser Loci (-1793, -1234, -1051) binden.

Aufgrund der Assoziation zwischen Personen mit dem Genotyp GG/CC/AA/GG und erhöhten vWF Plasmaspiegeln, stellten wir die Hypothese auf, dass das vWF -1051G Allel mit einer

erhöhten Rate an Komplikationen nach koronarer Stentimplantation einhergehen könnte. Insbesondere lag unser Augenmerk hier auf der subakuten Stentthrombose und Restenose.

2. Methoden

2.1 Patienten und DNA-Extraktion

Es wurde bei allen Patienten mit symptomatischer koronarer Herzerkrankung, die in die Studie eingeschlossen waren, eine koronare Stentimplantation im Deutschen Herzzentrum München oder in der 1. Medizinischen Klinik, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München durchgeführt. Bei diesen 1850 konsekutiven Patienten wurde der vWF - 1051 A/G Genotyp bestimmt.

Alle teilnehmenden Patienten waren zuvor über die Studie aufgeklärt worden und hatten dieser schriftlich zugestimmt. Das Studienprotokoll war von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der TUM genehmigt worden. Die Stentimplantation erfolgte in der üblichen Art und Weise. Es wurden verschiedene Stenttypen verwendet.

Vor der Herzkatheteruntersuchung wurde den Patienten aus der arteriellen Schleuse EDTA-Blut entnommen und bei -21° eingefroren. Aus 200 μ l Vollblut wurde mit Hilfe kommerziell erwerblicher Kits (QIAamp Blood Kit, Quiagen, Hilden oder High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche Diagnostics, Mannheim) die genomische DNA aus Leukozyten extrahiert. Dies geschah durch eine Reihe von Lyse-, Filtrations- und Lösungsschritten. Die reinen DNA-Proben wurden wiederum bei -21° eingefroren und standen so für eine Vielzahl von Genotypisierungsexperimenten zur Verfügung.

2.2 Antithrombotische Therapie

Vor der Stentimplantation erhielten alle Patienten 500 mg Aspirin i.v. sowie Heparin als Bolus (15000 UE) mit anschließender Infusion über 12 Stunden (1000UE/Stunde).

Ein Teil der Patienten erhielt einen Heparinbolus (7500 UE) und zusätzlich den IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten Reopro (Abciximab) als Bolus (0,25mg/kg Körpergewicht) unmittelbar vor der Intervention mit anschließender Infusion über 12 Stunden (10 µg/min). Die postinterventionelle antithrombotische Therapie bestand aus der täglichen Gabe von 2x 250 mg Tiklopidin (für 4 Wochen) oder 1x 75 mg Clopidogrel (für 4 Wochen) und von 2 x 100mg Aspirin (unbegrenzt).

2.3 Definitionen

Als Diabetiker wurden die Patienten eingestuft, wenn sie insulinpflichtig waren oder orale Antidiabetika einnahmen. Entsprechend den Kriterien der WHO wurde diese Diagnose auch für diätetisch eingestellte Diabetiker vergeben bei positivem Glukosetoleranztest und/oder wenn während des Klinikaufenthaltes bei zwei stressfreien Blutentnahmen (nüchtern) erhöhte Blutzuckerwerte ($>140\text{mg/dl}$) festgestellt worden waren (World Health Organisation Study Group, 1985). Als Raucher galten die Patienten, die während der letzten 6 Monate regelmäßig rauchten. Bei systolischen Blutdruckwerten $> 140\text{mm Hg}$ und/oder diastolischen Blutdruckwerten $> 90\text{ mm Hg}$ bei mindestens zwei Messungen wurde eine arterielle Hypertonie diagnostiziert (Guidelines Subcommittee, 1999). Eine Hypercholesterinämie lag bei einer Serumkonzentration von nüchtern $> 240\text{mg/dl}$ vor. Ein durchgemachter Myokardinfarkt (MI) wurde durch die charakteristischen Veränderungen im 12-Kanal EKG diagnostiziert. Die Diagnose eines akuten MI wurde bei anhaltenden thorakalen Schmerzen ($<30\text{ min}$), verbunden mit einem Anstieg der Herzenzyme auf mindestens das Zweifache des oberen Normwertes und ST-Hebungen ($> 2\text{mm}$) in zwei benachbarten EKG-Ableitungen gestellt.

Eine dringliche Revaskularisierung des Zielgefäßes war eine PTCA (mit oder ohne Stentimplantation) oder Bypass-OP während der ersten 30 Tage nach Stentimplantation. Die Diagnose einer „subakuten Stentthrombose“ wurde angiographisch (Nachweis eines TIMI-Flusses Grad 1 oder Grad 0) während der ersten 30 Tage nach Intervention gestellt. Die quantitativen Analysen der Angiographiefilme erfolgten auf einem separaten Computersystem (CMS, Medis Medical Imaging Systems, Niederlande). Die folgenden Messwerte wurden für jedes behandelte Gefäßsegment erhoben: minimaler Lumendurchmesser der Stenose vor Intervention, Stenosenlänge, maximaler Durchmesser des Ballons, minimaler

Lumendurchmesser innerhalb des Stents und Referenzdurchmesser nach Intervention. Die qualitative Beurteilung der Läsion wurde nach dem modifizierten Klassifikationssystem des American College of Cardiology und der American Heart Association vorgenommen (Ryan et al., 1988). Die Gefäßläsionen vom Typ B2 und Typ C wurden als komplexe Läsionen bewertet. Als angiographische Restenose wurde eine Durchmesserstenose von größer oder gleich 50% bei der Kontrollangiographie definiert.

2.4 Studienendpunkte

Primärer Endpunkt der Studie war das Auftreten thrombotischer Ereignisse (Tod, Myokardinfarkt, dringliche Revaskularisierung) innerhalb der ersten 30 Tage nach Intervention.

Sekundärer Endpunkt war das Auftreten einer Restenose entweder als angiographische Restenose zum Zeitpunkt der Kontrollangiographie 6 Monate nach der Intervention ($\geq 50\%$ Durchmesserstenose) oder als eine klinische Restenose (Revaskularisierung des behandelten Gefäßes innerhalb des ersten Jahres nach der Intervention aufgrund erneuter Angina pectoris Symptomatik).

Analysiert wurde auch das Risiko für Tod und Myokardinfarkt während des ersten Jahres nach Stentimplantation.

2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Methoden zur Genotypisierung beruhen auf der Polymerasekettenreaktion (PCR). Durch die PCR ist es möglich einen bestimmten Abschnitt der DNA (Amplikon) zu vervielfältigen. Es handelt sich um ein zyklisches Verfahren, bei dem sich die Anzahl der Kopien bei jedem Zyklus verdoppelt und es so zu einem exponentiellen Anstieg der DNA-Kopien kommt.

Zunächst kommt es durch Erhitzen der DNA auf eine Temperatur von 95° in dem PCR-Gerät (Thermocycler) zu einer Trennung der beiden DNA-Stränge. Dann wird die Temperatur soweit heruntergefahren, dass sich die vorher ausgewählten Primer (Oligonukleotide von in der Regel 15-20 Basen Länge) spezifisch an die Enden des zu vervielfältigenden DNA-Segmentes anlagern (Annealing). Die Taq- (DNA-) Polymerase katalysiert die Verlängerung der Primer, wobei die in geeigneten Puffer gelösten Nucleotide (dNTPs) als Bausteine dienen.

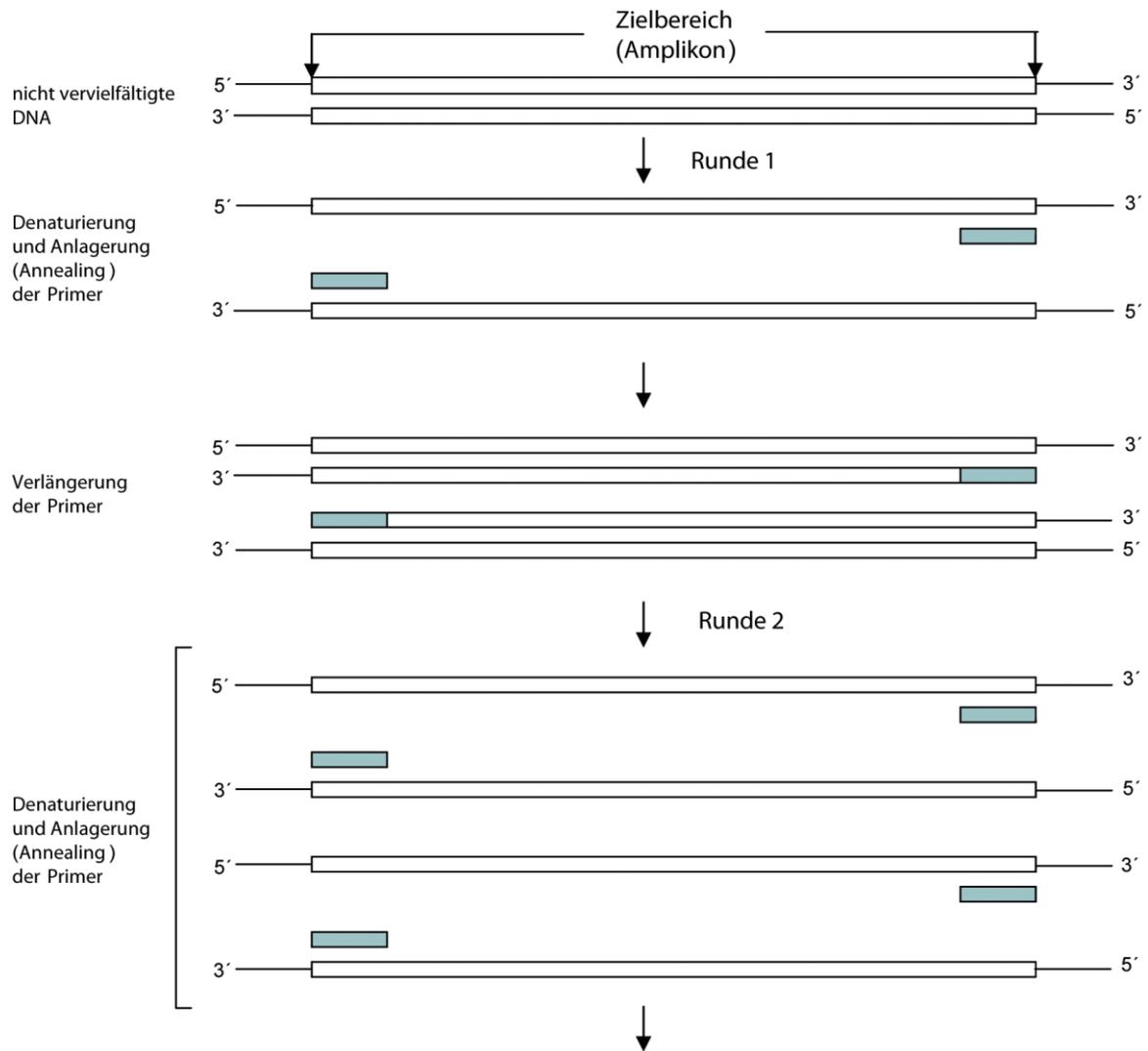


Abbildung 5: *Das Prinzip der Polymerasekettenreaktion*

2.6 Restriktionsenzymanalyse zur vWF -1051G/A Genotypisierung

Zunächst wurde bei 100 gesunden Spendern (Klinik- und Labormitarbeiter) mit Hilfe der PCR und einer Restriktionsenzymanalyse der vWF -1051G/A bestimmt. Diese „Standard-„ DNA Proben der beiden homozygoten Genotypen (in diesem Fall -1051GG und -1051AA) wurden für das anschließende TaqMan-Verfahren benötigt.

Aus der Promoterregion wurde ein 285 Basenpaare (bp) großer DNA-Abschnitt mit den ausgewählten Primern amplifiziert. Tabelle 1 enthält die Sequenzen der Primer. Für diese „einfache“ PCR wurden als Thermocycler „Primus 96 plus“ oder „GeneAmp PCR System 9600“ benutzt. Wir verwendeten folgendes Temperaturprotokoll: 2 min 95°C (DNA-Denaturierung), 1 min Anlagerungstemperatur (erhöht auf 64°), 35 x (1 min 95° gefolgt von 1 min Anlagerungstemperatur (64°)), 7 min 72°C (Temperaturoptimum der TaqPolymerase zur Komplettierung der DNA-Stränge). Tabelle 2 zeigt die Zusammensetzung dieses Reaktionsansatzes.

Tabelle 1: *Primersequenzen für die Amplifikation der 285 bp großen, die polymorphe Base beinhaltenden, DNA-Sequenz des vWF Gens*

Primersequenzen	
1 (vWF11)	5' TCC CAA AGT GCT GGG ATT ACA 3'
2 (vWF12)	5'GCA GAA TCA GCA TGA GAC AGT AGA A 3'

Tabelle 2: *PCR-Ansatz für die Genotypisierung des vWF -1051G/A Polymorphismus*

Bestandteile	Menge
H ₂ O (deionisiert)	14,4 µl
10xPCR-Puffer (Quiagen)	2,0 µl
10mM dNTP-Mix (Gibco)	0,4 µl
Primer vWF11 (10µM)	0,4 µl
Primer vWF12 (10µM)	0,4 µl
Taq-Pol (Quiagen)	0,4 µl
DNA-Probe	2,0 µl

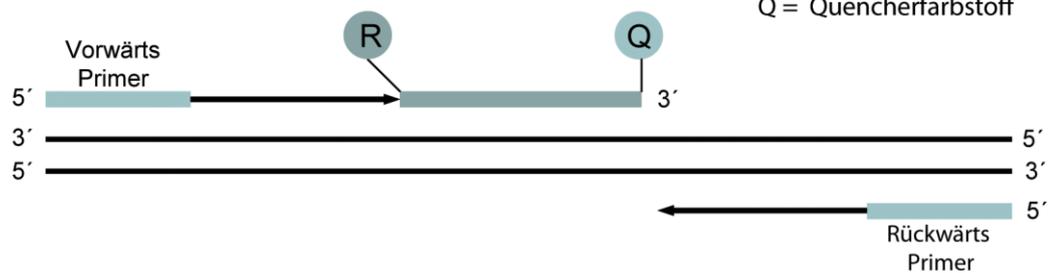
Jedes Experiment enthielt eine Negativkontrolle, um eine Kontamination mit fremder DNA auszuschließen. Dafür wurde anstatt der DNA-Probe Wasser zu dem beschriebenen Reaktionsansatz hinzugefügt. Nach Abschluss der PCR und Entnahme der Proben aus dem Thermocycler wurde der Restriktionsenzymverdau mit der Restriktionsendonuklease Hsp 92II durchgeführt. Hsp 92 II verdaute das -1051A spezifische PCR-Produkt in 3 Fragmente von 149bp, 101 bp und 35 bp und das -1051G spezifische Produkt in 2 Fragmente von 149bp und 136 bp.

Die Identifizierung der Fragmente erfolgte durch Elektrophorese auf einem Polyacrylamidgel. Dafür wurden 5µl des verdauten Amplifikates mit 2,5µl 5fach konzentrierter Ficoll-Lösung gemischt und auf ein 6% Polyacrylamidgel geladen. Um ein Maß für die Größe der entstandenen Fragmente zu erhalten, wurde 1µl Molekulargewichtsmarker VIII mit 9µl Aqua destillata und 2,5 µl 5fach konzentrierter Ficoll-Lösung neben den zu untersuchenden Proben aufgetragen. Der verwendete Laufpuffer bestand aus 45 ml 10xTBE-Puffer verdünnt mit 955ml Wasser. Die Auftrennung erfolgte bei 100 V für 40 min. Nach abgeschlossener Elektrophorese wurden durch die Anfärbung mit Ethidiumbromid und 312nm UV-Bestrahlung die entstandenen Bahnen sichtbar gemacht. Die Photodokumentation der Gele erfolgte mit einem digitalen System (Gelprint 2000, MWG-Biotech).

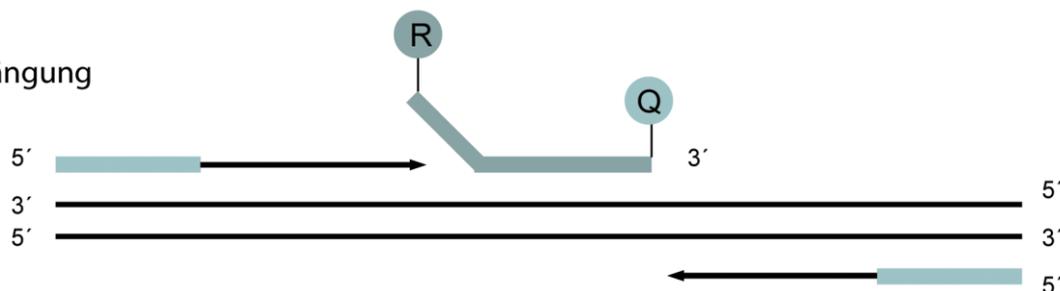
2.7 TaqMan-Verfahren

Die Methodik dieses Verfahrens basiert auf dem 5'Nuklease Assay (Livak, 1999). Für die Genotypisierung eines diallelen Polymorphismus sind ein Primerpaar und zwei für die beiden Allele spezifische fluorogene DNA-Sonden nötig. Die Sonden sind zum DNA-Abschnitt um die polymorphe Stelle komplementäre Oligonukleotide, die mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (Reporterfarbstoff am 5'Ende und Quencherfarbstoff am 3'Ende) markiert sind. Die Reporterfarbstoffe, mit der die beiden allelspezifischen Sonden markiert sind, sind unterschiedlich. Die Nähe des Quencher-Farbstoffs zum Reporter-Farbstoff verringert die Fluoreszenz des letzteren. Während einer PCR wird nun die an einen DNA-Strang innerhalb des Amplikons gebundene fluorogene Sonde durch die 5'Nuklease-Aktivität der TaqDNAPolymerase geschnitten und dabei zerstört. Dies führt zur räumlichen Trennung der beiden Farbstoffe und damit zu einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität des Reporter-Farbstoffs. Die Bestimmung des Genotyps erfolgt durch die Auswertung der allelspezifischen Fluoreszenzsignale.

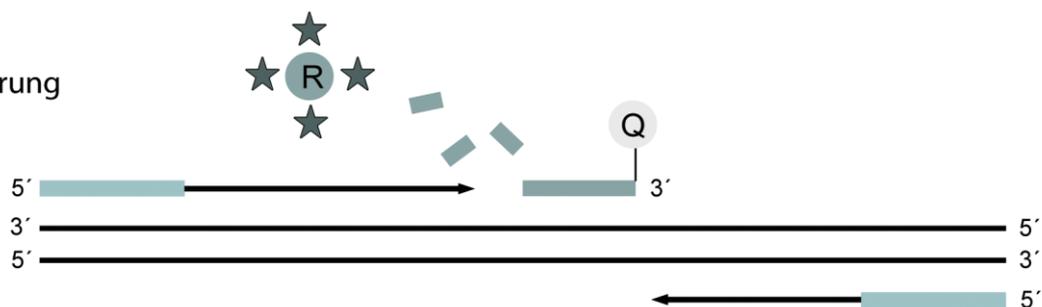
Anlagerung



Verdrängung



Zerstörung



Zyklus - Vervollständigung

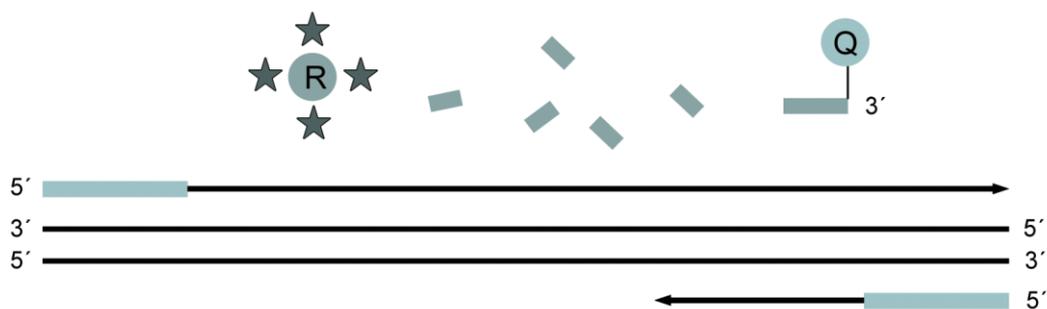


Abbildung 6: Grundlegendes Prinzip des TaqMan-Verfahrens. Während der PCR werden die sich zuvor angelagerten Sonden abgespalten, was zur räumlichen Trennung von Reporter- und Quencherfarbstoff und damit zu einem allelspezifischen Signal führt.

2.8 Bestimmung des vWF -1051G/A Genotyps mittels TaqMan –Verfahren

Die A Allel Sonde war mit dem Reporterfarbstoff FAM (6-Carboxyfluoreszin) und die G Allel Sonde mit dem Reporter VIC (PE Biosystems, Patent ausstehend) am 5'Ende markiert. Das 3'Ende der Sonden trug jeweils den Quencherfarbstoff TAMRA (6-Carboxytetramethylrhodamin). Mit Hilfe der Primer Express Software (PE Biosystems, Weiterstadt) wurden die nötigen Primer und markierten Sonden ausgewählt. Die verwendeten Primer und Sonden sind in den Tabellen 3 und 4 aufgelistet, sie wurden von Applied Biosystems bezogen.

Die Tabelle 5 zeigt die Bestandteile des Reaktionsmix, mit dem der TaqMan Assay zur Bestimmung des vWF -1051G/A Polymorphismus durchgeführt wurde.

Tabelle 3: *Nukleotidsequenzen der Primer für den vWF -1051G/A TaqMan Assay*

Primersequenzen	
Vorwärtsprimer	5'TCC CAA AGT GCT GGG ATT ACA 3'
Rückwärtsprimer	5'GCA GAA TCA GCA TGA GAC AGT AGA A 3'

Tabelle 4: *Nukleotidsequenzen der Sonden für den vWF -1051G/A TaqMan Assay*

Sequenzen der Sonden	
Allel G (FAM)	5'ACC ACC ATG CCC GGC CC 3' *
Allel A (VIC)	5'ACC ACC GTG CCC GGC CC 3' *

*Polymorphe Basen in fetter kursiver Schrift

Tabelle 5: *Bestandteile des Reaktionsmix*

Bestandteile	Menge
H ₂ O (deionisiert)	790µl
Universal Master Mix	1100µl
Vorwärts (Forward) Primer (20µM)	33µl
Rückwärts (Reverse) Primer (20 µM)	33µl
FAM-markierte Sonde (10µM)	22µl
VIC-markierte Sonde (10µM)	22µl

Für den Reaktionsansatz wurde eine 96 Loch (Well-) Platte verwendet. Die ersten 8 Wells enthielten zur Kontrolle 20µl Reaktionsmix plus 2µl Wasser (Kontrollen), jeweils 8 Wells enthielten 20µl Reaktionsmix und 2µl DNA von homozygoten Trägern der beiden Allele (DNA-Standards) und die letzten 72 Wells enthielten die 20µl Reaktionsmix und 2µl DNA mit unbekanntem Genotyp. So war es möglich, 72 DNA-Proben gleichzeitig zu analysieren. Für die Reaktion wurden die Thermocycler „GeneAmp PCR System 9600“, „GeneAmp PCR System 9700“ oder „ABI Prism 7700 Sequenz Detection System“ benutzt. Das PCR Protokoll bestand aus folgenden Schritten: 50° für 2 Minuten, 95° für 10 Minuten, gefolgt von 40 Zyklen der Denaturierung bei 95° für 15 Sekunden und des Annealings bei 64° für eine Minute. Die Analyse der Proben erfolgte mit Hilfe des „ABI Prism 7700 Sequenz Detection System“. Für jeden der drei Genotypen des vWF -1051G/A Polymorphismus wird das charakteristische Fluoreszenzspektrum aufgezeichnet und weiterverarbeitet (homozygot 1051GG, heterozygot -1051 GA, homozygot -1051AA). Das Ergebnis liegt dann in Form eines Diagramms vor. Ein isolierter Anstieg von FAM oder VIC Fluoreszenz war charakteristisch für G bzw. T Allel Homozygotie. Ein Anstieg beider Signale wies auf Heterozygotie der untersuchten DNA hin.

Die klinischen und die angiographischen Daten der Patienten waren mir zum Zeitpunkt der Genotypisierung nicht bekannt. Jede fünfte Bestimmung wurde mit Hilfe getrennt isolierter DNA wiederholt.

2.9 Materialien und Geräte

Geräte

PCR-Thermocycler:

-Authorized thermal Cycler for PCR	Hybaid, Heidelberg
-primus 96 Plus	MWG-Biotech, Ebersberg
-GeneAmp PCR System 9600	Applied Biosystems, Weiterstadt
-GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems, Weiterstadt
-ABI Prism 7700 Sequenz Detection System	Applied Biosystems, Weiterstadt

Spannungsquelle:

-Power N Pac 300	Bio-Rad, München
------------------	------------------

Elektrophorese-Kammer:

-Xcell II	Novex, Karlsruhe
-----------	------------------

Zentrifugen:

-Zentrifuge CR3-12	Jouan, ST. Herblain, Frankreich
-Zentrifuge A 14	Jouan, ST. Herblain, Frankreich
-Biofuge fresco	Herraeus Instruments, Hanau

Mixer:

-Vortexer	Genio2TM Bender&Obein AGV Zürich, Schweiz
-Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg

Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

DNA-Isolierung:

- | | |
|---|----------------------------------|
| -QIAamp DNA Blood Mini Kit | Qiagen GmbH, Hilden |
| -High Pure PCR Template Preparation Kit | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |

Enzyme:

- | | |
|-------------------------------------|---------------------------------|
| -TaqMan Universal PCR Master Mix | Applied Biosystems, Weiterstadt |
| -Taq-Pol | Qiagen GmbH, Hilden |
| -Restriktionsendonuklease Hsp 92 II | MBI Fermentas, st. Leon-Rot |

Gel:

- | | |
|-----------------------|------------------|
| -6 % Polyacrylamidgel | Novex, Karlsruhe |
|-----------------------|------------------|

PCR-Gefäße:

- | | |
|---|---------------------------------|
| -PCR Tubes, 0,5 ml ultradünn | Eppendorf, Hamburg |
| -MicroAmpR Optical 96-Well Reaction Plate | Applied Biosystems, Weiterstadt |
| -MicroAmpR Optical Caps (8 Caps/Strip) | Applied Biosystems, Weiterstadt |

Sonstiges:

- | | |
|-------------------------------|----------------------------------|
| -Molekulargewichtsmarker VIII | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
|-------------------------------|----------------------------------|

Primer und Sonden für das TaqMan-Verfahren wurden von Applied Biosystems bezogen.

Puffer und Lösungen

PCR-Puffer:

- | | |
|----------------|---------------------|
| -10xPCR-Puffer | Qiagen GmbH, Hilden |
|----------------|---------------------|

2.10 Statistik

In den Hauptanalysen wurden jeweils die Ereignisse der Patienten mit den 3 Genotypen (AA, AG, GG) miteinander verglichen.

Diskrete Variablen wurden entweder als Zahl oder als Prozentanteil (%) angegeben und mittels Chi-Quadrat oder exaktem Test nach Fischer verglichen. Kontinuierliche Variablen wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung (\pm S.D.) angegeben und mit einer Varianzanalyse (ANOVA) für mehr als zwei Gruppen verglichen.

Mit dem Programm S-Plus, Version 4.0 Professional (Mathsoft, Inc., Seattle, WA) wurde die statistische Auswertung durchgeführt. Als signifikant wurden P Werte unter 0,05 angenommen.

3. Ergebnisse

3.1 Eigenschaften der Patienten

Die vWF-1051A/G Genotypverteilung war: 795 (42,97%) AA, 800 (43,04%) AG und 255 (14,2%) GG. Die A Allel Frequenz betrug 64,6% und die G Allel Frequenz 35,4%. Die Genotypverteilung entsprach dem Hardy-Weinberg-Gesetz ($p=0,02$). Die Daten sind graphisch in Abbildung 7 dargestellt.

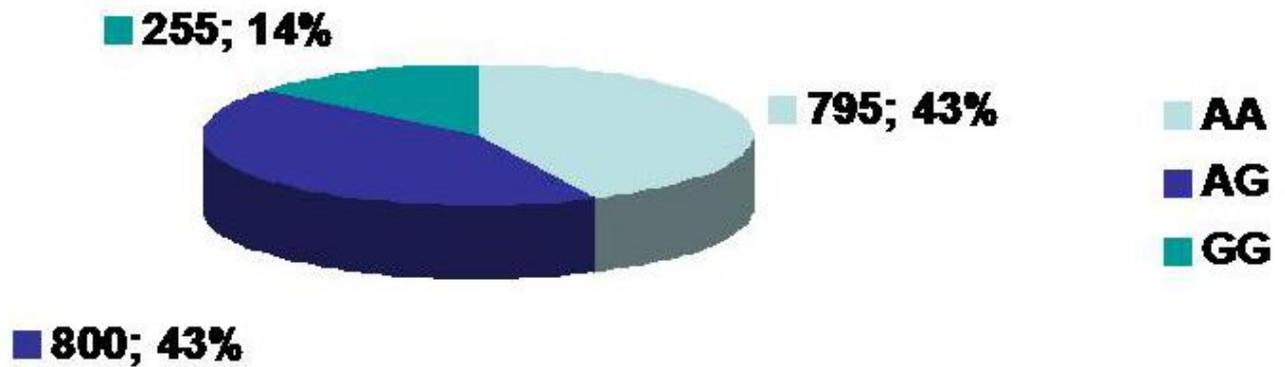


Abbildung 7: Die Verteilung des -1051G/A Genotyps in der untersuchten Patientenpopulation

Die klinischen Eigenschaften der AA, AG und GG Patienten waren in vielerlei Hinsicht miteinander vergleichbar (siehe Tabelle 6). Das Alter ($63,22 \pm 10,40$ vs. $62,59 \pm 9,92$ vs. $63,61 \pm 9,23$; $P = 0,26$) wie auch der Anteil an Frauen (20,8% vs. 21,8% vs. 20,4; $P = 0,85$), an Patienten mit arterieller Hypertonie (68,7% vs. 68,9% vs. 63,5%; $P = 0,25$), an aktiven Rauchern (29,4% vs. 32,6% vs. 29,4%; $P = 0,34$) und Patienten mit Hypercholesterinämie (41,0%, vs. 43,5% vs. 46,3%; $P = 0,29$) unterschieden sich nicht signifikant zwischen den 3 Genotypen. Es gab einen leichten Trend dahin, dass die GG Patienten im Vergleich zu den AG oder AA Patienten etwas häufiger Diabetiker waren, jedoch ohne signifikanten Unterschied (20,9% und 19,6% vs. 25,5%, $P = 0,13$). Eine instabile Angina pectoris war bei den AA Patienten etwas häufiger aufgetreten als bei den AG oder GG Patienten, jedoch auch ohne signifikanten Unterschied (26,8% und 27,2% vs. 32,9%; $P = 0,14$). Ein akuter Myokardinfarkt lag bei 21,0 % der AA, bei 19,9% der A/G und 19% der GG Patienten vor ($P = 0,77$). Der Anteil der Patienten mit durchgemachten Myokardinfarkt (27,9% vs. 25,2%, vs. 28,2%; $P = 0,41$), vorheriger PTCA (26,3% vs. 23,1 % vs. 23,5%; $P = 0,31$) oder eingeschränkter linksventrikulärer Funktion (30,8 % vs. 29,0% vs. 26,3%; $P = 0,36$) war bei den 3 Genotypen ähnlich. Bei der Zahl der beteiligten Gefäße ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede ($P = 0,69$).

Tabelle 6: *Klinische Eigenschaften der Patienten*

	AA	AG	GG	P
	(n=795)	(n=800)	(n=255)	
Alter (in Jahren)	63,22 ± 10,40	62,59 ± 9,92	63,61 ± 9,23	0,26
Frauen	20,8	21,8	20,4	0,85
Arterielle Hypertonie	68,7	68,9	63,5	0,25
Diabetes mellitus	20,9	19,6	25,5	0,13
Aktive Raucher	29,4	32,6	29,4	0,34
Hypercholesterinämie	41,0	43,5	46,3	0,29
Instabile Angina pectoris	26,8	27,2	32,9	0,14
Akuter Myokardinfarkt (MI)	21,0	19,9	19,2	0,77
Z.n. Myokardinfarkt	27,9	25,2	28,2	0,41
Z.n. PTCA	26,3	23,1	23,5	0,31
Z.n. Bypass-Operation	11,9	11,2	7,8	0,19
Eingeschränkte linksventrikuläre Funktion	30,8	29,0	26,3	0,36
Zahl der beteiligten Gefäße				0,69
1	27,9	29,0	26,7	
2	33,8	30,6	33,3	
3	38,2	40,4	40,0	

Alter ist als Mittelwert ± S.D. angegeben, die anderen Daten als Anteil der Patienten in

Prozent

3.2 Eigenschaften der Läsionen und der Interventionen

Die Eigenschaften der Läsionen waren im Wesentlichen ausgeglichen zwischen den AA, AG und GG Patienten verteilt. Die Verteilung der implantierten Stents auf die verschiedenen Koronararterien zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den AA, AG und GG Patienten ($P = 0,68$). Die Stentimplantation erfolgte aufgrund einer Restenose bei schon vorher mit einem Stent versorgten Gefäß bei 26,3% der AA Patienten und somit etwas häufiger als bei den AG Patienten (23,5%). Bei den GG Patienten war dieser Anteil am Geringsten (20,4%). Dies war jedoch ohne Signifikanz ($P = 0,13$). Komplexe Läsionen wurden in allen drei Gruppen gleich häufig behandelt ($P = 0,54$). Es gab einen leichten Trend dahin, dass die AA Patienten häufiger chronische Okklusionen im Vergleich zu den AG und den GG Patienten aufwiesen, ohne dass der Unterschied jedoch statistisch signifikant war (7,67 % vs. 5,25 % und 5,88%; $P = 0,13$). Eine Reopro Therapie erhielten 20,6 % der AA, 18,2 % der AG und 21,2 % der GG Patienten ($P = 0,40$).

Auch bei den Interventionscharakteristika gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den 3 Genotypen.

Tabelle 7: *Läsionsbezogene Charakteristika zum Zeitpunkt der Intervention*

	AA (n=795)	AG (n=800)	GG (n=255)	P
<i>Lage des implantierten Stents</i>				0,68
-Hauptstamm	1,13	2,00	0,78	
-LAD	39,37	39,62	40,78	
-LCx	19,50	19,50	22,75	
-RCA	32,96	32,00	30,59	
-Venengraft	7,04	6,88	5,10	
Chronische Okklusionen	7,67	5,25	5,88	0,13
Komplexe Läsionen	75,50	73,40	76,1	0,54
Restenotische Läsionen	26,3	23,5	20,4	0,13
Reopro Therapie	20,6	18,2	21,2	0,40

Daten sind als Anteil der Patienten in Prozent angegeben

Tabelle 8: *Eigenschaften der Intervention*

	AA (n=795)	AG (n=800)	GG (n=255)	P
<i>Vor Stentimplantation</i>				
-Referenzdurchmesser (mm)	3,05±0,55	3,04±0,53	3,02±0,49	0,78
-Minimaler Lumendurchmesser (mm)	0,64±0,50	0,64±0,49	0,65±0,49	0,94
-Läsionslänge (mm)	12,00±6,81	12,16±6,48	12,18±7,30	0,87
<i>Während Stentimplantation</i>				
-Verhältnis von Ballon zu Gefäß	1,07±0,09	1,07±0,10	1,08±0,10	0,44
-Maximaler Ballondruck (atü)	13,77±3,32	13,87±3,29	14,01±3,21	0,60
-Länge des gestenteten Gefäßsegments (mm)	20,76±15,42	19,62±12,88	19,98±12,22	0,26
<i>Unmittelbar nach Stentimplantation</i>				
-Minimaler Lumendurchmesser (mm)	2,94±0,51	2,93±0,53	2,90±0,53	0,48

Daten sind als Mittelwerte ± S.D. angegeben

3.3 Akute und subakute thrombotische Ereignisse nach Stentimplantation

Die Inzidenz thrombotischer Ereignisse während der ersten 30 Tage nach Stentimplantation zeigte allenfalls einen leichten Trend hin zu mehr Ereignissen in der Gruppe von Patienten mit dem Genotyp AA (6,29% vs. 4,5% und 4,3%). Dieser Unterschied war allerdings ohne Signifikanz ($p=0,21$). Die Mortalität innerhalb der ersten 30 Tage war in der Gruppe der Patienten mit AG im Vergleich zu denen mit AA oder GG höher (1,38% vs. 0,75% und 0,00%) ohne jedoch signifikant zu sein ($p=0,11$). Die Rate des Myokardinfarktes war etwas höher bei den GG Patienten im Vergleich zu den AA und AG Patienten, was vor allem auf die erhöhte Rate der Q-Wellen Infarkte bei den GG Patienten zurückzuführen ist (1,96% vs. 1,13% und 0,5%), jedoch ohne Erreichen einer Signifikanz ($p=0,10$). Die Rate der dringlichen Revaskularisierungen lag bei der Gruppe der Patienten mit AA bei 3,52% und somit höher als bei der Gruppe der Patienten mit GG (2,35%). Bei der Gruppe der Patienten mit AG war die Rate am Geringsten (1,88%). Dies war jedoch ohne Signifikanz ($p=0,12$).

Tabelle 9: *Klinische Ereignisse innerhalb der ersten 30 Tage nach Stentimplantation*

	AA	AG	GG	P
	(n=795)	(n=800)	(n=255)	
Tod	0,75	1,38	0,00	0,11
Myokardinfarkt	3,77	2,38	3,92	0,22
- Q-Welle	1,13	0,50	1,96	0,10
- nicht Q-Welle	2,64	1,88	1,96	0,55
Dringliche Revaskularisierung	3,52	1,88	2,35	0,12
Ein oder mehrere Ereignisse	6,29	4,50	4,31	0,21

Daten sind als Anteil der Patienten in Prozent angegeben

3.4 Restenose

Bei 1556 Patienten (84% der ursprünglich eingeschlossenen Population, n = 1850) konnte eine Kontrollangiographie 6 Monate nach Intervention in den Kliniken der Technischen Universität München durchgeführt werden. Der Anteil von Patienten mit vollständigen angiographischen Daten unterschied sich nicht zwischen den drei Genotypgruppen (bei 84,1% AA, 85% AG und 81,2 % der GG Patienten). Die quantitativen Ergebnisse der Kontrollangiographie wie minimaler Lumendurchmesser, Lumenverlust sowie Verlustindex waren vergleichbar zwischen den Gruppen der Patienten mit den Genotypen AA, AG und GG.

Die angiographische Restenoserate 6 Monate nach der Stentimplantation betrug bei den AA Patienten 33,9%, bei den AG Patienten 31,3% und bei den GG Patienten 35,3% (P=0,45). Auch die klinische Restenoserate war bei den GG Patienten mit 23,95% höher als bei den AG und den AA Patienten (19,85% und 20,38%), ohne jedoch signifikant zu sein. Dies ist in der Abbildung 8 graphisch dargestellt.

Tabelle 10: *Quantitative Parameter der Restenose*

	AA (n=669)	AG (n=680)	GG (n=207)	P
Minimaler Lumendurchmesser (mm)	1,72±0,93	1,77±0,94	1,65±0,87	0,22
Lumenverlust (mm)	1,23±0,85	1,17±0,85	1,23±0,79	0,45
Verlustindex (%)	0,57±0,41	0,55±0,44	0,58±0,40	0,52
Restenose (%)	33,9	31,3	35,3	0,45

Parameter sind als Mittelwerte ± S.D. bzw. als Anteil der Patienten in Prozent angegeben



Abbildung 8: *Angiographische und klinische Restenoserate bei den –1051AA, den –1051AG und den –1051GG Patienten (klinische Restenose = RePTCA + ACVB)*

3.5 Langfristiger klinischer Verlauf (1 Jahr) nach Stentimplantation

Die Rate ein oder mehrerer klinischer Ereignisse nach Stentimplantation im langfristigen klinischen Verlauf zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patienten der unterschiedlichen Genotypen ($p=0,5$). Bei den Gruppen von Patienten mit den unterschiedlichen Genotypen waren die Mortalitätsrate und auch die Rate der Revaskularisation der Zielgefäße ähnlich.

Tabelle 11: *Klinische Ereignisse innerhalb eines Jahres nach Stentimplantation*

Daten sind als Anteil der Patienten in Prozent angegeben

	AA (n=795)	AG (n=800)	GG (n=255)	P
Tod	2,64	2,38	2,35	0,93
Myokardinfarkt	4,91	3,00	4,71	0,13
Revaskularisierung der Zielgefäße	20,1	19,8	22,7	0,58
Ein oder mehrere Ereignisse	24,4	23,1	26,7	0,50

4. Diskussion

In dieser Studie wurde der Einfluss des -1051vWF AG Polymorphismus auf den klinischen und angiographischen Verlauf nach koronarer Stentimplantation untersucht.

Die Ergebnisse unserer Studie zeigten keinerlei Assoziationen zwischen dem -1051 GG Genotyp in dem Promoter des vWF Gens und einem erhöhten Risiko einer thrombotischen Frühkomplikation nach Stentimplantation. Hier ist zu sagen, dass es sogar eher einen leichten Trend hin zu mehr Frühkomplikationen bei der Gruppe der Patienten mit dem Genotyp AA gab, obwohl dies der Genotyp ist, bei dem man die niedrigsten vWF Plasmaspiegel erwartet hätte. Auch die Restenoserate zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den unterschiedlichen Genotypen. Hier zeigte sich allenfalls ein leichter Trend hin zu höheren Restenoseraten klinisch wie auch angiographisch bei der Gruppe der Patienten mit dem GG Genotyp. Auch der 1-Jahres-Verlauf nach Stentimplantation ließ keinerlei Assoziationen erkennen.

Da die Genese der Komplikationen nach Stentimplantation, wie thrombotische Ereignisse oder Restenose, sehr komplex ist und nicht alle beteiligten Faktoren bisher identifiziert sind, kann es sein, dass dieser Polymorphismus in seiner Auswirkung einfach zu gering ist.

Des Weiteren gibt es natürlich noch viele andere genetische Faktoren, deren Einfluss eventuell wesentlich größer ist. Die genetische Variable mit dem bekanntermaßen größten Einfluss auf die verschiedenen vWF Plasmakonzentrationen ist die ABO Blutgruppe (Orstavik et al., 1985). Patienten mit der Blutgruppe O haben durchschnittlich niedrigere vWF Konzentrationen im Plasma als Patienten mit anderen Blutgruppen (Shima et al., 1995).

4.1 Thrombotische Frühkomplikationen

In dieser Studie konnten wir keinen signifikanten Einfluss des vWF –1051G/A Genotyps auf die Inzidenz thrombotischer Frühkomplikationen (subakute Stentthrombose, Myokardinfarkt, Tod, dringliche Revaskularisierung) finden.

Die Rate an Frühkomplikationen bei dem von uns untersuchten Patientenkollektiv war relativ niedrig (das Auftreten eines oder mehrerer Ereignisse lag nur bei 5,2%). Dies könnte ein möglicher Grund für unser negatives Ergebnis bezüglich thrombotischer Frühkomplikationen sein. Dies lässt sich durch den systematischen Einsatz antithrombozytärer Medikamente bei unseren Patienten erklären. Durch eine kombinierte antithrombozytäre Therapie (Aspirin und Tiklopidin oder Clopidogrel ggf. ergänzt durch einen GP IIb/IIIa-Antagonisten wie Reopro), welche die Thrombozytenfunktion stark unterdrückt (Gawaz et al., 1998), kann das Auftreten von frühen thrombotischen Ereignissen erheblich gesenkt werden, wie in zahlreichen Studien bewiesen wurde (Schömig et al., 1996; Lefkovitis & Topol, 1997; The EPISTENT Investigators, 1998). Es könnte sein, dass die konsequente antithrombozytäre Therapie und die dementsprechend niedrige Rate an thrombotischen Frühkomplikationen den möglicherweise nicht so stark ausgeprägten Einfluss des –1051G/A Genotyps nicht erkennen lässt.

In verschiedenen Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung einer okkludierenden Koronarthrombose von der Funktion des vWF abhängt (Brinkhous et al., 1991). Außerdem gibt es Studien die zeigen konnten, dass erhöhte Konzentrationen des vWF im Plasma mit kardiovaskulären Erkrankungen, wie der ischämischen Herzerkrankung, assoziiert sind. In einer Studie von Hamsten et al 1986 wurden 116 männliche und 32 weibliche Patienten, die einen Herzinfarkt überlebt hatten, nach 3-6 Monaten untersucht. Es wurde nur bei den Frauen ein signifikant erhöhter Spiegel des vWF im Plasma festgestellt (Hamsten et al., 1986). Allerdings war der Anteil der untersuchten Frauen sehr gering, was

diese Ergebnisse verfälschen könnte. In der Studie von Blann et al 1992 wurden 41 Patienten nach Myokardinfarkt untersucht. Diese Studie zeigte, dass unabhängig von Risikofaktoren, die ihrerseits den vWF Spiegel im Plasma erhöhen wie Bluthochdruck, Hypercholesterolämie und Rauchen, die vWF Plasmakonzentration bei den Überlebenden eines Myokardinfarktes erhöht war. Leider konnten diese Studien jedoch nicht zeigen, ob die erhöhte Plasmakonzentration zu dem primären Myokardinfarkt beitrug oder nur eine Folge des Infarktgeschehens war. Andere Studien haben aber gezeigt, dass prinzipiell erhöhte vWF Spiegel im Plasma mit kardiovaskulären Ereignissen assoziiert sind. In der Studie von Jansson et al 1991 wurden 123 Patienten untersucht, die einen Herzinfarkt überlebt hatten. Der Zeitraum der Observation lag bei knapp unter 5 Jahren. Es konnte gezeigt werden, dass hohe Konzentrationen des vWF im Plasma im Zusammenhang mit einer erhöhten Rate von Reinfarkt und Mortalität stehen (Jansson et al., 1991). Eine 10-Jahres Studie, die an Überlebenden eines Herzinfarktes durchgeführt wurde, bestätigte dieses Ergebnis. Auch hier zeigte sich, dass kardiovaskuläre Mortalität mit erhöhten vWF Spiegeln assoziiert ist (Jansson et al., 1998). Und da der -1051 vWF GG Genotyp laut der Studie von Keightley et al 1999 mit erhöhten Konzentrationen des vWF einhergeht, schien es uns möglich, dass G Allel Trägerschaft mit Thrombozytenaktivierung und Thromboseneigung assoziiert ist (Keightley et al., 1999). Somit könnte der vWF -1052G/A Polymorphismus die Entwicklung thrombotischer Komplikationen nach koronarer Stentimplantation beeinflussen. Diese Hypothese haben wir aber mit der vorliegenden Arbeit widerlegt.

4.2 Restenose

Als Risikofaktoren, die zur Ausbildung einer Restenose nach koronarer Stentimplantation führen, konnten neben klinischen und prozeduralen Prädiktoren (u.a. die Implantation mehrerer Stents, die Länge des behandelten Gefäßabschnitts und Diabetes mellitus) auch genetische Faktoren beschrieben werden (Kastrati et al., 1997; Kastrati et al., 1999; Kastrati et al., 2000).

Die Neointimabildung beginnt immer mit einer Thrombusbildung an der verletzten Gefäßwand. Diese führt zur Ausschüttung mehrerer Mitogene, wie den platelet-derived growth factor (PDGF), und zur Fibrinbildung und löst so die Migration der glatten Gefäßmuskelzellen aus.

In einer Studie von Kageyama et al 2000 wurde die Auswirkung des AJvW-2, einem Antikörper gegen vWF, welcher die Bindung von vWF an den GPIIb/IIIa-Rezeptor der Plättchen verhindert, an 36 Meerschweinchen untersucht. 13 Meerschweinchen bildeten die Kontrollgruppe. Direkt nach der Verletzung der Karotis mittels Ballondilatation wurde 13 Tieren 0,6ml/kg AJvW-2 und 10 Tieren 1,8ml/kg AJvW-2 einmalig injiziert. Die Kontrollgruppe bekam Saline injiziert. Die Studie zeigte, dass AJvW-2 signifikant die Ablagerung der adhäsiven Proteine Fibrinogen und vWF am verletzten Endothel reduziert und die Bildung eines organisierten Thrombus verhindert, was wiederum einen Einfluss auf die Bildung von Neointima hat (Kageyama et al., 2000). Studien von Nichols et al 1990 mit Schweinen und 1993 mit Hunden zeigten, dass bei Tieren mit vWF Erkrankung, bei denen die vWF Konzentration im Plasma stark reduziert war, die Bildung eines okkludierenden Thrombus nach Endothelverletzung mittels Ballonkatheter verhindert wurde (Nichols et al., 1990; Nichols et al 1993). Dieser ist wiederum aber nötig für die Bildung einer Neointima und somit einer Restenose.

Der postulierte Einfluss des –1051G/A vWF Polymorphismus auf die vWF-Plasmakonzentration konnte vermuten lassen, dass der Polymorphismus das Risiko einer Restenose modifiziert. Trotz dieser Überlegungen konnte in dieser Arbeit keine signifikante Assoziation zwischen dem –1051G/A Polymorphismus und dem primären Endpunkt der Restenose gefunden werden.

Ein Grund hierfür könnte sein, dass die vorliegenden Daten, die enge Zusammenhänge zwischen dem Vorhandensein eines funktionstüchtigen vWF und der Entstehung einer Neointima nach Stentimplantation nahe legen, ausschließlich aus Tiermodellen stammen und somit nicht direkt auf den Menschen übertragbar sind. Eine neuere Studie mit Pavianen kommt sogar auf ein ganz anderes Ergebnis. Es konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der initialen Plättchenadhäsion nach Stentimplantation durch Hemmung des vWF keinerlei Auswirkung auf die Entstehung einer Neointima hat (de Meyer et al., 2007).

Ein weiterer Grund könnte eventuell darin liegen, dass unser Ergebnis durch die konsequente antithrombozytäre Therapie beeinflusst ist, welche die Thrombusformation schon erheblich einschränkt und den an sich schon geringen Einfluss des –1051G/A vWF Polymorphismus nicht erkennen lässt.

Des Weiteren konnte noch keine Studie einen direkten Einfluss des vWF auf die Proliferationsrate von SMC's nachweisen, welche als zelluläres Substrat für die Restenosierung gelten (Grewe et al., 1997; Farb et al., 1997).

4.3 Spätkomplikationen

Unter Spätkomplikationen verstehen wir in unserer Studie zum Einen thrombotische Ereignisse, wie Myokardinfarkt und Tod und zum Anderen Restenosen, die zu einer Revaskularisierung der Zielgefäße führten. Der Zeitraum der Kontrolle war ein Jahr nach Stentimplantation.

Thrombotische Ereignisse treten meist während der ersten Tage nach Stentimplantation auf. Das Risiko dafür bleibt jedoch während der ersten 30 Tage deutlich erhöht (Schühlen et al., 1998). Doch auch nach dem Absetzen der Thienopyridintherapie (Tiklopidin- bzw. Clopidogrel) kann es im Bereich des mit dem Stent behandelten Gefäßabschnittes zu thrombotischen Vorgängen kommen. Es besteht natürlich die Möglichkeit, dass diese Ereignisse auch auf thrombotische Vorgänge in anderen Koronararterien und außerhalb der behandelten Läsion beruhen. Die Revaskularisation der Zielgefäße stellt ein Maß für die Restenose dar.

Unsere Studie konnte auch hier keinen Einfluss des -1051G/A Polymorphismus auf das Auftreten von Spätkomplikationen innerhalb eines Jahres nach Stentimplantation feststellen.

4.4 Weitere Befunde zur Bedeutung des –1051 G/A vWF Polymorphismus

Die zwei kanadischen Studien zeigten, dass der –1051vWF G Haplotyp, wie auch die benachbarten -1793G, -1234C und -1185A mit erhöhten Konzentrationen von vWF im Plasma assoziiert sind (Keightley et al., 1999; Harvey et al., 2000). In diesen Studien wurde nur DNA von Spendern mit der Blutgruppe 0 verwendet. Die Blutgruppe wird auch mit Variationen der vWF-Plasmakonzentration in Verbindung gebracht (Orstavik et al., 1985). In einer Studie von Heywood et al 1997 wurde untersucht ob ein Zusammenhang zwischen einem erhöhten Risiko einer ischämischen Herzerkrankung und dem -1793 bzw. -1051 vWF Polymorphismus besteht. In dieser Studie wurden 295 Patienten mit Verdacht auf ischämische Herzerkrankung und 198 im Alter vergleichbare gesunde Patienten untersucht. Bei dieser Studie, die, wie auch unsere, nicht nach Blutgruppen selektiert war, konnte keine Assoziation zwischen Genotyp und vWF-Plasmakonzentration gefunden werden und auch kein Zusammenhang zwischen Genotyp und Herzinfarkttrisiko.

In der Studie von Di Bitondo et al 2001 wurden die Dimorphismen –1185G/A und –1051 A/G auf einen Zusammenhang mit Myokardinfarkt hin untersucht (Di Bitondo et al., 2001). Es wurden 525 Patienten mit akutem Myokardinfarkt wie auch 451 gesunde Patienten in der Kontrollgruppe untersucht. Auch hier konnte kein Zusammenhang zwischen Genotyp – 1185GG und einem erhöhten Herzinfarkttrisiko festgestellt werden. Auch diese Studie war nicht nach Blutgruppen selektiert.

In einer brasilianischen Studie von Simon et al 2003 wurde versucht, einen Zusammenhang zwischen dem –1185A/G Polymorphismus und koronarer Herzerkrankung herzustellen (Simon et al., 2003). Es konnte weder eine Beziehung zwischen dem Polymorphismus und KHK noch zwischen dem Polymorphismus und erhöhten vWF Plasmakonzentrationen festgestellt werden.

Nun kann es sein, dass auch in unserer Population keine Beziehung zwischen dem Promoter Haplotyp und der vWF Konzentration im Plasma existiert.

Somit könnten weitere Studien über das Risiko von Komplikationen nach Stentimplantation bei -1051G Haplotypen mit der Blutgruppe 0 zu anderen Ergebnissen führen.

Es wäre allerdings möglich, dass auch in unserer Population zwar ein Zusammenhang besteht, dieser allerdings keinen oder nicht genug Einfluss auf die Entwicklung von Komplikationen nach Stentimplantation hat.

Die in unserer Studie untersuchte Patientenpopulation war überwiegend europäischer Herkunft. Die -1051 G Allel Frequenz lag in unserer Studie bei nur 35,4%. Eine Studie von Simon et al 2002 untersuchte den -1185A/G Polymorphismus in zwei verschiedenen brasilianischen ethnischen Gruppen (Simon et al., 2002). Ein Teil der Patientenpopulation war afrobrasilianisch, der andere eurobrasilianisch. Die -1185A Allel Frequenz war mit 62% bei der afrobrasilianischen Population deutlich höher als bei der eurobrasilianischen (41%). Doch obwohl die afrobrasilianische Patientengruppe höhere Plasmakonzentrationen von vWF aufwies, war dieser Unterschied nicht signifikant. Es konnte auch kein Zusammenhang zwischen den -1185A/G Genotypen und den vWF Konzentrationen in Plasma festgestellt werden. Trotzdem zeigte diese Studie die ethnischen Unterschiede in der Verteilung des -1185 A/G Polymorphismus auf. Somit könnte diese Studie in einer anderen ethnischen Population mit höherer -1051 G Allel Frequenz zu einem anderen Ergebnis führen.

4.5 Stellenwert unserer Ergebnisse

Wir konnten in unserer Studie keinerlei Assoziation zwischen dem -1051G/A Polymorphismus der Promoterregion des vWF und einem erhöhten Risiko für thrombotische Ereignisse oder Restenosen nach Stentimplantation feststellen.

Leider beinhaltet diese Arbeit keine eigenen Untersuchungen zu der vWF Konzentration im Plasma. Somit wissen wir nicht, ob überhaupt der -1051 GG Genotyp in unserer Population mit erhöhten Konzentrationen von vWF im Plasma assoziiert war. Auch unterschieden wir nicht nach den unterschiedlichen Blutgruppen. Es ist sehr wahrscheinlich, dass der starke genetische Einfluss der ABO Blutgruppe unser Ergebnis überlagert.

Eine Kontrollangiographie konnte nur bei 84% der Patienten durchgeführt werden. Die Analyse bezüglich der angiographischen Restenose könnte hierdurch verfälscht sein. Allerdings unterschied sich der Anteil von Patienten mit dem GG Genotyp in der Gruppe mit Kontrollangiographie nicht wesentlich von dem Anteil der Patienten mit dem GG Genotyp in der Gruppe ohne Kontrollangiographie. Somit ist ein solcher Fehler eher unwahrscheinlich. Außerdem ist zu beachten, dass die vWF Konzentration auch bei Personen mit anderen konventionellen Risikofaktoren für koronare Herzerkrankungen wie zum Beispiel Diabetes, Bluthochdruck, Hypercholesterinämie und Rauchen erhöht sein kann (Stirling et al., 1984; Aillaud et al., 1986; Gill et al., 1987; Pottinger et al., 1989; Lipp & Blann, 1995). Die Patienten unserer Studie weisen diese Risikofaktoren auf.

Des Weiteren beeinflussen andere Faktoren wie Alter oder Schwangerschaft die vWF Plasmakonzentration (Aillaud et al., 1986; Stirling et al., 1984).

Durch die Einführung der drug eluting stents konnte die Rate der Restenosen drastisch gesenkt werden. Hierbei werden bioaktive Stoffe, wie zum Beispiel Sirolimus, Paclitaxel oder auch Zotarolimus, direkt vom Stent an die Gefäßwand abgegeben. Diese greifen die

proliferativen Prozesse an und somit die zellulären Mechanismen, die zur Ausbildung einer Restenose führen. Durch die lokale Komponente kommt es gleichzeitig zu keiner systemischen Intoxikation. Es wäre sicherlich interessant herauszufinden, ob sich der Einfluss der Konzentration des vWF auf die Entstehung thrombotischer Ereignisse oder die Ausbildung von Stenosen hierdurch verändert hat.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung des vWF -1051G/A Polymorphismus für den klinischen Verlauf nach koronarer Stentimplantation untersucht. Bei der koronaren Herzerkrankung stellt die koronare Stentimplantation das am häufigsten verwendete interventionelle Therapieverfahren dar. Zu den Risiken dieses Verfahrens gehören das Auftreten von thrombotischen Ereignissen im Anschluss an die Intervention und die Ausbildung einer Restenose.

Der vWF nimmt eine zentrale Stellung in der Hämostase ein. Er fördert die Thrombozytenadhäsion wie auch die Thrombozytenaggregation und ist Träger des Gerinnungsfaktors VIII. Hohe vWF Konzentrationen im Plasma könnten mit einer höheren Rate an Komplikationen nach koronarer Stentimplantation korrelieren. Im vWF Gen wurden 4 SNP's identifiziert: -1793G/C, -1234C/T, -1185A/G und -1051G/A, welche sich in 2 Haplotypen aufspalten. Für den -1793G, -1234C, -1185A, -1051G, Haplotyp 1 wurden erhöhte vWF Konzentrationen im Plasma nachgewiesen.

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des -1051G/A Polymorphismus auf den klinischen Verlauf nach koronarer Stentimplantation zu untersuchen. Der vWF -1051G/A Genotyp wurde bei 1850 konsekutiven Patienten mit koronarer Herzerkrankung und koronarer Stentimplantation untersucht. Die Patienten wurden entweder in der 1. Med. Klinik, Klinikum rechts der Isar oder im Deutschen Herzzentrum München behandelt. Die DNA wurde aus Vollblut extrahiert. Die Genotypisierung erfolgte durch PCR und Restriktionsenzymverdau oder mit dem TaqMan-Verfahren. Zur Kontrolle wurde eine zweite Genotypbestimmung bei 20 % der Patienten durchgeführt. Die klinischen Ereignisse (Tod, Myokardinfarkt und

Revaskularisierung des Zielgefäßes) wurden dokumentiert. Bei 84 % der Patienten wurde eine Kontrollangiographie 6 Monate nach Stentimplantation durchgeführt.

Primärer Endpunkt war das Auftreten thrombotischer Ereignisse (Tod, Myokardinfarkt, dringliche Revaskularisierung) innerhalb der ersten 30 Tage nach Intervention. Sekundärer Endpunkt war das Auftreten einer Restenose entweder als angiographische Restenose zum Zeitpunkt der Kontrollangiographie 6 Monate nach der Intervention ($\geq 50\%$ Durchmesserstenose) oder als klinische Restenose (Revaskularisierung des behandelten Gefäßes innerhalb des ersten Jahres nach der Intervention aufgrund erneuter Angina pectoris Symptomatik). Analysiert wurde auch das Risiko für Tod und Myokardinfarkt während des ersten Jahres nach Stentimplantation.

In dieser Studie konnten wir keinerlei Assoziationen zwischen dem -1051 GG Genotyp in dem Promoter des vWF Gens und einem erhöhten Risiko einer thrombotischen Frühkomplikation nach Stentimplantation feststellen. Die Inzidenz thrombotischer Ereignisse zeigte allenfalls sogar einen leichten Trend hin zu mehr Ereignissen bei der Gruppe mit dem Genotyp AA (6,29% vs. 4,5% und 4,3%).

Auch die Restenoserate zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den unterschiedlichen Genotypen. Hier zeigte sich allenfalls ein leichter Trend hin zu einer höheren klinischen (AA 20,38%; AG 19,85%, GG 23,95%) wie auch angiographischen (AA 33,9%, AG 31,3%, GG 35,3%) Restenoserate bei der Gruppe der Patienten mit dem GG Genotyp. Dieser Unterschied war jedoch ohne Signifikanz.

Zusammenfassend ergibt sich aus dieser Studie, dass der -1051 GG Genotyp des vWF Gens kein negativer prognostischer Faktor für den klinischen Verlauf während der ersten 30 Tage und innerhalb eines Jahres nach koronarer Stentimplantation ist.

6. Literaturverzeichnis

1. Aillaud M.F., Pignol F., Alessi M.C., Harle J.R., Escande M., Mongin M., Juhan-Vague I.
Increase in plasma concentration of plasminogen activator inhibitor, fibrinogen, von Willebrand factor, factor VIII :C and in erythrocyte sedimentation rate with age.
Thromb Haemost. 55 (1986) 330-2

2. Blann A.D., Porter M., McCollum C.N.
Von Willebrand factor in plasma: a novel risk for recurrent myocardial infarction and death.
Br Heart J. 68 (1992) 635-6

3. Brinkhous K.M., Reddick R.L., Read M.S., Nichols T.C., Bellinger D.A., Griggs T.R.
Von Willebrand factor and animal models: contribution to gene therapy, thrombotic thrombocytopenic purpura and coronary artery thrombosis.
Mayo Clin Proc. 66 (1991) 733-42

4. de Lange M., Snieder H., Ariens R.A.S., Spector T.D., Grant P.J.
The genetics of haemostasis: a twin study.
Lancet. 357 (2001) 101-5

5. de Meyer S.F., Staelens S., Badenhorst P.N., Pieters H., Lamprecht S., Roodt J., Janssens S., Meiring M., Vanhoorelbeke K., Bruwer A., Brown S., Deckmyn H.
Coronary artery in-stent stenosis persists despite inhibition of the von Willebrand factor-collagen interaction in baboons.
Thromb Haemost. 98 (2007) 1343-9

6. Denis C.V.
Molecular and cellular biology of von Willebrand factor.
Int J Hematol. 75 (2002) 3-8

7. Dent J.A., Gabusera M., Ruggeri Z.M.
Heterogeneity of plasma vWF multimers resulting from proteolysis of the constituent subunit.
J Clin Invest. 88 (1991) 774-82

8. Di Bitondo R., Cameron C.L., Daly M.E., Croft S.A., Steeds R.P., Channer K.S., Samani N.J., Lillicrap D., Winship P.R.
The -1185 A/G and -1051 G/A dimorphisms in the von Willebrand factor gene promoter and risk of myocardial infarction.
Br J Haematol. 115 (2001) 701-6

9. Douglas J.S. Jr.
Pharmacologic approaches to restenosis prevention.
Am J Cardiol. 100 (2007) 10K-6K

10. Eisenberg M.J., Konnyak J.
Review of randomized clinical trials of drug-eluting stents for the prevention of in-stent restenosis.
Am J Cardiol. 98 (2006) 375-82

11. Farb A., Sangiorgi G., Carter A.J., Walley V.M., Edwards W.D., Schwartz R.S., Virmani R.
Pathology of acute and chronic coronary stenting in humans.
Circulation. 99 (1999) 44-52

12. Ferns G.A., Raines E.W., Sprugel K.H., Montani A.S., Reidy M.A., Ross R.
Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF.
Science. 253 (1991) 1129-32

13. Foster P.A., Fulcher C.A., Marti T., Titani K., Zimmermann T.S.
A major factor VIII binding domain resides within the amino-terminal 272 amino acid residues of von Willebrand factor.
J Biol Chem. 262 (1987) 8443-6

14. Furlan M., Robles R., Lammle B.
Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis.
Blood. 87 (1996) 4235-44

15. Fredrickson B.J., Dong J-F., McIntire L.V., Lopez J.A.
Shear-dependent rolling on von Willebrand factor of mammalian cells expressing the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex.
Blood. 92 (1998) 3684-93

16. Fuster V., Gotto A.M., Libby P., Loscalzo J., McGill H.C.
27th Bethesda Conference: matching the intensity of risk factor management with the hazard for coronary disease events. Task Force 1. Pathogenesis of coronary disease: the biologic role of risk factors.
J Am Coll Cardiol. 27 (1996) 964-76

17. Gawaz M.P., Loftus J.C., Bajt M.L., Frojmovic M.M., Plow E.F., Ginsberg M.H.
Ligand bridging mediates integrin alpha IIb beta 3 (platelet GPIIB-IIIa) dependent homotypic and heterotypic cell-cell interactions.
J Clin Invest. 88 (1991) 1128-34

18. Gawaz M., Neumann F.J., Ott I., May A., Rudiger S., Schömig A.
Changes in membrane glycoproteins of circulating platelets after coronary stent implantation.
Heart. 76 (1996) 166-72

19. Gawaz M., Neumann F.J., Ott I., Schiessler A., Schömig A.
Platelet function in acute myocardial infarction treated with direct angioplasty.
Circulation. 93 (1996) 229-37

20. Gawaz M., Ruf A., Neumann F.J., Pogatsa-Murray G., Dickfeld T., Zohlhofer D., Schömig A.
Effect of glycoprotein IIb-IIIa receptor antagonism on platelet membrane glycoproteins after coronary stent placement.
Thromb Haemost. 80 (1998) 994-1001
21. Gill J.C., Endres-Brooks J., Bauer P.J., Marks W.J. Jr., Montgomery R.R.
The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand disease.
Blood. 69 (1987) 1691-5
22. Gonschior P., Gerheuser F., Leh H.A., Welsch U., Hofling B.
Ultrastructural characteristics of cellular reaction to experimental catheter-induced lesion of Arterial blood vessels.
Vasa. 24 (1995) 325-32
23. Grewe P.H., Machraoui A., Deneke T., Barmeyer J., Muller K.M.
Structural analysis of 16 different coronary stent systems.
Z Kardiol. 86 (1997) 990-9
24. Grewe P.H., Deneke T., Machraoui A., Barmeyer J., Muller K.M.
Acute and chronic tissue response to coronary stent implantation: pathologic findings in human specimen.
J Am Coll Cardiol. 35 (2000) 157-63

25. Grewe P.H., Deneke T., Muller K.M.
Stent-induced changes of coronary morphology, pathologic, anatomic and experimental findings after balloon expansion.
Z Kardiol. 90 (2001) 630-6.
26. Gruentzig A.R.
Percutaneous transluminal coronary angioplasty.
Semin Roentgenol. 16 (1981) 152-3
27. Haines A.P., Howarth D., North W.R., Goldenberg E., Stirling Y., Meade T.W., Raftery E.B., Millar Craig M.W.
Haemostatic variables and the outcome of myocardial infarction.
Thromb Haemost. 50 (1983) 800-3
28. Hamsten A., Blomback M., Wiman B., Svensson J., Szamosi A., Defaire U., Mettinger L.
Haemostatic function in myocardial infarction.
Brit Heart J. 55 (1986) 58-66
29. Harvey P.J., Keightley A.M., Lam Y.M., Cameron C., Lillicrap D.
A single nucleotide polymorphism at nucleotide -1793 in the von Willebrand factor (VWF) regulatory region is associated with plasma VWF:Ag levels.
Br J Haematol. 109 (2000) 349-53

30. Herrmann R.A., Rybnikar A., Resch A., Märkl B., Alt E., Schömig A.
Thrombogenicity of stainless steel coronary stents with a completely gold coated surface (abstract).
J Am Coll Cardiol. 31 (1998) 431A
31. Heywood D.M., Ossei-Gerning N., Grant P.J.
Two novel polymorphisms of the von Willebrand factor gene promoter and association with ischaemic heart disease (abstract).
Thromb Haem. 77 (1997) 375
32. Hoffmann R., Mintz G.S., Dussailant G.R., Popma J.J., Pichard A.D., Satler L.F., Kent K.M., Griffin J., Leon M.B.
Patterns and mechanisms of in-stent restenosis. A serial intravascular ultrasound study.
Circulation. 94 (1996) 1247-54
33. Hoyer L.W., Shainoff J.R.
Factor VIII-related protein circulates in normal human plasma as high molecular weight multimers.
Blood. 55 (1980) 1056-9
34. Huizinga E.G., van der Plas R.M., Kroon J., Sixma J.J., Gros P.
Crystal structure of the A3 domain of human von Willebrand factor: implications for collagen binding.
Structure. 5 (1997) 1147-56

35. Jansson J.H., Nilsson T.K., Johnson O.
Von Willebrand factor in plasma: a novel risk factor for recurrent myocardial infarction and death.
Br Heart J. 66 (1991) 351-5

36. Jansson J.H., Nilsson T.K., Johnson O.
Von Willebrand factor, tissue plasminogen activator, and dehydroepiandrosterone sulphate predict cardiovascular death in a 10 year follow up of survivors of acute myocardial infarction.
Heart. 80 (1998) 334-7

37. Jawien A., Bowen-Pope D.F., Lindner V., Schwartz S.M., Clowes A.W.
Platelet-derived growth factor promotes smooth muscle migration and intimal thickening in a rat model of balloon angioplasty.
J Clin Invest. 89 (1992) 1274-81

38. Kageyama S., Yamamoto H., Yoshimoto R.
Anti-human von Willebrand factor monoclonal antibody AjvW-2 prevents thrombus deposition and neointima formation after balloon injury in guinea pigs.
Atheroscler Thromb Vasc Biol. 20 (2000) 2303-8

39. Kastrati A., Koch W., Berger P.B., Mehilli J., Stephenson K., Neumann F.J., von Beckerath N., Böttiger C., Duff G.W., Schömig A.
Protective role against restenosis from an interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in patients treated with coronary stenting.
J Am Coll Cardiol. 36 (2000) 2168-73
40. Kastrati A., Schömig A., Dietz R., Neumann F.J., Richardt G.
Time course of restenosis during the first year after emergency coronary stenting.
Circulation. 87 (1993) 1498-505
41. Kastrati A., Schömig A., Elezi A., Schühlen H., Dirschinger J., Hadamitzky H., Wehinger A., Hausleiter J., Walter H., Neumann F.J.
Predictive factors of restenosis after coronary stent placement.
J Am Coll Cardiol. 30 (1997) 1428-36
42. Kastrati A., Schömig A., Elezi S.
Coronary stent vessel occlusion: Incidence, timing, predictors, management and 1-year clinical outcome (abstract).
J Am Coll Cardiol. (1998)
43. Kastrati A., Schömig A., Seyfarth M., Koch W., Elezi S., Böttiger C., Mehilli J., Schömig K., von Beckerath, N.
P1^A polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risk of restenosis after coronary stent placement.
Circulation. 99 (1999)1005-10

44. Kaufman R.J., Pipe S.W.
Regulation of factor VIII expression and activity by von Willebrand factor.
Thromb Haemost. 82 (1999);82 201-8
45. Keightley A.M., Lam Y.M., Brady J.N., Cameron C.L., Lillicrap D.
Variation at the von Willebrand factor (vWF) gene locus is associated with plasma vWF:Ag levels: identification of three novel single nucleotide polymorphisms in the vWF gene promoter.
Blood. 93 (1999) 4277-83
46. Koedam J.A., Meijers J.C., Sixma J.J., Bouma B.N.
Inactivation of human factor VIII by activated protein C. Cofactor activity of protein S and protective effect of von Willebrand factor.
J Clin Invest. 82 (1988) 1236-43
47. Komatsu R., Ueda M., Naruko T., Kojima A., Becker A.E.
Neointimal tissue response at sites of coronary stenting in humans: macroscopic, histological and immunohistochemical analyses.
Circulation. 98 (1998) 224-33
48. Lefkovits J., Topol E.J.
Pharmacological approaches for the prevention of restenosis after percutaneous coronary intervention.
Prog Cardiovasc Dis. 40 (1997) 141-9

49. Lip G.Y.H., Blann A.D.
Von Willebrand factor and its relevance to cardiovascular disorders.
Br Heart J. 74 (1995) 580-3
50. Livak K.J.
Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay.
Genet Anal. 14 (1999) 143-9
51. MacLeod D.C., Strauss B.H., de Jong M., Escaned J., Umans V.A., van Suylen R.J., Verkerk A., de Feyter P.J., Serruys P.W.
Proliferation and extracellular matrix synthesis of smooth muscle cells cultured from human coronary atherosclerotic and restenotic lesions.
J Am Coll Cardiol. 23 (1994) 59-65
52. Meade T.W., Cooper J.A., Stirling Y., Howarth, D.J., Ruddock V., Miller G.J.
Factor VIII, AB0 blood group and the incidence of ischaemic heart disease.
Br J Haematol. 88 (1994) 601-7
53. Miyata S., Ruggeri Z.M.
Distinct structural attributes regulating von Willebrand factor A1 domain interaction with platelet glycoprotein Iba1 under flow.
J Biol Chem. 274 (1999) 6586-93
54. Moroi M., Jung S.M.
Platelet receptors for collagen.
Thromb Haemost. 78 (1997) 439-44

55. van Mourik J.A., Bouma B.N., LaBruyere W.T., de Graaf S., Mochtar I.A.
Faktor VIII, a series of homologues oligomers and a complex of two proteins.
Thromb. Res. 4 (1974) 155-64
56. Nath F.C., Muller D.W., Ellis S.G., Rosenschein U., Chapekis A., Ouain L.,
Zimmerman C., Topol E.J.
Thrombosis of a flexible coil coronary stent: frequency, predictors and clinical
outcome.
J Am Coll Cardiol. 21 (1993) 622-7
57. Neumann F.J., Hochholzer W., Pogatsa-Murray G., Schömig A., Gawaz M.
Antiplatelet effects of abciximab, trifiban and eptifibatide in patients undergoing
coronary stenting.
J Am Coll Cardiol. 37 (2001) 1323-8
58. Nicolaes K., Dahlback B.
Factor V and thrombotic disease: description of a janus-faced protein.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 22 (2002) 530-8
59. Nichols T.C., Bellinger D.A., Tate D.A., Reddick R.L., Read M.S., Koch G.G.,
Brinkhous K.M., Griggs T.R.
Von Willebrand factor and occlusive arterial thrombosis- a study in normal and von
Willebrand's disease pigs with diet- induced hypercholesterolemia and atherosclerosis.
Atherosclerosis. 10 (1990) 449-61

60. Nichols TC, Bellinger DA, Reddick RL, Smith SV, Koch GG, Davis K, Sigman J, Brinkhous KM, Griggs TR, Read MS.
The roles of von Willebrand factor and factor VIII in arterial thrombosis. Studies in canine von Willebrand disease and haemophilia A.
Blood. 81 (1993) 2644-51
61. Nesheim M., Pittman D D , Giles A.R., Fass D.N., Wang J.H., Slonosky D., Kaufman R.J.
The effect of plasma von Willebrand factor on the binding of human factor VIII to thrombin-activated human platelets.
J Biol Chem. 266 (1991) 17815-20
62. Nurden A.T.
Inherited abnormalities of platelets.
Thromb Haemost. 82 (1999) 468-80
63. Orstavik K., Magnus P., Reisner H., Berg K., Graham J., Nance W.
Factor VIII and factor IX in a twin population. Evidence for a major effect of ABO locus on factor VIII level.
Am J Hum Genet. 37 (1985) 89-101
64. Perret B.A., Furlan M., Beck E.A.
Studies of factor VIII-related protein. II. Estimation of molecular size differences between factor VIII oligomers.
Biochim Biophys Acta. 578 (1979) 164-74

65. Plow E.F., Srouji A.H., Meyer D., Marguerie G., Ginsberg M.H.
Evidence that three adhesive proteins interact with a common recognition site on activated platelets.
J Biol Chem. 259 (1984) 5385-91
66. Pottinger B.E., Read R.C., Paleolog E.M., Higgins P.G., Pearson J.D.
Von Willebrand factor and its acute phase reactant in man.
Thromb Res. 53 (1989) 387-94
67. Recchia D., Abendschein D.R., Saffitz J.E., Wickline S.A.
The biologic behaviour of balloon-hyperinflation-induced arterial lesions in hypercholesterolemic pigs depends on the presence of foam cells.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 15 (1995) 924-9
68. Roller R.E., Schnedl W.J., Korninger C.
Predicting the risk of restenosis after angioplasty in patients with peripheral arterial disease.
Clin Lab. 47 (2001) 555-9
69. Ruggeri Z.M., Dent J.A., Saldivar E.
Contribution of distinct adhesive interactions to platelet aggregation in flowing blood.
Blood. 94 (1999) 172-8
70. Ruggeri Z.M., Zimmerman T.S.
The complex multimeric composition of factor VIII/vWF.
Blood. 57 (1981) 1140-3

71. Rumley A., Lowe G.D.O., Sweetnam P.M., Yarnell J.W.G., Ford R.P.
Factor VIII, von Willebrand factor and the risk of major ischaemic heart disease in the
Caerphilly Heart Study.
Brit J Haematol. 155 (1999) 110-16
72. Sadler J.E.
Biochemistry and genetics of von Willebrand factor.
Annu Rev Biochem. 67 (1998) 395-424
73. Savage B., Almus-Jacobs F., Ruggeri Z.M.
Specific synergy of multiple substrate-receptors interactions in platelet Thrombus
formation under flow.
Cell. 94 (1998) 657-66
74. Savage B., Sixma J.J., Ruggeri Z.M.
Functional self-association of von Willebrand factor during platelet adhesion under
flow.
Proc Natl Acad Sci U S A. 99 (2002) 425-30

75. Schömig A., Kastrati M., Dirschinger J., Mehilli J., Schricke U., Pache J., Martinoff S., Neumann F.J., Schwaiger M.
Coronary stenting plus platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade compared with tissue plasminogen activator in acute myocardial infarction. Stent versus Thrombolysis for Occluded Coronary Arteries in Patients with Acute Myocardial Infarction Study Investigators.
N Engl J Med. 343 (2000) 385-91
76. Schömig A., Kastrati A., Mudra H., Blasini R., Schühlen H., Klaus V., Richardt G., Neumann F.J.
Four-year experience with Palmatz-Schatz stenting in coronary angioplasty complicated by dissection with threatened or present vessel closure.
Circulation. 90 (1994) 2716-24
77. Schömig A., Neumann F.J., Kastrati A., Schühlen H., Balsini R., Hadamitzky M., Walter H., Zitzmann-Roth E., Richardt G., Alt E., Schmitt C., Ulm K.
A randomized comparison of antiplatelet and anticoagulant therapy after the placement of coronary artery stents.
N Engl J Med. 334 (1996) 1084-9
78. Schömig A., Kastrati A., Elezi S., Schühlen H., Dirschinger J., Dannegger J., Dannegger F., Wilhelm M., Ulm K.
Bimodal distribution of angiographic measures of restenosis six months after coronary stent placement.
Circulation. 96 (1997) 3880-7

79. Schühlen H., Kastrati A., Dirschinger J., Hausleitner J., Elezi S., Wehinger A., Pache J., Hadamitzky M., Schömig A.
Intracoronary stenting and risk for major adverse cardiac events during the first month.
Circulation. 98 (1998) 104-11
80. Shima M., Fujimura Y., Nishiyama T., Tsujiuchi T., Narita N., Matsui T., Titani K.,
Katayama M., Yamamoto F., Yoshioka A.
ABO blood group genotype and plasma von Willebrand factor in normal individuals.
Vox Sanguinis. 68 (1995) 236-40
81. Siedlecki C.A., Lestini B.J., Kottke-Marchant K., Epell S.J., Wilson D.L., Marchant
R.E.
Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand
factor.
Blood. 88 (1996) 2939-50
82. Siffert W., Roskopf D., Siffert G., Busch S., Moritz A., Erbel R., Sharma A.M., Ritz
E., Wichmann H.E., Jakobs K.H., Horsthemke B.
Association of a human G-protein $\beta 3$ subunit variant with hypertension.
Nat Genet. 18 (1998) 45-8
83. Simon D., Paludo C.A., Ghisleni G.C., Manfroi W.C., Roisenberg I.
Association studies between $-1185^{\circ}/G$ von Willebrand factor gene polymorphism and
coronary artery disease.
Braz J Med Biol Res. 36 (2003) 709-14

84. Sporn L.A., Marder V.J., Wagner D.D.
Inducible secretion of large, biologically potent vWF multimers.
Cell. 46 (1986) 185-90
85. Stirling Y., Woolf L., North W.R.S., Seghatchian M.J., Meade T.W.
Hemostasis in normal pregnancy.
Thromb Haemost. 52 (1984) 176-82
86. Tesouro M., Thompson W.C., Rogliani P., Qi L., Chaudhary P.P., Moss J.
Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298.
Proc Natl Acad Sci U S A. 97 (2000) 2832-5
87. The EPISTENT Investigators.
Randomized placebo-controlled and balloon-angioplasty-controlled trial to assess safety of coronary stenting with use of platelet glycoprotein-IIb/IIIa blockade.
Lancet. 325 (1998) 87-92
88. Thompson S.G., Kienast J., Pyke S.D., Haverkate E., van de Loo J.C.
Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris.
for the European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group
N Engl J Med. 332 (1995) 635-41

89. Titani K., Kumar S., Takio K., Ericsson L.H., Wade R.D., Ashida K., Walsh K.A., Chopek M.W., Sadler J.E., Fujikawa K.
Amino acid sequenz of human von Willebrand factor.
Biochemistry. 25 (1986) 3171-84
90. Tsai H.M.
Physiologic cleavage of vWF by a plasma protease is dependent on its confirmation and requires calcium ion.
Blood. 87 (1996) 4235-44
91. van Beusekom H.M., Whelan D.M., Hofma S.H., Krabbendam S.C., van Hinsbergh V.W., Verdouw P.D., van der Giessen W.J.
Longterm endothelial dysfunction is more pronounced after stenting than after balloon angioplasty in porcine coronary arteries.
J Am Coll Cardiol. 32 (1998) 1109-17
92. van't Hooft F.M., von Bahr S.J., Silveira A., Iliadou A., Eriksson P., Hamsten A.
Two common, functional polymorphisms in the promoter region of the beta-fibrinogen gene contribute to regulation of plasma fibrinogen concentration.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 19 (1999) 3063-70
93. Violaris A.G., Melkert R., Herrman J.R., Serruys P.W.
Role of angiographically identifiable thrombus on long-term luminal renarrowing after coronary angioplasty: a quantitative angiographic analysis.
Circulation. 93 (1996) 889-97

94. Wise R.J., Dorner A.J., Krane M., Pittman D.D., Kaufman R.J.
The role of von Willebrand factor multimerization and propeptide cleavage in the binding and stabilization of factor VIII.
J Biol Chem. 266 (1991) 21948-55
95. Zimmerman T.S., Ratnoff O.D., Powell A.E.
Immunologic differentiation of classic haemophilia (Faktor VIII deficiency) and von Willebrand's disease. With observations on combined deficiencies of antihemophilic factor and proaccelerin (faktor V) and on acquired circulating anticoagulant against an antihemophilic factor.
J Clin Invest. 50 (1971) 244-54.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Nicolas von Beckerath für die Überlassung des Themas, wie auch für anregende Diskussionen und die Durchsicht meiner Arbeit. Herrn Prof. Dr. Adnan Kastrati danke ich für seine tatkräftige Unterstützung und statistische Beratung. Herrn Dr. Werner Koch möchte ich für seine präzise und ausführliche methodische Beratung danken. Alle Mitarbeiter des Labors- Frau Angela Ehrenhaft, Frau Marianne Eichinger und Herr Wolfgang Latz- haben ebenfalls sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Für die geduldige und verständnisvolle Einarbeitung in die Laborarbeit durch Frau Ehrenhaft möchte ich mich besonders bedanken.

Nicht zuletzt gilt mein Dank dem Direktor der Klinik, Herrn Prof. Schömig.

Ebenfalls möchte ich meinen Eltern und meinem Mann danken, die mich immer unterstützt haben.