

Aus der medizinischen Klinik II
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. H. Schunkert

**Bedeutung der Kandidatengene P2RY12 und Cyp3A4 für
die Clopidogrel-Resistenz am phänotypischen Beispiel von
Stentthrombosen**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
-aus der Medizinischen Fakultät-

von
Jan Sebastian Heyckendorf
aus Hamburg

Lübeck 2010

1. Berichtstatterin:	Prof. Dr. rer. nat. Jeanette Erdmann
2. Berichtstatter/Berichtstatterin:	Priv.-Doz. Dr. med. Jan Kramer
Tag der mündlichen Prüfung:	17.8.2011
zum Druck genehmigt. Lübeck, den	17.8.2011

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Thrombozytenaggregation und Stentthrombose	1
1.1.1 Ursachen und Auslöser der Stentthrombose	1
1.2 Clopidogrel	2
1.2.1 Clopidogrel nach PTCA	3
1.2.2 Clopidogrel-Resistenz	4
1.2.3 Erklärungsansätze für die Clopidogrel-Resistenz	5
1.2.3.1 Eingeschränkte Wirkung am Rezeptor (Pharmakodynamik)	5
1.2.3.2 Unzureichende Bioverfügbarkeit von Clopidogrel (Pharmakokinetik) ..	6
1.2.3.3 Weitere mögliche Ursachen der Clopidogrel-Resistenz	6
1.3 Schlüsselproteine für die Wirkung von Clopidogrel	7
1.3.1 P2RY12	7
1.3.2 Cyp3A4	8
1.4 Fragestellung	10
 2. Material und Methoden.....	12
2.1 Geräte	12
2.2 Chemikalien	12
2.3 Verbrauchsmaterialien	13
2.4 Lösungen und Ansätze	13
2.5 Auswertungssoftware	14
2.6 Patienten	14
2.6.1 Phänotypisierung	14
2.6.2 Genotypisierung	14
2.7 Isolierung humaner DNA aus Patientenvollblut	15
2.8 Polymerase-Kettenreaktion	16
2.9 Primer	18
2.10 Gelelektrophorese der PCR-Produkte	20
2.11 Aufreinigung der PCR-Produkte	21
2.12 Fluorometrie	21

2.13 DNA-Sequenzierung	22
2.14 Auswertung der Sequenzen	23
2.15 Datenbanken und Internet-Tools	23
2.15.1 Genomdatenbanken	23
2.15.2 Homologieabgleich mittels BLAT	24
2.15.3 „Splice-Site-Score“-Berechnung	24
2.15.4 Referenzpopulation	25
2.15.5 Kopplungsungleichgewichtsanalysen und Rekombination	26
2.15.6 Prüfung auf Bindungsstellen für micro-RNA	27
3. Ergebnisse	28
3.1 Phänotypisierung und Medikation	28
3.1.1 Phänotypisierung	28
3.1.2 Medikation	29
3.2 Genotypisierung	30
3.2.1 Gelelektrophorese	31
3.2.2 Sequenzierung der P2RY12- und Cyp3A4-Gene	31
3.2.3 Auswertung der identifizierten Genvarianten	34
3.2.3.1 P2RY12	34
3.2.3.1.1 rs1491974	34
3.2.3.1.2 rs3821667	35
3.2.3.1.3 rs6785930	36
3.2.3.1.4 rs680999	37
3.2.3.1.5 LD-Analysen für die identifizierten P2RY12-Varianten	38
3.2.3.2 Cyp3A4	40
3.2.3.2.1 rs4987159	40
3.2.3.2.2 rs2687116	41
3.2.3.2.3 rs4646437	42
3.2.3.2.4 rs2242480	42
3.2.3.2.5 rs28371763	43
3.2.3.2.6 LD-Analysen für die identifizierten Cyp3A4-Varianten	44
3.3 Zusammenfassung der Phänotypisierung und der Genotypisierung	45

4. Diskussion	47
4.1 Phänotypisierung und Medikation	47
4.1.1 Phänotypisierung des Patientenkollektivs	47
4.1.2 Medikamenteninteraktion	49
4.1.3 Compliance der Patienten	49
4.2 Genotypisierung	50
4.2.1 Identifikation von Gen-Varianten in P2RY12	50
4.2.1.1 Varianten in Exon-Bereichen	50
4.2.1.2 Variante im Intron-Bereich	51
4.2.1.3 LD-Analysen	51
4.2.2 Identifikation von Gen-Varianten in Cyp3A4	53
4.2.2.1 Varianten in Exon-Bereichen	53
4.2.2.2 Varianten in Intron-Bereichen	53
4.2.2.3 LD-Analysen	55
4.3 Ausblick	56
5. Zusammenfassung	60
6. Literaturverzeichnis	61
7. Anhang	77
7.1 Tabellenverzeichnis	77
7.2 Abbildungsverzeichnis	78
7.3 Abkürzungsverzeichnis	79
7.4 Erklärung zur Zustimmung der Ethikkommission	83
8. Danksagung	84
9. Lebenslauf	85

1. Einleitung

1.1 Thrombozytenaggregation und Stentthrombose

Das akute Koronarsyndrom (engl.: „acute coronary syndrome“, ACS) hat eine hohe Letalität zur Folge [1]. In der Behandlung des ACS stellt die perkutane transluminale koronare Angioplastie (PTCA) den Goldstandard dar [2]. Durch eine gesteigerte Thrombozytenaktivierung können im Zuge einer PTCA mit Stenting thrombotische Komplikationen auftreten. Die Stentthrombose ist eine gefürchtete thrombotische Komplikation der PTCA, da häufig erneut große Myokardinfarkte, z.T. mit Todesfolge resultieren [3, 4]. Für die Diagnose der Stentthrombose lieferte das „academic research consortium“ (ARC) eine einheitliche Definition [4, 5].

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Ursachen der Stentthrombose. Hierbei wird auf das zur Prophylaxe einer Stentthrombose (s. Kap. 1.1.1) eingesetzte Medikament Clopidogrel (s. Kap. 1.2) bzw. auf dessen teilweise ungenügende Wirkung in der Thrombozytenaggregationshemmung (Clopidogrel-Resistenz, s. Kap. 1.2.2) eingegangen. Das Hauptaugenmerk bei der Ursachenbestimmung der Stentthrombose liegt dabei auf der Ätiologie der Clopidogrel-Resistenz. Hierbei spielen die Kandidatengene P2RY12 (Ziel-Rezeptor) und Cyp3A4 (Metabolisierung) eine wichtige Rolle (s. Kap. 1.3). Eine adäquate Funktion (P2RY12) bzw. Aktivität (Cyp3A4) dieser Proteine ist für die Wirkung des Medikaments unerlässlich und Gen-Varianten, die eine eingeschränkte Funktion der Proteine bedingen, könnten die Clopidogrel-Resistenz erklären. Die beiden o.g. Gene werden in der vorliegenden Arbeit eingehend untersucht.

1.1.1 Ursachen und Auslöser der Stentthrombose

Die Stentthrombose kann verschiedene Auslöser haben. Sie kann mechanischen Ursprungs sein, wie z.B. eine unzureichende Stent-Expansion bzw. ein langstreckiges Stenting sowie eine Gefäßdissektion [3]. Diesen mechanischen Ursachen gemein sind erhöhte Scherkräfte im Blutdurchfluss, die für die Ausbildung einer Stentthrombose verantwortlich sein können [6]. Als Fremdkörper kann der Stent selbst die Gerinnungskaskade aktivieren und eine Stentthrombose auslösen [7]. Neben den mechanischen Ursachen spielen bei der Ausbildung einer Stentthrombose

auch patientenspezifische Faktoren eine wesentliche Rolle. So konnte in Studien gezeigt werden, dass Patienten mit einem Diabetes mellitus [8], einer niedrigen Ejektionsfraktion [9] oder einem hohen Alter [10] ein höheres Risiko haben, an einer Stentthrombose zu erkranken.

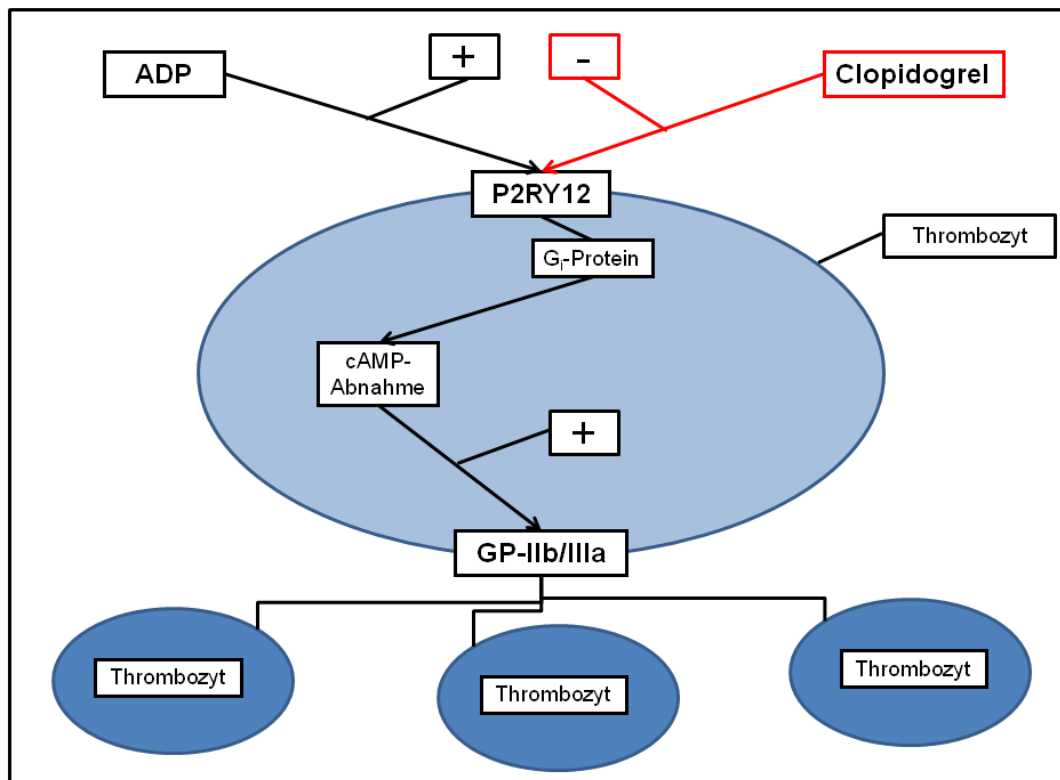
Durch den Einsatz medikamentenbeschichteter Stents (engl.: „drug eluting stent“, DES) konnte die Zahl wiederholter Interventionen im Stentbereich reduziert werden [11]. Im Gegensatz zu „bare metal stents“ (BMS) setzen DES kontinuierlich Paclitaxel (Spindelgift) [12] oder Sirolimus (= Rapamycin, mTOR-Inhibitor) [13] frei und wirken so der Intimaproliferation mit konsekutiver In-Stent-Restenose entgegen [14, 15]. Der niedrigeren In-Stent-Restenose-Rate bei DES steht allerdings eine erhöhte Thrombozytenaktivierung gegenüber, die wiederum durch verschiedene Mechanismen für eine Stentthrombose verantwortlich sein kann [7, 16]. Um Stentthrombosen durch o.g. Ursachen bzw. Auslöser zu vermeiden, wird Clopidogrel sowohl bei BMS als auch bei DES als Thrombozytenaggregationshemmer eingesetzt (s. Kap. 1.2).

1.2 Clopidogrel

Das oral aufgenommene Clopidogrel gehört zur Gruppe der Thienopyridine [17-19]. Die intestinale Resorption des Medikaments erfolgt zu ca. 50% und wird nicht durch die Nahrung beeinflusst [20]. Bei der hepatischen Metabolisierung von Clopidogrel entstehen zwei Hauptmetabolite: die pharmakologisch unwirksame Carboxylsäureform (85%) und das zunächst auch pharmakologisch inaktive 2-Oxo-Clopidogrel [21]. Dieses 2-Oxo-Clopidogrel wird Cytochrom-P450-abhängig (Cyp, s. Kap. 1.3.2) oxidiert und hydrolysiert, sodass mit dem Thiol-Derivat der eigentlich aktive Metabolit entsteht [21]. Aufgrund der großen Instabilität der Thiol-Form lässt sich diese im Blut nicht nachweisen [21]. Ziel der Thiol-Form ist der G_i-gekoppelte P2RY₁₂-Rezeptor auf Thrombozyten, der für die Adenosindiphosphat-(ADP)-induzierte Aktivierung des Glykoprotein-IIb/IIIa-Komplexes (GP-IIb/IIIa) mit Thrombozytenaggregation verantwortlich ist und durch das Wirken von Clopidogrel gehemmt wird (s. Abb. 1 und Kap. 1.3.1) [22]. Die schnelle und irreversible Interaktion zwischen der Thiol-Form und dem P2RY₁₂-Rezeptor wurde von Savi et al. erklärt [23]. Ein „steady-state“ der Thrombozytenaggregationshemmung durch Clopidogrel wird

nach sechs Gaben erreicht [24]. Nach Absetzen des Medikaments hält eine erreichte 50%ige Inhibition der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation noch weitere acht Tage an.

Abb. 1 Vereinfachte Darstellung der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation und Hemmung des P2RY12-Rezeptors durch Clopidogrel nach [25]: ADP aktiviert den G_i-gekoppelten P2RY12-Rezeptor (schwarzer Pfeil). Durch diese Aktivierung sinkt der intrazelluläre cAMP-Spiegel und der GP-IIb/IIIa-Rezeptor wird aktiviert. Der GP-IIb/IIIa-Rezeptor bindet freies Fibrinogen (Striche zwischen den Thrombozyten) und sorgt so für die Quervernetzung mehrerer Thrombozyten in der Thrombozytenaggregation. Clopidogrel inhibiert den P2RY12-Rezeptor (roter Pfeil), sodass die ADP-Induktion der Thrombozyten nicht erfolgen kann und die Plättchenaktivierung ausbleibt.



1.2.1 Clopidogrel nach PTCA

Clopidogrel soll die Aktivierung der Thrombozyten durch Adenosindiphosphat (ADP) (s. Kap. 1.2) vermeiden und so eine PTCA mit Stenting ohne schwerwiegende thrombotische Komplikationen ermöglichen. In großen randomisiert-doppelblinden Studien konnte gezeigt werden, dass eine kombinierte Therapie aus Acetylsalicylsäure (ASS) und Clopidogrel, im Vergleich zur vormaligen Standardtherapie (nur ASS), die bestmögliche Thrombozytenaggregationshemmung darstellt [26-29]. Daten aus der PCI-CURE-Studie (n=2658) und der CREDO-Studie (n=2116) bestätigen, dass durch den Einsatz der dualen Thrombozytenaggregationshemmung eine lang-

fristige Reduktion von kardiovaskulären Ereignissen zu verzeichnen ist [28, 30]. Die PCI-CLARITY-Studie (n=1863) und die ISAR-CHOICE-Studie konnten den Nutzen einer zusätzlichen Clopidogrelgabe vor der PTCA („loading dose“) darlegen [31, 32]. Diese zusätzliche „loading-dose“ wird zwar seitdem empfohlen, jedoch besteht noch kein Konsens über die Dosis (300 mg vs. 600 mg) [1]. In einer aktuellen prospektiv-randomisierten Studie konnte bei erhöhten prä-PTCA-Thrombozytenaktivitäten durch höhere „loading-dose“-Gaben eine Reduktion der Stentthrombose-Rate erreicht werden [33].

Trotz der positiven Datenlage für den Nutzen von Clopidogrel (zusätzlich zu ASS), kann das Medikament thrombotische Komplikationen wie eine Stentthrombose nicht in jedem Fall verhindern. Epidemiologische Zahlen veranschaulichen die Fatalität der Stentthrombose und die Relevanz einer funktionierenden Thrombozytenaggregationshemmung durch Clopidogrel zur Stentthromboseprophylaxe. Eine gepoolte Studie (n=6186) konnte an BMS-versorgten Patienten und nachfolgender dualer Therapie die Frage nach der Häufigkeit der Stentthrombose beantworten [3]. So wurden 45 (0,7%) angiografisch validierte BMS-Stentthrombosen identifiziert. Eine repräsentative Studie konnte bei 6816 DES-Patienten nach vier Jahren eine kumulative Inzidenz für die Stentthrombose von 1,2% feststellen [34]. Die Triton-TIMI-38-Studie zeigte, dass BMS- und DES-Stentthrombosen bei 89% der Patienten zum Myokardinfarkt oder zum Tod führen [4].

1.2.2 Clopidogrel-Resistenz

In der vorliegenden Arbeit wird der Terminus Clopidogrel-Resistenz für ein ungenügendes Ansprechen von Clopidogrel bei der Hemmung der Thrombozytenaggregation verwendet. Daten über die Variabilität in der Wirkung von Clopidogrel wurden erstmalig von Jaremo et al. publiziert [35]. In der kleinen Studie (n=18) konnte eine Heterogenität in der Thrombozytenaktivierbarkeit einzelner Patienten unter Clopidogrel aufgezeigt werden. Die klinische Relevanz dieser Beobachtungen war zum damaligen Zeitpunkt noch nicht vollends geklärt, jedoch wurde ein höheres Risiko für thrombotische Ereignisse bei Clopidogrel-resistenten Patienten diskutiert. Die Beobachtung der Clopidogrel-Resistenz wurde mehrfach als Hauptursache für thrombotische Ereignisse wie die Stentthrombose ausgemacht [6, 36-41]. Insbeson-

dere die ungenügende Clopidogrelwirkung am P2RY12 wurde für die Ausbildung der Stentthrombose als ursächlich bezeichnet [40]. Eine aktuelle Arbeit konnte durch eine ex-vivo P2RY12-Aktivitätsmessung bei DES-Patienten, die unter Clopidogrel-Einnahme gesichert eine Stentthrombose erlitten hatten, eine Clopidogrel-Resistenz bei 40% der Kollektivpatienten nachweisen [42]. Bonello et al. konnten in einem PTCA-Kollektiv eine selbst durch maximale „loading doses“ (bis 2400 mg Clopidogrel) nicht beeinflussbare Clopidogrel-Resistenz von 8% zeigen [33]. Eine Meta-Analyse präsentierte Zahlen aus 25 Studien mit insgesamt 3688 PTCA-Patienten, die eine Prävalenz von 20% für eine Clopidogrel-Resistenz zeigten [43]. Obwohl die Werte für die Prävalenz der Clopidogrel-Resistenz durch unterschiedliche Messtechniken und Definitionen einer hohen Streuung (8%, 20%, 40%) unterliegen, dokumentieren die Zahlen die Bedeutung für die interventionelle Kardiologie bei der Nachsorge der PTCA mit Stenting und rechtfertigen weitere Untersuchungen zur Clopidogrel-Resistenz.

1.2.3 Erklärungsansätze für die Clopidogrel-Resistenz

In der Vergangenheit wurden diverse Faktoren, die für eine Clopidogrel-Resistenz verantwortlich sein können, diskutiert [44]. Die Wirkung eines Pharmakons kann durch pharmakokinetische oder pharmakodynamische Mechanismen beeinflusst werden [45]. Die Pharmakokinetik beschreibt die Einflüsse des Körpers auf das Medikament. Hierbei sind Vorgänge wie die Resorption, Metabolisierung und Elimination gemeint. Bei der Erklärung der Clopidogrel-Resistenz ist insbesondere die Metabolisierung von Interesse (s. Kap. 1.2.3.2). Bei der Pharmakodynamik handelt es sich um Einflüsse des Medikaments auf den Organismus. Hier führen insbesondere Mechanismen auf Rezeptorebene zur Clopidogrel-Resistenz (s. Kap. 1.2.3.1). Ferner können äußere Umstände für eine Clopidogrel-Resistenz verantwortlich sein (s. Kap. 1.2.3.3).

1.2.3.1 Eingeschränkte Wirkung am Rezeptor (Pharmakodynamik)

Die aktive Thiol-Form des Clopidogrels wirkt schnell und irreversibel am P2RY12-Rezeptor auf Thrombozyten und bedingt so die erwünschte Aggregationshemmung

[22]. Durch eine eingeschränkte Interaktion zwischen dem Rezeptor und der Droge, die durch eine genetische Variante des P2RY12-Rezeptors bedingt sein könnte, ließe sich die Clopidogrel-Resistenz erklären (s. Kap. 1.3.1).

1.2.3.2 Unzureichende Bioverfügbarkeit von Clopidogrel (Pharmakokinetik)

Die Bioverfügbarkeit beschreibt den in die systemische Zirkulation gelangenden Anteil einer oral aufgenommenen Droge [45]. Bei einer zu geringen Bioverfügbarkeit gelangt zu wenig des verabreichten Medikaments in die Zirkulation. Dies ist im Fall von Clopidogrel auf eine unzureichende Aktivierung des Medikaments zurückzuführen. Clopidogrel muss als „Prodrug“ hepatisch in die aktive Form überführt werden (s. Kap. 1.2). Diese Aktivierung verläuft Cytochrom-P450-(Cyp)-abhängig und wird zum größten Teil durch das Cyp3A4-Isoenzym bewerkstelligt (s. Kap. 1.3.2) [46-49]. Auch andere Cyp-Isoenzyme sind an der Aktivierung des Medikaments beteiligt und wurden als relevant für eine Clopidogrel-Resistenz diskutiert [50-54]. Verschiedene Umstände können dazu führen, dass dieser enzymatische Vorgang unzureichend abläuft. Hierzu zählen die Medikamenten-Interaktionen am Cytochrom-P450-System. Insbesondere die gleichzeitige Einnahme von Statinen bzw. Protonenpumpeninhibitoren in Kombination mit Clopidogrel wurde als mögliche Quelle einer Interaktion und Erklärung einer Clopidogrel-Resistenz diskutiert [47, 48, 55, 56]. Ein weiterer möglicher Mechanismus beruht auf dem Einfluss einer genetischen Variante des Cyp3A4-Enzyms, die zu einer eingeschränkten Aktivierung des Medikaments führen und so die Clopidogrel-Resistenz erklären könnte (s. Kap. 1.3.2).

1.2.3.3 Weitere mögliche Ursachen der Clopidogrel-Resistenz

Äußere Umstände wurden ebenfalls als Ursache der Clopidogrel-Resistenz erörtert [57]. Dabei ist eine mögliche Unterdosierung der Medikation ebenso zu nennen wie auch eine fehlende Compliance bzw. ein zu frühes Absetzen der Medikation. Hinzu kommen patientenspezifische Faktoren, die eine generell erhöhte Thrombozytenaktivierung bedingen. Dies sind z.B. ein erhöhter BMI [58] und ein Diabetes mellitus [59, 60].

1.3 Schlüsselproteine für die Wirkung von Clopidogrel

Die Wirkung von Clopidogrel ist von einer adäquaten Interaktion am P2RY12-Rezeptor und einer Aktivierung durch Cyp3A4 stark abhängig. Varianten in den Genen beider Proteine, die zu einem veränderten Genprodukt führen, könnten die Clopidogrel-Resistenz erklären.

1.3.1 P2RY12

ADP dockt am G_i-Protein-gekoppelten P2RY12-Rezeptor an und sorgt durch eine Inhibition der Adenylatcyclase für einen intrazellulär niedrigeren cAMP-Spiegel, der eine Thrombozytenaktivierung nach sich zieht [22]. Das P2RY12-Gen befindet sich auf Chromosom 3q24-25 und besteht aus drei Exons [61]. Der P2RY12-Rezeptor ist das Ziel von aktiviertem Thiol-Clopidogrel. Durch die irreversible Blockade des Rezeptors wird eine Thrombozytenaggregationshemmung bewirkt [22, 23].

Das Gen des P2RY12-Rezeptors wurde auf mögliche Varianten, die eine Variabilität der Thrombozytenaggregation erklären könnten, untersucht. Fontana et al. analysierten die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation bei 98 gesunden Probanden und stellten fest, dass es Differenzen in der Aggregation der Plättchen gab [62]. Bei der anschließenden Sequenzierung des P2RY12-Gens wurden zwei Haplotypen (H1 und H2) identifiziert. H2 konnte eine erhöhte maximale Thrombozytenaktivierung durch ADP nachgewiesen werden. Eine Fall-Kontroll-Studie der gleichen Arbeitsgruppe präsentierte eine Assoziation von H2 (rs10935838, rs2046934, rs5853517 und rs6809699) mit der Arteriosklerose [63], die in thrombotische Ereignisse wie Myokardinfarkte münden kann. Die Hypothese für die Erklärung der Clopidogrel-Resistenz durch H2 wurde von anderen Studien mit einem Fokus auf den Haplotypen und einer Assoziation mit einer erhöhten Rate von thrombotischen Ereignissen angezweifelt [64-66]. Eine weitere Untersuchung zeigte eine eingeschränkte Thrombozytenaggregationshemmung unter Clopidogrel, wenn die 52G>T-Variante (rs6809699) und ein Polymorphismus im Cyp2C19-Gen vorhanden waren [53]. Darüber hinaus konnte eine weitere Studie eine Assoziation der 34C>T-Variante in Exon 3 (rs6785930) mit Schlaganfällen zeigen [67]. Patienten mit der Variante hatten trotz Clopidogreleinnahme ein 4,02-fach erhöhtes Risiko für neurologische Ereignisse als

Nicht-Träger der Variante. Der Einfluss dieser Variante auf die Thrombozytenaggregation wurde dagegen in anderen Studien untersucht und widerlegt [62, 65, 68]. Dass Polymorphismen im P2RY12-Rezeptor-Gen einen Einfluss auf die Thrombozytenaggregation haben können, haben Studien vorgeführt, in denen Varianten des Gens mit Blutungsstörungen verbunden sind [69-71]. Die Suche nach neuen Varianten im P2RY12-Rezeptor-Gen, die eine erhöhte Thrombozytenaggregation bzw. eine Clopidogrel-Resistenz verursachen könnten, ist den vorgestellten Informationen zu Folge ein logischer Ansatzpunkt.

1.3.2 Cyp3A4

Das Gen für das Cytochrom P450 der Subfamilie 3A, Polypeptid 4 (Cyp3A4) befindet sich auf Chromosom 7q22.1 und besteht aus 13 Exons [72]. Im Jahr 1985 identifizierten Watkins et al. Cyp3A4 in der menschlichen Leber [73]. Das Protein ist das am häufigsten exprimierte Cyp-Enzym in der Leber [74] und unterliegt einer transkriptionellen Regulation durch den „pregnane-X-receptor“ (PXR), der im Promotorbereich von Cyp3A4 bindet und die Expression des Proteins induziert [75]. Cyp3A4 ist an der oxidativen Metabolisierung von ca. 60% aller verabreichten Medikamente beteiligt [75]. Lange Zeit war unklar, welches Cyp-Isoenzym hauptsächlich die Aktivierung von Clopidogrel katalysiert. Lau et al. konnten 2003 in einer Studie zeigen, dass Clopidogrel durch das Cyp3A4-Isoenzym in die aktive Form umgewandelt wird [47]. Zur in-vivo Aktivitätsbestimmung von Cyp3A4 wurde in der Studie ein Erythromycin-Atemtest verwendet. Neben Clopidogrel werden auch andere Pharmaka durch Cyp3A4 metabolisiert. Hierbei handelt es sich u.a. um Antihistaminika, Benzodiazepine, Calciumantagonisten, Immunsuppressiva (Ciclosporin, Tacrolimus), Makrolide, Proteaseinhibitoren und Statine (nicht Pravastatin) [76]. Das Enzym kann durch verabreichte Stoffe induziert und inhibiert werden [76]. Zu den Inhibitoren zählen u.a. Proteaseinhibitoren, Makrolide (Erythromycin, Troleandomycin), Amiodaron, Verapamil, Ciprofloxacin und Grapefruitsaft. Zu den Induktoren zählen u.a. Barbiturate, Glukokortikoide, Rifampicin und Johanneskraut. Das Wissen um die Metabolisierung dieser Stoffe ist essentiell für das Verständnis der Medikamenteninteraktion am Cyp3A4.

Das „Human Cytochrome P450 (Cyp) Allele Nomenclature Committee“ klassifiziert im Cyp3A4 derzeit 17 intronische und 22 exonische Gen-Varianten [77]. Darüber hinaus existieren weitere 7 intronische und 5 exonische SNPs, die noch nicht in die Nomenklatur eingefügt wurden. Bei 7 der klassifizierten Gen-Varianten konnte mittels in-vitro Untersuchungen eine Abnahme der Aktivität von Cyp3A4 nachgewiesen werden und bei einer sogar in-vivo. In einer japanischen Studie konnten mehrere LD-Verhältnisse von Cyp3A4-Varianten zu Cyp3A5-SNPs ermittelt werden [78]. Auch Clopidogrel wird u.a. durch Cyp3A5 aktiviert [48]. Insbesondere bei dem Ergebnis der LD-Analyse zu Cyp3A4*1G (IVS10+12G>A; rs2242480) und Cyp3A5*3 (rs776746) handelt es sich um eine bemerkenswerte Beobachtung: Cyp3A5*3 resultiert in einer Spleiß-Variante mit eingeschränkter Metabolisierung von Medikamenten [79] und wird mit einem erhöhten Risiko, trotz Clopidogreleinnahme thrombotische Ereignisse zu erleiden, in Assoziation gebracht [54]. Bei der rs4646437-Variante konnte, neben einer geschlechtsabhängigen Expression und Aktivität von Cyp3A4, ein erhöhter Ciclosporinbedarf bei nierentransplantierten Patienten ausgemacht werden [80, 81]. Bei der Analyse von Loukola et al. über die Assoziation eines Cyp3A4-Haplotyps mit Prostatakrebs wurden Aussagen über mehrere Genvarianten getroffen [82].

Auch für Clopidogrel wurden Untersuchungen in Bezug auf den Einfluss einzelner Gen-Varianten auf die Thrombozytenaggregationshemmung angestellt. Angiolillo et al. analysierten 5 bekannte Varianten bei 45 Patienten unter Clopidogrel [83]. Der IVS10+12G>A-Variante (Cyp3A4*1G, rs2242480) konnte in der Studie eine verminderte GPIIb/IIIa-Expression unter Clopidogrel nachgewiesen werden. Allerdings hatte die Variante keinen Einfluss auf die Thrombozytenaggregation unter Clopidogrel. In einer weiteren Studie mit 1419 KHK-Patienten unter einer dualen Thrombozytenaggregationshemmung wurde der Einfluss der IVS10+12G>A-Variante auf die Thrombozytenaggregation untersucht [51]. Dem SNP konnte kein Einfluss auf die Thrombozytenaggregation nachgewiesen werden. Fontana et al. untersuchten den Einfluss der IVS10+12G>A-Variante bei 94 gesunden Probanden unter Clopidogrel [84]. Den Probanden wurde eine „loading-dose“ von 300 mg mit einer anschließenden Erhaltungsdosis von 75 mg täglich für den Zeitraum von einer Woche verabreicht. Bei Trägern der Variante konnte im Vergleich zu Nicht-Trägern keine Verän-

derung in der Thrombozytenaggregation nachgewiesen werden. Die Untersuchung des Gens auf neue oder bereits bekannte Varianten mit einem Einfluss auf den Metabolismus von Clopidogrel ist eine logische Folgerung aus den vorgestellten Informationen über Mechanismen der Clopidogrel-Resistenz mit Stentthrombose als phänotypisches Korrelat (s. Kap. 1.4).

1.4 Fragestellung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden alle Stentthrombosefälle, die sich im Zeitraum von Januar 2005 bis Dezember 2006 im UK-SH Campus Lübeck ereigneten, identifiziert. Für die identifizierten Patienten wurde zur weiteren Charakterisierung eine Phänotypisierung durchgeführt und ein Profil der übrigen Medikation erstellt. Nach dem weitestgehenden Ausschluss aller anderen für eine Stentthrombose in Frage kommenden Faktoren (s. Kap. 1.1.1), wurde eine Clopidogrel-Resistenz als offensichtlich verantwortlich für die Stentthrombosefälle angesehen. Die genaue Ursache für eine solche Clopidogrel-Resistenz ist noch nicht vollständig geklärt. Aus pathophysiologischen Überlegungen heraus könnten genetische Varianten im P2RY12- respektive im Cyp3A4-Gen für die Clopidogrel-Resistenz verantwortlich sein (Kandidatengenansatz). Um dieser Überlegung nach zu gehen, wurden Exon- und angrenzende Intron-Bereiche der Kandidaten-Gene bei den identifizierten Stentthrombosepatienten genotypisiert. Ziel der Genotypisierung sollte die Identifizierung neuer und bereits bekannter Gen-Varianten sein, die für eine Veränderung im Genprodukt sorgen und die Clopidogrel-Resistenz bzw. die Ätiologie der Stentthrombose unter einer adäquaten Thrombozytenaggregationshemmung erklären könnten. Die Erklärung der Clopidogrel-Resistenz könnte die klinische Versorgung von PTCA-Patienten in der Thrombozytenaggregationshemmung verbessern und so die Vermeidung von Stentthrombosen, beispielsweise durch ein prophylaktisches Screening nach bekannten Clopidogrel-Resistenz-Genen, verbessern. Die Funktion der identifizierten exonischen Varianten wurde auf einen möglicherweise vorhandenen Aminosäureaustausch im Genprodukt untersucht. Durch unterschiedliche Eigenschaften der Seitenketten von Aminosäuren kann ein Aminosäureaustausch zu einer Veränderung der Tertiärstruktur des Proteins führen und so die Funktion des Proteins beeinflussen. Auch die intronischen Polymorphismen wurden auf ihren möglichen Ein-

fluss auf Spleiß-Enzyme, auf Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren und auf Bindungsstellen für micro-RNAs untersucht. Ferner sind Kopplungsungleichgewichtsanalysen der identifizierten SNPs durchgeführt worden. Schließlich wurden die umliegenden Sequenzen der identifizierten Gen-Varianten einer speziesübergreifenden Analyse von evolutionär konservierten Arealen unterzogen.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Geräte sind in der Tabelle 1 genannt.

Tab. 1 Geräte

Gerät	Hersteller
Agarosegelelektrophoresekammer Agagel maxi	Biometra
Drucker P93	Mitsubishi
Erlenmeyerkolben 250 ml und 500 ml	Schott
Fluorometer	Biorad
Gelelektrophoresesystem	Micro-Tec-Brand
Kühlschränke	Siemens, Liebherr Premium
Magnetrührer Big Squid	IKA
Magnetstäbchen	Rotabilo
Messzylinder 250 ml	Roth
Mikrowelle	Siemens
Monitor	Santec
PCR Cooler (96er Platten)	Eppendorf
PCR Lab Cyclor	SensoQuest
Pipetten Research 2,5; 10; 100; 1000 µl	Eppendorf
Rotilabo®-Magnetstäbchen	Roth
Rüttler C-46	Labor Brand
SnapScan Scanner 310	AGFA
Touch down-PCR	Hybaid
Tube-Ständer	Neolab
UV-Lichtkammer mit Fotoapparat	Vilber Loumat
Voltmeter	Micro-Bio-Tec Brand
Vortex L64	Labor Brand
Waage ScalTec SBA 61	ScalTec
Zentrifuge Rotanta 460 R, Biofuge pico	Hettich Zentrifugen, Heraeus instruments

2.2 Chemikalien

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 2 aufgeführt. In Kapitel 2.4 werden die Lösungen und Ansätze, die aus den genannten Chemikalien hergestellt wurden, erörtert.

Tab. 2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
100 bp Größenstandard	Invitrogen
Agarose Pulver QA Agarose™	QBiogene
Aqua ad injectabilia	Delta Select
Borsäure ≥99,5%	Sigma-Aldrich
Eppendorf® MasterMix (2,5x)	Eppendorf
Essigsäure 100%	Merck
Ethanol 10%	T. J. Baker
Loading Dye Solution	MBI Fermentas
SybrGreen	Invitrogen

2.3 Verbrauchsmaterialien

In Tabelle 3 sind alle verwendeten Verbrauchsmaterialien aufgelistet.

Tab. 3 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
96 Multiply® PCR-Platte	Sarstedt AG & Co
Crystal QPCR-Film optical clear	Biolab Products
DNA-Purification-Kit	Puregene
Handschuhe (Latex) Peha Soft, Powderfree	Hartmann
NucleoSpin extract II	Mackery Nagel
Parafilm "M"	American National Can
Pipetten mit Fixvolumina 2, 5, 100, 1000 µl	Eppendorf
Pipettenspitzen	Eppendorf
PP-PCR-Gefäß 0,2 ml	Greiner bio-one
Safe-Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf
Wischtücher	Wypall X60

2.4 Lösungen und Ansätze

Die Lösungen und Ansätze, die in der vorliegenden Arbeit Verwendung fanden, werden mit Mengenangaben nachfolgend beschrieben.

10 x Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer

108 g	Trisbase (890 mmol/l)
55 g	Borsäure (890 mmol/l)
40 ml	EDTA (20 mmol/l)
1000 ml	Aqua dest.

Agarosegel 1%ig konzentriert

1 g	Agarose-Pulver
100 ml	1x TBE-Puffer

Probenansatz für Gelelektrophorese

7,5 µl	PCR-Produkt
1 µl	SybrGreen
1,5 µl	Loading Dye

2.5 Auswertungssoftware

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Auswertungssoftware ist in Tabelle 4 angegeben.

Tab. 4 Verwendete Auswertungssoftware

Software	Hersteller
Chromas (Version 2.13)	Technelysium
Staden Package (Pregap v1.5, Gap v4.10, Spin v1.3)	Sourceforge

2.6 Patienten

2.6.1 Phänotypisierung

Aus ca. 6000 Katheterbefunden (Juni 2005 bis Dezember 2006) wurden 16 Fälle von Stentthrombosen eindeutig identifiziert. Bei einer Stentthrombose handelt es sich um eine komplette oder inkomplette thrombotische Verlegung des Stentlumens im Herzkranzgefäß. Bei einem Patienten kam es gleich zweimal zu einer Stentthrombose, sodass das Kollektiv insgesamt aus 15 Patienten besteht. Unter Einbeziehung der Katheteruntersuchungsfilme wurde die Identifikation der Stentthrombosen durch zwei interventionelle Kardiologen validiert. Im Zuge der Validierung wurden offensichtliche mechanische Ursachen der Stentthrombosen ausgeschlossen. Die 15 Patienten erhielten nach der Stentimplantation Clopidogrel zur Stentthromboseprophylaxe.

2.6.2 Genotypisierung

Seit Juni 2005 wird Patienten an der Medizinischen Klinik II des UK-SH Campus Lübeck im Zuge von Herzkatheteruntersuchungen regelmäßig venöses Blut für Studienzwecke entnommen. Dieses Material wird im Rahmen des Cardiogenics-Projekts für genetische Analysen verwendet. Die DNA wird aus dem Patientenblut extrahiert (s. Kap. 2.7) und eingefroren. Daher stand die archivierte DNA für die vorliegende Arbeit zur Verfügung. Bei den Patienten wurden die P2RY12- und Cyp3A4-Exons inklusive der flankierenden Intron-Bereiche mittels PCR (s. Kap. 2.8) amplifiziert und anschließend sequenziert (s. Kap. 2.13).

Alle Patienten wurden hinsichtlich der Verwendung ihres Blutes für genetische Analysen aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Die Zustimmung der Ethikkommission (UK-SH Campus Lübeck) zu den Untersuchungen der Cardiogenics-Arbeitsgruppe lag zu Studienbeginn vor (s.a. Kap. 7.4).

2.7 Isolierung humaner DNA aus Patientenvollblut

Zur Isolierung der DNA für Versuchszwecke wurde das „DNA-Purification-Kit“ der Firma Puregene® verwendet. Die Reaktion kann im Wesentlichen in vier Schritte gegliedert werden:

a. Lyse der Erythrozyten

Für die DNA-Isolierung werden im ersten Schritt die kernlosen Erythrozyten lysiert und können somit von den kernhaltigen Zellen getrennt werden. Zunächst müssen 3 ml EDTA-Blut mit 7 ml „Red-Blood-Cell-Lysis-Solution“ (EDTA + Ammoniumchlorid + Natriumbicarbonat) vermischt und 10 Minuten zentrifugiert werden. Der hierbei entstehende Überstand wird verworfen. Übrig bleibt ein Pellet aus kernhaltigen Zellen (Leukozytenpellet).

b. Lyse der kernhaltigen Blutzellen

Im zweiten Schritt wird dem Leukozytenpellet 3 ml „Cell-Lysis-Solution“ (SDS, TE-Puffer) hinzugegeben. Über Nacht findet die Lyse aller kernhaltigen Zellen statt.

c. DNA-Isolierung

Um die Proteine auszufällen, wird der Lösung anschließend 1 ml „Protein-Precipitation-Solution“ (Ammoniumacetat) hinzugefügt. Der Ansatz wird anschließend geschüttelt und zentrifugiert. Der dabei entstehende Überstand (ca. 4 ml) wird abpipettiert und das Pellet mit 3 ml Isopropanol 96% vermischt. Die DNA wird nun als weißliche „Flocke“ sichtbar. Nach erneutem Zentrifugieren entsteht ein DNA-Pellet, das mit 1 ml Ethanol 70% vermischt und geschüttelt wird. Anschließend erfolgt das letzte Zentrifugieren, bevor die DNA getrocknet wird.

d. DNA-Hydrierung

Im letzten Schritt werden der DNA 300 µl „DNA-Hydration-Solution“ (TE-Puffer) hinzugefügt. Die DNA ist nun isoliert und von allen anderen Bestandteilen des Blutes getrennt. Sie ist somit für Untersuchungen geeignet und kann eingefroren werden.

2.8 Polymerase-Kettenreaktion

Die 1984 von Kary Mullis [85] entwickelte Polymerase-Kettenreaktion (engl. „polymerase chain reaction“; PCR) ermöglicht die in-vitro Amplifizierung von spezifischen DNA-Doppelstrangsequenzen. Die Reaktion wurde mithilfe des „PCR Lab Cyclers“ durchgeführt. Das Gerät sorgt für die nötigen Temperaturwechsel in der Reaktion. Eine PCR besteht im Wesentlichen aus drei Schritten:

a. Denaturierung

Die humane DNA wird bei einer Temperatur von etwa 94°C hitzedenaturiert und somit in ihre Einzelstränge gespalten.

b. Hybridisierung („Annealing“)

Im Anschluss an die Denaturierung folgt eine Abkühlungsphase. Die „Annealing“-Temperatur ist abhängig von den Schmelztemperaturen der Primer (s. Kap. 2.9) und liegt zwischen 50°C und 70°C. Beim „Annealing“ binden Primer über Wasserstoffbrückenbindungen komplementär an Zielsequenzen der DNA-Einzelstränge.

c. Verlängerung (Extension)

Eine thermostabile Polymerase fügt am freien 3'-Ende der Primer komplementär zur DNA-Matrize freie Desoxyribonukleotide (dNTPs) an. Für den Ablauf der Reaktion sind Magnesiumionen (Mg^{2+}) nötig. Sie sorgen für eine korrekte Ausrichtung der freien dNTPs relativ zur 3'-OH Gruppe der Nukleotidkette und erleichtern die Bindung der dNTPs durch die Herabsetzung der negativen Ladung des α -Phosphats. In der vorliegenden Arbeit wurde der „MasterMix“ der Firma Eppendorf® verwendet, der dNTPs und Mg^{2+} enthält.

Die o.g. Arbeitsschritte der PCR werden mehrfach wiederholt, wodurch theoretisch eine exponentielle Amplifizierung der gewünschten Fragmente gewährleistet ist. Mit nur 20 Reaktionszyklen wäre eine 10^6 -fache Vermehrung der ursprünglichen DNA-Menge möglich. In der Praxis werden aus unterschiedlichen Gründen nur Amplifizierungen um das 10^5 -fache erreicht.

Jeder PCR-Ansatz hatte ein Gesamtvolumen von 20 μ l und setzte sich wie folgt zusammen (s. Tab. 5):

Tab. 5 Probenansatz für ein Gesamtvolumen von 20 μ l je Probe

Reagenz	Menge [μ l]
Eppendorf® MasterMix (2,5x)	8
H ₂ O	6,5
Patienten-DNA (10ng/nl) oder H ₂ O (Negativkontrolle)	3,5
Primer Forward (10 μ M)	1
Primer Reverse (10 μ M)	1

Die Versuchsansätze wurden in PCR-Reaktionsgefäße gegeben und anschließend mithilfe des Vortex-Schüttelgeräts vermischt. Um Verunreinigungen auszuschließen, wurde eine Negativkontrolle mit Wasser anstelle von Patienten-DNA durchgeführt.

Die PCR-Reaktionen wurden mit einem Standardprotokoll (Tab. 6) durchgeführt. Bei dem durchgeführten PCR-Protokoll handelte es sich um eine „Touch-Down-PCR“ [86]. Hierbei unterschieden sich die „Annealing“-Temperaturen der einzelnen Reaktionsschritte insofern, als dass anfänglich mit 61°C eine höhere Hybridisierungstemperatur gewählt wurde als beim letzten Schritt (55°C). Mit 61°C liegt die zu Beginn eingestellte Hybridisierungstemperatur geringfügig unterhalb der Schmelztemperatur der Primer. Bei 61°C sind die Primer (s. Kap. 2.9) hochspezifisch für die zu amplifizierenden DNA-Fragmente. Somit wurde eine anfänglich höhere Spezifität der Primer erzeugt und dabei ein kleineres Produkt der PCR in Kauf genommen. Mit einer im Verlauf sinkenden „Annealing“-Temperatur stieg die PCR-Produktivität, wobei die erniedrigte Spezifität bei schon vorhandenen spezifischen PCR-Produkten tolerabel war. Der finale Extensionsschritt diente der Fehlerbehebung der vorausgegangenen kurzen Extensionsschritte durch die Polymerase.

Die Tabelle 6 fasst das in der vorliegenden Arbeit verwendete PCR-Standardprotokoll zusammen.

Tab. 6 PCR-Standardprotokoll: In der Tabelle werden die Zyklen des verwendeten Standardprotokolls wiedergegeben. Die Zyklen 1 bis 3 („Z1“ bis „Z3“) wurden jeweils 3 Mal, der 4. Zyklus („Z4“) 35 Mal durchlaufen. Nach der Beendigung des Standardprotokolls werden die Versuchsansätze bei 4°C bis zur Entnahme gehalten („H“).

Schritt	Vorgang	Z1 [°C] x3	Z2 [°C] x3	Z3 [°C] x3	Z4 [°C] x35	H [°C]	Dauer [sec]
1	Denaturierung	94-30	94-30	94-30	94-30	-	30
2	Annealing	61-45	59-45	57-45	55-45	-	45
3	Extension	72-47	72-47	72-47	72-47	-	45
4	Halten	-	-	-	-	4	bis Entnahme

2.9 Primer

Primer sind synthetische Oligonukleotide, deren Sequenz komplementär zu den Zielsequenzen an den 5'-Enden der zu amplifizierenden DNA-Region ist. Meist besitzen die Primer eine Länge von 18-25 Nukleotiden. GC-reiche Sequenzen erhöhen durch Ausbildung einer zusätzlichen Wasserstoffbrücke pro G oder C die Stabilität der Primerbindung an die Zielsequenzen. Folglich haben GC-reiche Primer eine höhere Schmelztemperatur als AT-reiche Sequenzen.

Die Sequenzen für die verwendeten Primer wurden mithilfe des Internet-Tools „ExonPrimer“ ermittelt. Das Programm verbindet die Eigenschaften des „Human-BLAT-Search“ [87] mit dem Primerdesignprogramm „Primer3“ [88]: „Human-BLAT-Search“ gleicht die benutzten Sequenzen mit anderen Sequenzen des Genoms ab und sorgt so für eine Spezifität der Primer für die zu amplifizierenden Areale (s.a. Kap. 2.15.2). „Primer3“ entwirft die Primer. Für den Entwurf wurde auf eine geringe Sekundärstrukturbildung und eine geringe 3'-Selbstkomplementarität Wert gelegt. Bei den „forward“- bzw. „reverse“-Primerpaaren wurde auf eine korrespondierende Schmelztemperatur von etwa 60°C geachtet. Des Weiteren wurde eine Primerlänge von 18-25 Nukleotiden sowie ein GC-Gehalt von 40-60% angestrebt. Die Sequenzen des P2RY12- und des Cyp3A4-Gens wurden dem „Ensembl-Genome-Browser“ entnommen. Die Primer für die zu sequenzierenden Exons wurden so gewählt, dass stromauf- und stromabwärts zusätzlich ca. 50-100 Basen intronisches Areal zur Ziel-

sequenz für die Sequenzierung gehörte. Bei größeren Exons (P2RY12 Exon 3, Cyp3A4 Exon 13) wurde mit sich überlappenden Primerpaaren gearbeitet.

Die Produktion der Primer wurde bei der Firma „MWG-Biotech AG“ (Ebersberg) in Auftrag gegeben. Nach Erhalt wurde ein Teil der jeweiligen Primer für die Versuchsansätze der PCR verdünnt. Die optimalen „Annealing“-Temperaturen der durch „Primer3“ entworfenen Primerpaare wurden in Bezug auf ihre Eigenschaften für die PCR ermittelt. So wurden die PCR-Testläufe der Primer mit Standard-DNA im Temperaturgradienten (5 Temperaturen, 59,6 - 66,1°C) durchgeführt. Die experimentell ermittelten „Annealing“-Temperaturen deckten sich mit den durch „Primer3“ angestrebten Temperaturen. Die in der Arbeit verwendeten Primer sind in den Tabellen 7 (P2RY12) und 8 (Cyp3A4) aufgelistet.

Tab. 7 Primer für P2RY12 „forward“ (F) und „reverse“ (R)

Primer	Sequenz	Länge	Fragmentlänge
P2RY12_1F	5'-GCAGTTCCAAATAGAGCAATGAG-3'	23 bp	302 bp
P2RY12_1R	5'-TCATTTGACCGACCACTAACAG-3'	22 bp	
P2RY12_2F	5'-GACAGATAGAAATTCAGTGTCTGC-3'	24 bp	389 bp
P2RY12_2R	5'-CAAATACATGCTTGCATTGATAG-3'	23 bp	
P2RY12_3.1F	5'-CCTCAACTTTTAGAGGAGGCTG-3'	22 bp	618 bp
P2RY12_3.1R	5'-GCTGCCTGTTGGTCAGAATC-3'	20 bp	
P2RY12_3.2F	5'-ATCAGTATTTTCATTCTGGGAC-3'	22 bp	592 bp
P2RY12_3.2R	5'-TTCTGAAGGACTTGCAAAGG-3'	20 bp	
P2RY12_3.3F	5'-TTTGCCCGAATTCCTTACAC-3'	20 bp	657 bp
P2RY12_3.3R	5'-CCAATTGATCGTTCTTCCTTAG-3'	22 bp	

Tab. 8 Primer für Cyp3A4 „forward“ (F) und „reverse“ (R)

Primer	Sequenz	Länge	Fragmentlänge
Cyp3A4 Ex1F	5'-CCTTGGACTCCCCAGTAACA-3'	20 bp	564 bp
Cyp3A4 Ex1R	5'-AGGCAGTCCACTTGCCTTAG-3'	20 bp	
Cyp3A4 Ex2F	5'-TTTTGGTGTCTCATGGTGGA-3'	20 bp	431 bp
Cyp3A4 Ex2R	5'-TGTTCTGGGTGATGCCTACA-3'	20 bp	
Cyp3A4 Ex3F	5'-ACTTTCCTTGGCCTCAGTT-3'	20 bp	600 bp
Cyp3A4 Ex3R	5'-CATTGCAATACTCTACACCCAAA-3'	23 bp	
Cyp3A4 Ex4F	5'-TGGCCCACATTATCCTTCAT-3'	20 bp	573 bp
Cyp3A4 Ex4R	5'-GAGGGCACATAAAGCTGGTG-3'	20 bp	
Cyp3A4 Ex5F	5'-ACACTGGGCATCTGGGATAA-3'	20 bp	480 bp
Cyp3A4 Ex5R	5'-CCCAGCATGGAGCAGTAAGT-3'	20 bp	
Cyp3A4 Ex6F	5'-AATGAATCTGGTGGGGACAG-3'	20 bp	525 bp
Cyp3A4 Ex6R	5'-TGTGCACAGGGGAGAAGAT-3'	19 bp	
Cyp3A4 Ex7F	5'-TCAGTTCAGTGTCTCCATCACA-3'	22 bp	586 bp
Cyp3A4 Ex7R	5'-TTGTGACAGGGGGCTGATAG-3'	20 bp	
Cyp3A4 Ex8F	5'-GGGCATTGAATTTTGTTCCT-3'	20 bp	571 bp
Cyp3A4 Ex8R	5'-CAAACCCCACTTTCTGCATT-3'	20 bp	
Cyp3A4 Ex9F	5'-AAGTCCCTATCAGGCCACCT-3'	20 bp	504 bp
Cyp3A4 Ex9R	5'-GCCTGCATGCCTCTAGAAAG-3'	20 bp	
Cyp3A4 Ex10F	5'-GACCTTGGGGAAAACCTGGAT-3'	20 bp	583 bp
Cyp3A4 Ex10R	5'-CAGAGCCAGCACGTTTTACA-3'	20 bp	
Cyp3A4 Ex11F	5'-GCAATGGGCATGACAGTTATTA-3'	22 bp	600 bp
Cyp3A4 Ex11R	5'-TGTTGGAATTGTGGATGACTG-3'	21 bp	
Cyp3A4 Ex12F	5'-GGACACATCACCACCCTGA-3'	19 bp	598 bp
Cyp3A4 Ex12R	5'-TCACAGATGGGCCTAATTGA-3'	20 bp	
Cyp3A4 Ex13.1F	5'-GTCCCCCAACACTGAAGGA-3'	20 bp	457 bp
Cyp3A4 Ex13.1R	5'-GGTGGAAATAGTCCCGTGAG-3'	20 bp	
Cyp3A4 Ex13.2F	5'-TGTGCCTGAGAACACCAGAG-3'	20 bp	517 bp
Cyp3A4 Ex13.2R	5'-CCACGCCAACAGTGATTACA-3'	20 bp	
Cyp3A4 Ex13.3F	5'-CCCAGTTAGCACCATTAACCTCC-3'	22 bp	718 bp
Cyp3A4 Ex13.3R	5'-TTGTTACAAAATGTACGTGCTTC-3'	23 bp	
Cyp3A4 Ex13.4F	5'-CACTGTGACTTTGCCCATTTG-3'	20 bp	595 bp
Cyp3A4 Ex13.4R	5'-GGAAAAGAAAAGGAATGAGTGC-3'	22 bp	

2.10 Gelelektrophorese der PCR-Produkte

Die Spezifität der PCR-Produkte wurde durch die Agarose-Gelelektrophorese untersucht. Das Verfahren ermöglicht die Auftrennung aller Probenbestandteile nach Ladung und Größe in einem elektrischen Feld.

Zur Herstellung des Gels wurden die Ingredienzien (s. Kap. 2.4) in einem Erlenmeyerkolben vermischt und anschließend in der Mikrowelle zum Sieden gebracht. Daraufhin wurde das noch flüssige Gel unter ständigem Rühren mittels Magnetprüher abgekühlt. Nun wurde das Gel in die dafür vorgesehenen Gel-Formen des Gelelektrophoresesystems gegossen. Anschließend wurden Kämme für die Proben-

taschen eingehängt. Für die weitere Benutzung musste das Gel ca. eine Stunde aushärten. Die Kämme konnten dann vorsichtig entnommen und die so entstandenen Aussparungen für die Probenauftragung verwendet werden.

Auf ein 1%iges Agarosegel wurden pro Kammer 4,0 µl PCR-Produkt, 1,5 µl „loading dye“ und 1,0 µl „SybrGreen®“ gegeben. Bei dem Laufpuffer handelte es sich um 1xTBE-Puffer (s.a. Kap. 2.4). Die Auftrennung fand bei einer Spannung von 112 Volt über ca. 45 Minuten statt. Um die Bandenzuordnung zu ermöglichen, wurden 6 µl eines 100 bp Längenstandards mit den gleichen Reagenzien in eine separate Kammer appliziert. Als Leerwert wurde die PCR-Negativkontrolle mit den oben angegebenen Reagenzien benutzt. Die DNA wurde durch das „SybrGreen®“ in der UV-Lichtkammer sichtbar und konnte mit einem Fotoapparat abgelichtet werden.

2.11 Aufreinigung der PCR-Produkte

Bevor die Sequenzierung der PCR-Produkte in Auftrag gegeben werden konnte (s. Kap. 2.13), musste die Aufreinigung dieser erfolgen. Hierbei wurden die überflüssigen Primer und dNTPs in den Proben entfernt, die bei der Sequenzierung zu Störsignalen führen könnten. Die Aufreinigung der Proben wurde unter Verwendung des „NucleoSpin Extract II“-Kits unter Berücksichtigung der Firmenanweisungen durchgeführt.

2.12 Fluorometrie

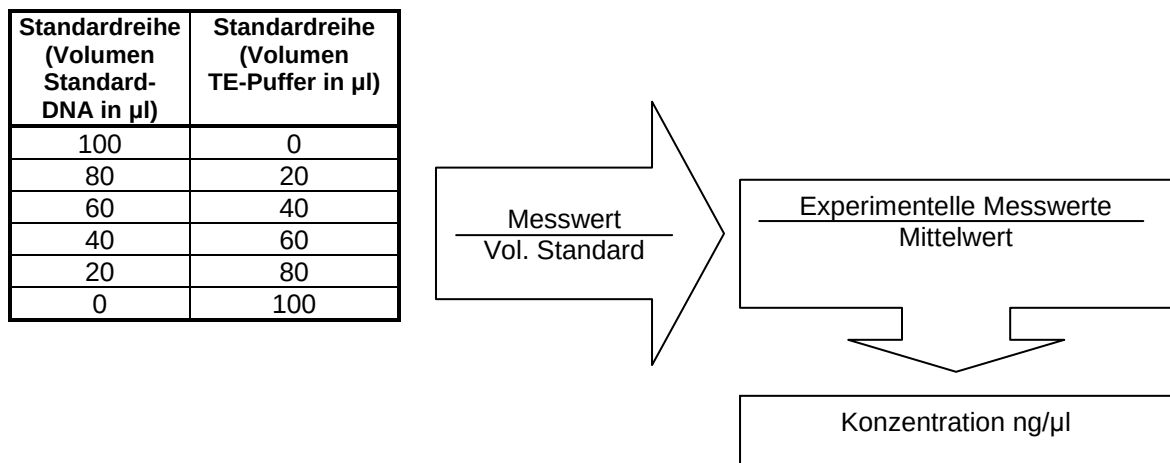
Für die Durchführung der Sequenzierung benötigt die Firma „MWG-Biotech AG“ (Ebersberg) die Angabe der DNA-Konzentration der aufgereinigten PCR-Proben. Hierfür wurde die Fluorometrie mit „PicoGreen®“ durchgeführt. Bei dem Verfahren handelt es sich um eine fotometrische Methode zur DNA-Quantifizierung.

Zur Herstellung einer Standardreihe wurden DNA-Standard (2 ng/µl) und TE-Puffer in wechselnden definierten Anteilen in Probengefäße gegeben. Das Gesamtvolumen sollte jeweils 100 µl betragen. Zunächst wurden 100 µl DNA-Standard ohne TE-

Puffer in ein Probengefäß gefüllt. Anschließend wurden 80 µl mit 20 µl TE-Puffer versetzt, 60 µl DNA-Standard mit 40 µl TE-Puffer usw. In weiteren 20 µl-Schritten wurde diese Prozedur wiederholt, sodass am Ende der Leerwert 100 µl TE-Puffer und keinen DNA-Standard enthielt (s. Tab. 9).

Bei einer Wellenlänge von 260 nm wurde die Absorption der Probe gemessen. Die Messwerte wurden durch die jeweils enthaltenen Standard-DNA-Volumina dividiert, woraufhin aus diesen Werten ein Mittelwert berechnet werden konnte. Dieser Mittelwert diente als Divisor für die experimentelle Messung, d.h. die Messwerte der Proben wurden durch den gebildeten Mittelwert dividiert und so die DNA-Konzentration der Probe errechnet (s. Fließschema zu Tab. 9).

Tab. 9 Standardreihe für die Fluorometrie zur Ermittlung der DNA-Konzentration der PCR-Produkte



Die ermittelten DNA-Konzentrationen lagen bei 30-50 ng/µl.

2.13 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte bei der Firma „Sequence Laboratories (SeqLab) GmbH“ (Göttingen) und bei der Firma „MWG-Biotech AG“ (Ebersberg). Die Elektropherogramme der Sequenzierungen standen nach Fertigstellung auf der Website der jeweiligen Firma zum passwortgeschützten Download bereit [89, 90]. Die Dateien wurden „zip-komprimiert“ übermittelt und konnten in die „ab1“ (SeqLab) bzw. „seq“ (MWG) entpackt werden.

2.14 Auswertung der Sequenzen

Die von den Firmen „SeqLab“ und „MWG“ übermittelten Elektropherogramme konnten zunächst mit der Software „Chromas“ (s. Tab. 4) ausgewertet werden. Um die Sequenzen untereinander und mit den Referenzsequenzen aus dem „Ensembl-Genome-Browser“ [91] vergleichen zu können, wurde mithilfe des „Staden-Package“-Programms eine Datenbank erstellt. Ein Vorteil des „Staden-Package“-Programms liegt in der Möglichkeit des simultanen Vergleichens aller sich überlappenden Sequenzen in der Textform und in der graphischen Darstellung der Elektropherogramme. Hinzu kommt die Möglichkeit, die Information über die Wildtypsequenz aus dem „Ensembl-Genome-Browser“ (s. Kap. 2.15.1) mit der des Kollektivs abzugleichen.

2.15 Datenbanken und Internet-Tools

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Auswertung der gefundenen Varianten Internetdatenbanken und Internet-Tools verwendet. Die in Anspruch genommenen Elemente werden an dieser Stelle kurz charakterisiert.

2.15.1 Genomdatenbanken

Die frei zugänglichen Datenbanken des „Ensembl-Genome-Browsers“ [91] und des „Entrez-SNP“ (NCBI) [92] dienen der Abfrage der Sequenzen des P2RY12- und des Cyp3A4-Wildtyps. Bekannte Varianten sind in der Sequenz angegeben und mit einer sogenannten „rs-Nummer“ ausgestattet. Ein Polymorphismus ist durch seine „rs-Nummer“ eindeutig identifiziert.

Die gefundenen Varianten wurden zunächst über die Genomdatenbanken identifiziert. Als Quelle für weitere Informationen dienen die SNP-Datenbank des NCBI [92] und die SNPseek-Datenbank der Washington School of Medicine in St. Louis [93]. Über die Eingabe der „rs-Nummern“ konnte Auskunft über die Allelfrequenzen einzelner Populationen und die den Polymorphismen zugeschriebenen Funktionen erlangt werden.

Die benachbarten Sequenzen der identifizierten intronischen SNPs wurden auf mögliche Bindungsstellen bekannter Transkriptionsfaktoren untersucht. Diesbezüglich wurde insbesondere nach Sequenzen gesucht, die einer TATA-Box, einer GC-Box oder einer CAAT-Box entsprechen könnten.

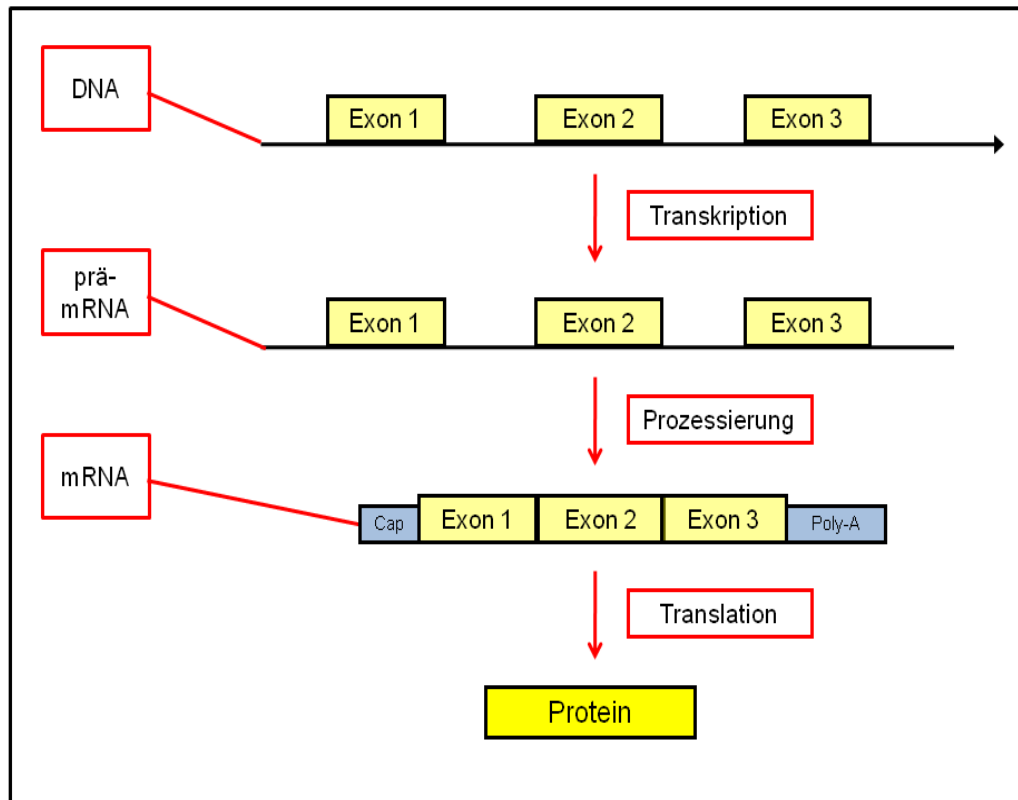
2.15.2 Homologieabgleich mittels BLAT

Einige der gefundenen Varianten befinden sich in intronischen Bereichen der untersuchten Gene. Um Vergleiche mit genomischer DNA anderer Spezies durchzuführen, wurde das „Human BLAT Search“ („BLAST-Like Alignment Tool“) verwendet [87, 94]. Die Applikation ermöglicht durch Eingabe einer Basensequenz den Homologieabgleich mit bis zu 27 Wirbeltierarten. Dadurch können in der Evolution konservierte Areale ausgemacht werden. Diese Gegenüberstellung lässt sich darüber hinaus grafisch als Kurvenverlauf darstellen. Die Höhe der Kurve beschreibt das Maß der Konservierung.

2.15.3 „Splice-Site-Score“-Berechnung

Das Spleißen beschreibt den Vorgang der Umwandlung der prä-mRNA zur fertigen mRNA. Die prä-mRNA besteht neben den eigentlich kodierenden Abschnitten, den Exons, auch aus intronischen Abschnitten. Diese Sequenzen werden beim Spleißen entfernt, wodurch die Exons zur eigentlichen mRNA verbunden werden. Führt ein Polymorphismus zu einer Änderung der Affinität der Spleiß-Enzyme gegenüber der Sequenz, so ist an dieser Position ein Spleißen nicht mehr möglich oder es entsteht ein neuer Angriffspunkt für Spleiß-Enzyme. Diese Mechanismen können zu einem alternativen Spleißen und damit zu einem veränderten Gen-Produkt führen. Für P2RY12 und Cyp3A4 sind jeweils fünf Spleiß-Varianten bekannt [61, 72]. Die Abbildung 2 liefert einen schematischen Überblick über die Genexpression und den Spleißvorgang.

Abb. 2 Genexpression nach [95]: Die Grafik gibt einen schematischen Überblick über die eukaryotische Genexpression. Aus der DNA wird in der Transkription die prä-mRNA synthetisiert. Diese enthält intronische Sequenzen, die beim Spleißen entfernt werden. Introns können Längen zwischen 35 und 10.000 Nukleotide aufweisen. Bei dem Vorgang bleiben die kodierenden Exons des Gens übrig und werden zusammengefügt. Die Polyadenylierung (durch „Poly-A“ markiert) und das „Capping“ (hier mit „Cap“ markiert) finden auch in dieser Phase der mRNA-Prozessierung statt. Aus der mRNA wird in der Translation am Ribosom das Protein synthetisiert.



Bei der „Splice-Site-Score“-Berechnung kann durch Eingabe einer Sequenz in das Programm ein Punktwert bestimmt werden [96]. Dieser Wert beschreibt die Eignung des Genorts als Angriffspunkt für Spleiß-Enzyme. Ein perfekter 5'-Spleißort würde 12,6 (durchschnittlich 8,1) Punkte erlangen, ein perfekter 3'-Spleißort 14,2 Punkte (durchschnittlich 7,9).

2.15.4 Referenzpopulation

Die für die vorliegende Arbeit verwendete Referenzpopulation „HapMap-CEU“ ist Bestandteil der „HapMap“ Phase 3. „HapMap-CEU“ enthält Informationen über insgesamt 1301 Proben aus 11 Populationen [97, 98]. Bei der für diese Arbeit als Referenz herangezogenen Population handelt es sich um Individuen aus Utah (USA) mit nord- und westeuropäischen Vorfahren. Ausschlaggebend für die Wahl dieser Referenz-

renzpopulation war die übereinstimmende Herkunft der Individuen mit jener der Individuen des vorliegenden Kollektivs. Die Allelfrequenzen der gefundenen SNPs wurden mit denen aus „HapMap-CEU“ abgeglichen. Außerdem wurden die Informationen über Kopplungsungleichgewichte (s. Kap. 2.15.5) der Referenzpopulation entnommen.

2.15.5 Kopplungsungleichgewichtsanalysen und Rekombination

Ein Kopplungsungleichgewicht (engl. „linkage disequilibrium“, LD) beschreibt die Tatsache, dass mehrere Polymorphismen oder spezifische Sequenzen häufiger als erwartet gemeinsam und nicht nach dem Zufallsprinzip vererbt werden [99]. Solche Verbunde von Polymorphismen können auf verschiedenen Genloci liegen und zu Gen-Blöcken, sogenannten Haplotypen (engl.: „haplotypes“), zusammengefasst werden. Diese Eigenschaft wird genutzt, um andere SNPs, die nicht im sequenzierten Areal liegen, aber mit einem gefundenen SNP im Kopplungsungleichgewicht stehen, in die Analyse einbeziehen zu können. Die identifizierten SNPs wurden sowohl untereinander bezüglich eines Kopplungsungleichgewichts untersucht als auch in Bezug auf SNPs, die sich nicht im für die vorliegende Arbeit sequenzierten Bereich befinden. Die Informationen für die Analysen wurden der „HapMap-CEU“ über den „Ensembl-Genome-Browser“ entnommen [91, 97]. Außerdem wurden die erlangten LD-Informationen über das Programm „SNAP“ (Broad-Institute) illustriert [100].

Die über „SNAP“ erlangten Abbildungen enthalten, neben den Informationen über Kopplungsungleichgewichte, auch Informationen über die Rekombinationsraten im Bereich der jeweiligen Gene bzw. Gen-Varianten. Die Rekombination findet im „crossing-over“ während der Meiose statt [99]. Beim „crossing-over“ kommt es zu einer Überkreuzung von mütterlichen und väterlichen Chromosomenanteilen. Bei diesem Vorgang wird intrachromosomale Erbinformation der Eltern ausgetauscht, was zu neuen Merkmalskombinationen führt. Die Rekombinationsrate wird durch Centimorgan pro Mega-Base (cM/Mb) angegeben [99]. Mit Centimorgan wird der Abstand zwischen zwei Genorten beschrieben. Allerdings handelt es sich bei der Einheit um keine physikalische Einheit sondern um ein Wahrscheinlichkeitsmaß für eine Rekombination. Ein Centimorgan entspricht einer Wahrscheinlichkeit von einem Prozent Rekombination in einer Generation (eine Rekombination auf 100 Generationen). Je

weiter zwei Loci hierbei voneinander entfernt liegen, desto wahrscheinlicher ist die Rekombination. Demzufolge bleiben nah beieinander gelegene Merkmalskombinationen über Generationen länger bestehen als weit voneinander entfernte. Unterschiedliche Gen-Loci weisen unterschiedliche Rekombinationsraten auf.

2.15.6 Prüfung auf Bindungsstellen für micro-RNA

Bei micro-RNA handelt es sich um 21-23 Nukleotide lange RNA, die in 3'-UTR-Bereichen von Genen bindet und dort für eine post-transkriptionelle Genregulation verantwortlich ist [101]. Die umliegenden Sequenzen von identifizierten Varianten im 3'-UTR-Bereich wurden auf mögliche Bindungsstellen für micro-RNA geprüft. Hierzu wurden die „Target-Scan“ [102, 103] und die „miRBase“ [102, 104] Datenbanken genutzt. Über die Eingabe der Sequenz mit der jeweiligen Variante konnten mögliche Bindungsstellen für micro-RNA ausgemacht werden.

3. Ergebnisse

In den folgenden Kapiteln werden die ermittelten Ergebnisse zur Phänotypisierung und Medikation (s. Kap. 3.1) sowie zur Genotypisierung (s. Kap. 3.2) detailliert erläutert. Im anschließenden Kapitel 3.3 sind die Ergebnisse aus der Phänotypisierung und der Genotypisierung der Übersicht halber zusammengefasst in Tabelle 15 dargestellt.

3.1 Phänotypisierung und Medikation

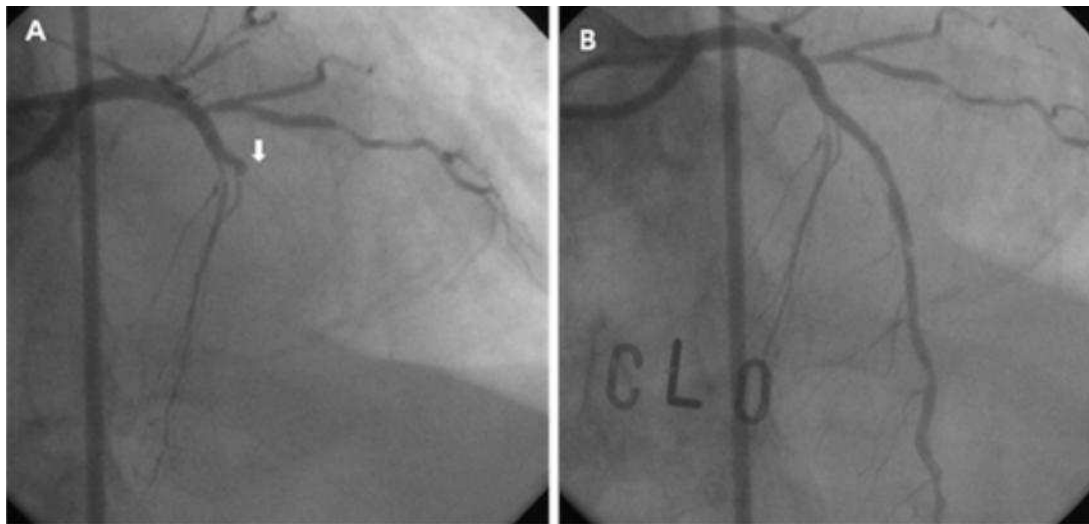
Für die vorliegende Arbeit wurden 15 Stentthrombosepatienten identifiziert. Nach einer Validierung der Stentthrombosen durch zwei interventionelle Kardiologen, wurden die Patienten anhand ihrer Krankenakten phänotypisiert (s. Kap. 3.1.1). Im Zuge der Aktendurchsicht wurde auch die Medikation der Patienten festgehalten (s. Kap. 3.1.2).

3.1.1 Phänotypisierung

Die Informationen für die Kollektivphänotypisierung wurden den Patientenakten entnommen. Alle 15 Stentthrombosepatienten des Kollektivs sind kaukasischer Abstammung und untereinander nicht verwandt. Die Patienten unterscheiden sich hinsichtlich ihres Alters, der Nebendiagnosen und der Medikation (s. Tab. 10 und Tab. 15): Zum Zeitpunkt der Stentthrombose litten die Kollektivpatienten unter einer koronaren Herzkrankheit und einem Hypertonus. Der Stentthrombose ging ein Herzinfarkt voraus, der eine PTCA mit Stentimplantation nötig machte. Für alle Patienten wurde Geschlecht (4 weibliche, 11 männliche), Alter (41-76 Jahre) und, sofern aus den Daten ermittelbar, der BMI (21-31,1) festgehalten. Daneben konnte bei den Patienten eine Reihe weiterer Faktoren bestimmt werden, die eine Entstehung der koronaren Herzerkrankung begünstigen. Dabei waren den jeweiligen Patientenakten nicht immer zu allen Kriterien Daten zu entnehmen. Gesichert festzustellen war Folgendes: Von den 15 Individuen waren 7 Patienten an einem Diabetes mellitus erkrankt, 5 hatten eine positive Familienanamnese für eine koronare Herzerkrankung und 13 hatten eine Hypercholesterinämie. Darüber hinaus gab es im Kollektiv 9 aktive Raucher und einen ehemaligen Nikotinkonsumenten. Die Raucher hatten zwischen 15 und 60

Packyears konsumiert. Die koronarangiografisch gemessene Ejektionsfraktion lag zwischen 15% und 54%. Die Zeitspanne zwischen Stentimplantation und Stentthrombose betrug zwischen 3 und 280 Tage. Informationen über die verwendeten Stent-typen im Patientenkollektiv waren den Akten ebenfalls nicht in allen Fällen zu entnehmen. Mindestens 5 Patienten waren mit DES und mindestens 4 Patienten mit BMS versorgt (s.a. Tab. 15 in Kap. 3.3). Die Abbildung 3 zeigt die Koronarangiografie einer Stentthrombose im therapeutischen Verlauf.

Abb. 3 Stentthrombose im therapeutischen Verlauf [105]: Die Koronarangiografie in Bild A zeigt eine Stentthrombose im Bereich der LAD. Die Position des durch einen Thrombus fast vollständig okkludierten Stents ist durch den Pfeil markiert. In Bild B wird die Angiografie nach erfolgreicher interventioneller Therapie mit nachfolgendem adäquaten Durchblutungsfluss gezeigt.



3.1.2 Medikation

Im Regelfall soll durch die Gabe von Clopidogrel und ASS der Ausbildung einer Stentthrombose prophylaktisch entgegengewirkt werden. Auch die 15 Patienten des Kollektivs erhielten nach der Stentimplantation Clopidogrel (s. Tab. 10; s.a. Tab. 15 in Kap. 3.3). Die angeordnete Clopidogrel-Einnahmedauer nach der Stentimplantation lag im Kollektiv zwischen einem und 12 Monaten. Alle 15 Patienten waren zum Zeitpunkt der Stentthrombose mit Clopidogrel versorgt. Ein Patient erhielt eine Dosis von 150 mg Clopidogrel, die übrigen wurden mit 75 mg Clopidogrel täglich therapiert. Für die Patienten 3, 5 und 12 waren den Patientenakten zusätzlich eindeutige Informationen über die Verabreichung einer „loading dose“ („loading dose“ von 600 mg Clopidogrel) zu entnehmen. Darüber hinaus nahmen alle Patienten des Kollektivs

zum Zeitpunkt der Stentthrombose ASS (100 mg) ein. Im Kollektiv nahmen 10 Patienten ein Statin (Cyp3A4-Metabolismus, s. Tab. 10 und 15) ein. Auch Substrate anderer Cyp-Enzyme wurden eingenommen: so erhielten 10 Patienten einen Protonenpumpeninhibitor (Cyp2C19-Metabolisierung, s. Tab. 10 und 15). Die Compliance der Patienten wurde von den verantwortlichen Ärzten nicht kommentiert, weshalb davon ausgegangen wurde, dass alle Patienten des Kollektivs den Anordnungen der behandelnden Ärzte Folge leisteten.

Tab. 10 Phänotypisierung und Medikation der Kollektivpatienten

Merkmal	Wert
Anzahl der Patienten	15
Geschlecht:	
weiblich	4
männlich	11
Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Stentthrombose (gemittelt)	60,7
BMI (kg/m ² ; gemittelt)	27
Koronare Herzerkrankung (KHK)	15
Positive Familienanamnese für KHK	5
Hypertonus	15
Ejektionsfraktion (koronarangiografisch, n=11)	37,9%
ASS nach Stentimplantation	15
Clopidogrel nach Stentimplantation	15
Clopidogrel zum Zeitpunkt Stentthrombose	15
ASS zum Zeitpunkt Stentthrombose	15
Zeit Stentimplantation bis Stentthrombose (Tage; gemittelt)	31,5
Antihypertensive Therapie	15
Statin	10
Protonenpumpeninhibitor	10
Nikotinkonsum:	
Aktiv	9
Ehemalig	1
Diabetes mellitus	7
Hypercholesterinämie	13

3.2 Genotypisierung

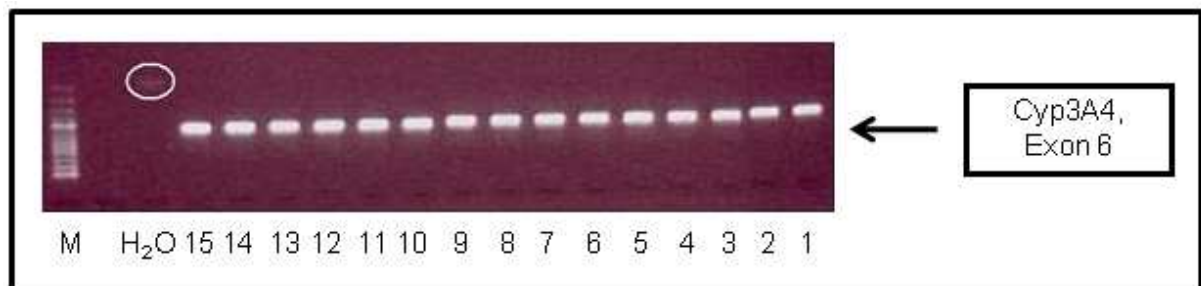
Aufgrund von pathophysiologischen Überlegungen bezüglich der Clopidogrel-Resistenz, wurden die beiden Kandidatengene P2RY12 und Cyp3A4 (s. Kap. 1.3) für die Genotypisierung der 15 Stentthrombosepatienten ausgewählt. Die Gene wurden mittels PCR amplifiziert. Die daraus gewonnenen PCR-Produkte wurden per Gelelektrophorese geprüft (s. Kap. 3.2.1). Für die Sequenzierung der PCR-Produkte wurden Firmen beauftragt (s. Kap. 3.2.2). Daraufhin konnten die erlangten Elektro-

pherogramme der Sequenzen der Stentthrombosepatienten ausgewertet werden (s. Kap. 3.2.3).

3.2.1 Gelelektrophorese

Stichproben aller PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese auf unspezifische oder ausgefallene PCR analysiert. Auch Verunreinigungen konnten über die Leerreaktion mit Wasser ausgeschlossen werden (s. Abb. 4, Kreis). Im Falle einer Kontamination oder einer ausgebliebenen Reaktion wurde der Versuchsansatz verworfen und die PCR wiederholt. Abbildung 4 zeigt das Ergebnis der Gelelektrophorese der PCR-Produkte von Exon 6 des Cyp3A4-Gens als Beispiel für eine gelungene Reaktion. Bei entsprechenden Ergebnissen konnten die PCR-Proben für die Sequenzierung verwendet werden.

Abb. 4 Gelelektrophorese: Auf der linken Seite der Abbildung ist durch die übereinander liegenden Banden der 100 bp-Standard zu sehen (M). Der weiße Kreis auf Höhe der 100 bp markiert die Bande der unspezifischen Primer des H₂O-Leerwerts. Rechts anschließend befinden sich die 15 kräftigen Banden der PCR-Produkte von Cyp3A4 (Exon 6) der Patienten-DNA. Neben diesen Banden (bei ca. 600 bp) sind keine Verunreinigungen oder unspezifische PCR-Produkte ersichtlich, sodass von einer gelungenen PCR ausgegangen werden kann.



3.2.2 Sequenzierung der P2RY12- und Cyp3A4-Gene

Die PCR-Produkte wurden aufgereinigt und anschließend an die Firmen „Sequence Laboratories (SeqLab) GmbH“ (Göttingen) und „MWG-Biotech AG“ (Ebersberg) versandt. Die von den Firmen angefertigten Elektropherogramme wurden, wie in Kapitel 2.14 beschrieben, ausgewertet.

Bei den 15 Patienten des Kollektivs fanden sich in den sequenzierten Bereichen des P2RY12-Gens vier bekannte Polymorphismen (s. Abb. 5). Einer der P2RY12-

Polymorphismen liegt in einem intronischen Abschnitt. Eine weitere Variante wurde im 5'-UTR-Bereich des Gens identifiziert. Die übrigen zwei SNPs befinden sich in kodierenden DNA-Bereichen (cDNA). In den Cyp3A4-Sequenzierungen konnten fünf bekannte Polymorphismen gefunden werden (s. Abb. 13). Drei SNPs befinden sich in intronischen Regionen, ein SNP liegt im 3'-UTR-Bereich des Cyp3A4-Gens. Von den identifizierten Cyp3A4-Polymorphismen liegen zwei Varianten in cDNA-Regionen. Die identifizierten Polymorphismen sind in den Tabellen 11 und 12 dargestellt.

Die intronischen Varianten wurden im Kontext der jeweiligen Sequenz auf einen möglichen Bindungsort für Transkriptionsfaktoren untersucht. Hierbei wurde insbesondere auf das Vorhandensein einer TATA-Box, einer GC-Box und einer CAAT-Box geachtet. Die Ergebnisse der Überprüfung auf entsprechende Sequenzen werden in Kapitel 3.2.3 beschrieben.

Für die identifizierten intronischen Varianten der sequenzierten Gene wurden „Splice-Site-Score“-Berechnungen (s. Kap. 2.15.3) durchgeführt. Die Berechnung dient der Identifikation von Bindungsstellen der Spleiß-Enzyme. Durch die identifizierten Varianten könnten neue Angriffspunkte für Spleiß-Enzyme entstehen. In den Tabellen 13 und 14 sind die Ergebnisse der „Splice-Site-Score“-Berechnung wiedergegeben.

Um die Funktion der intronischen sowie der in einem UTR-Bereich liegenden exonischen Varianten weiter zu untersuchen, wurden spezieübergreifende Homologieanalysen mittels BLAT (s. Kap. 2.15.2) durchgeführt. Die Analyse dient der Aufdeckung von evolutionär konservierten Arealen der Gene und weist auf wichtige Funktionen der SNPs für die Genexpression hin. Relevante Befunde der Analysen werden in den Abschnitten zu den einzelnen SNPs in Kapitel 3.2.3 erläutert.

Die Bindung von micro-RNAs kann die Genexpression beeinflussen (s. Kap. 2.15.6). Micro-RNAs binden an 3'-UTR-Sequenzen von Genen. Eine identifizierte Variante befindet sich im 3'-UTR-Bereich von Cyp3A4. Die umliegende Sequenz der Variante wurde auf mögliche Bindungsstellen bekannter micro-RNAs untersucht. Das Ergebnis der Analyse ist in der Beschreibung der Variante in Kapitel 3.2.3.2.5 wiedergegeben.

Tab. 11 Überblick über die Ergebnisse der Sequenzierung für P2RY12: In der ersten Spalte der Tabelle ist die Identifikationsnummer des jeweiligen Polymorphismus angegeben. Die zweite Spalte enthält Informationen über die genomische Position der Variante. Hierbei wurde die erste Base von Exon 1 des P2RY12-Gens als Ursprung für die Position der Varianten gewählt. In der dritten Spalte ist die Position der Varianten in Bezug auf die jeweiligen Exons angegeben. Auch hier ist die erste Base des jeweiligen Exons als erste Zählstelle gewählt worden. In Spalte vier ist die Position im Transkript angegeben. Die Position des Polymorphismus mit der jeweiligen Aminosäure im Protein ist in der fünften Spalte aufgeführt. In der Spalte sechs wird die Allelfrequenz in der Referenzpopulation angeführt [97]. In der Spalte „Literatur“ sind die Arbeiten zitiert, in denen die Variante direkt oder indirekt untersucht wurde. In der letzten Spalte werden die Patienten mit dem jeweiligen Polymorphismus in der Genotypisierung genannt.

SNP ID	Position Genom	Position P2RY12	Position Transkript	Position Protein	MAF	Literatur	Patient mit SNP
rs1491974	gC88T	Int 1 +C28T	-	-	0,58	-	4-7, 11, 13, 15
rs3821667	gG44099A	Ex 2 G145A	cG168A	-	0,38	[64]	1, 9, 11
rs6785930	gG45924A	Ex 3 G32A	cG257A	pN6N	0,52	[62, 65, 67, 68]	3-6, 12, 14
rs6809699	gA45942C	Ex 3 A50C	cA275C	pG12G	0,38	[62-68]	1, 9, 11

Tab. 12 Überblick über die Ergebnisse der Sequenzierung für Cyp3A4: Die Erläuterungen zu den Spalten entsprechen denen für Tab. 11, jedoch bezogen auf Cyp3A4.

SNP ID	Position Genom	Position Cyp3A4	Position Transkript	Position Protein	MAF	Literatur	Patient mit SNP
rs4987159	gG15741A	Ex 7 G58A	cG763A	pl193I	-	-	2
rs2687116	gC15866A	Int 7 +C34A	-	-	0,07	[106]	2, 10, 11
rs4646437	gC16726T	Int 8 -C202T	-	-	0,23	[80, 81]	2, 10
rs2242480	gA20343T	Int 10 +C12T	-	-	0,08	[106]	2, 10, 11
rs28371763	gT27001A	Ex 13 T1044A	cT2564A	-	0,14	-	8

Tab. 13 „Splice-Site-Score“-Berechnung P2RY12: Für die intronische Variante von P2RY12 wurde ein „Splice-Site-Score“ berechnet (s. Kap. 2.15.3). In der ersten Spalte ist der Polymorphismus angegeben. In den darauffolgenden Spalten sind die Ergebnisse der Berechnungen des „Splice-Site-Score“ für den Wildtyp bzw. der Wert für die Variante angeführt.

Identifikation	„Splice-Site-Score“ Wildtyp	„Splice-Site-Score“ Variante
rs1491974	-0,2 (3', C)	-0,3 (3', T)

Tab. 14 „Splice-Site-Score“-Berechnung Cyp3A4: Die Erläuterungen zu den Spalten entsprechen denen für Tab. 13, jedoch bezogen auf die intronischen Varianten von Cyp3A4.

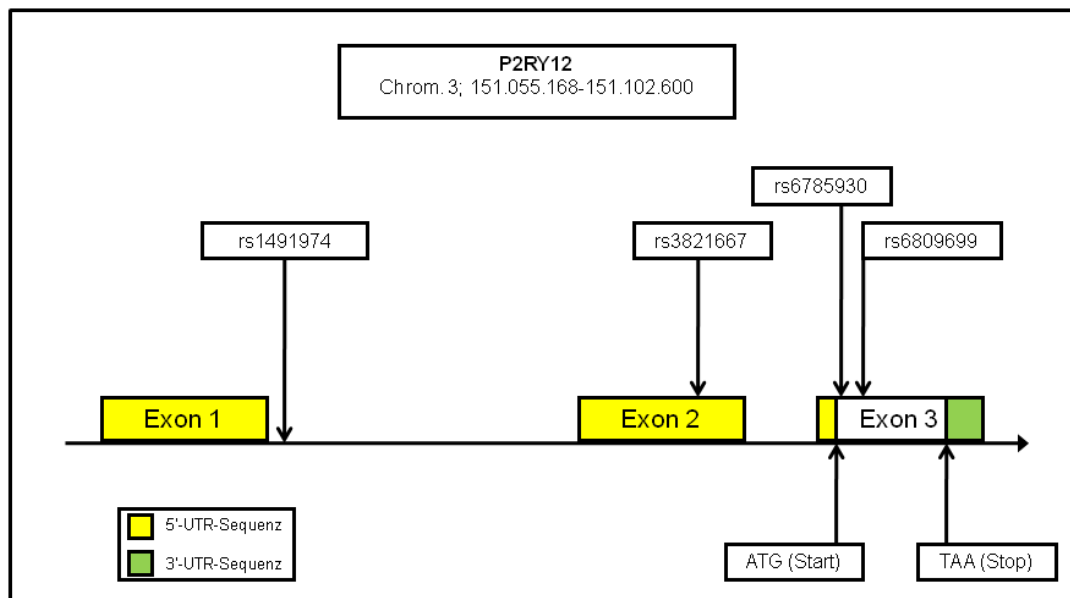
Identifikation	„Splice-Site-Score“ Wildtyp	„Splice-Site-Score“ Variante
rs2687116	-4,1 (3', C)	-6,8 (3', A)
rs4646437	-13,9 (5', C)	-13,9 (5', T)
rs2242480	-9,2 (3', C)	-9,2 (3', T)

3.2.3 Auswertung der identifizierten Genvarianten

3.2.3.1 P2RY12

Die im Zuge der Genotypisierung ausgemachten Varianten werden in den nachfolgenden Kapiteln vorgestellt. Abbildung 5 veranschaulicht die Position der SNPs in Bezug auf das P2RY12-Gen (Ensembl ID: ENSG00000169313 vom 26.11.2006) [61].

Abb. 5 P2RY12 mit Varianten: In der Abbildung wird das P2RY12-Gen durch den waagerechten Pfeil angezeigt. Unterhalb des Pfeils ist die genomische Position des Gens angegeben. Die Kästen auf dem waagerechten Pfeil markieren die Position der 3 Exons des Gens. Bei den Arealen zwischen den Exons handelt es sich um intronische Sequenzen von P2RY12. Oberhalb des waagerechten Pfeils sind die identifizierten Varianten mit „rs-Nummer“ angeführt. Die senkrechten Pfeile markieren die Position der Varianten in Bezug auf das Gen und dessen Exons.



3.2.3.1.1 rs1491974

In der Nähe von Exon 1 des P2RY12-Gens wurde bei den Patienten 4 bis 7, 11, 13 und 15 eine bekannte intronische Variante (rs1491974) identifiziert [107]. Der rs1491974-Polymorphismus befindet sich nicht in einer Sequenz mit Bindungsfunktion für Transkriptionsfaktoren. Bei Kaukasiern liegt die Allelfrequenz für +C28T im Referenzkollektiv bei 0,58 [97]. Die Abbildung 6 zeigt das Elektropherogramm für den heterozygot vorliegenden Polymorphismus. Durch den SNP wird kein neuer Angriffspunkt für Spleiß-Enzyme geschaffen („Splice-Site-Score“: -0,2 vs. -0,3, s.a.

Kap. 2.15.3). Im Homologieabgleich des BLAT (Abb. 7) schließt sich unmittelbar nach dem Polymorphismus ein hochkonserviertes Areal an.

Abb. 6 Elektropherogramm des Patienten Nr. 5 mit rs1491974 als Variante: In der Mitte der Abbildung ist die Position der Variante markiert (s. Kreis). An dieser Stelle wurden die Signale zweier Nukleotide aufgezeichnet (blau für Cytosin und rot für Thymin). Als Kode für die Heterozygotie wird der Buchstabe „Y“ in der Sequenz genannt.

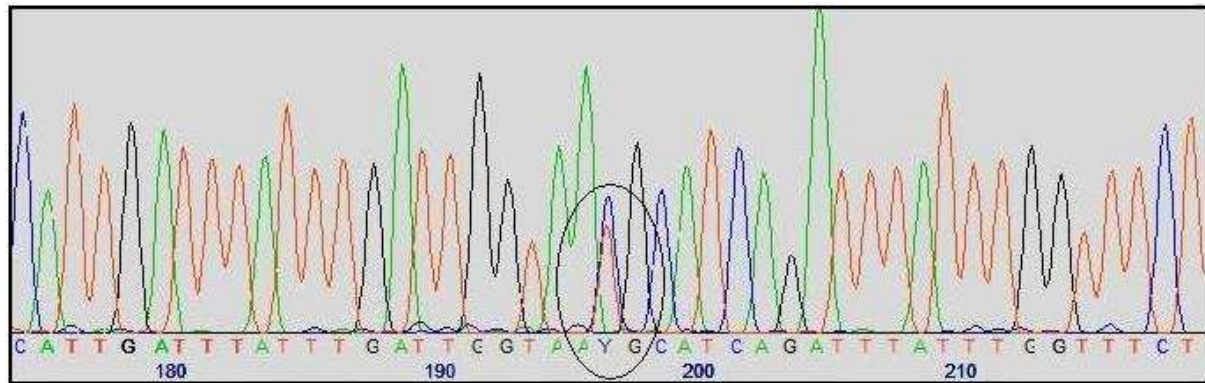
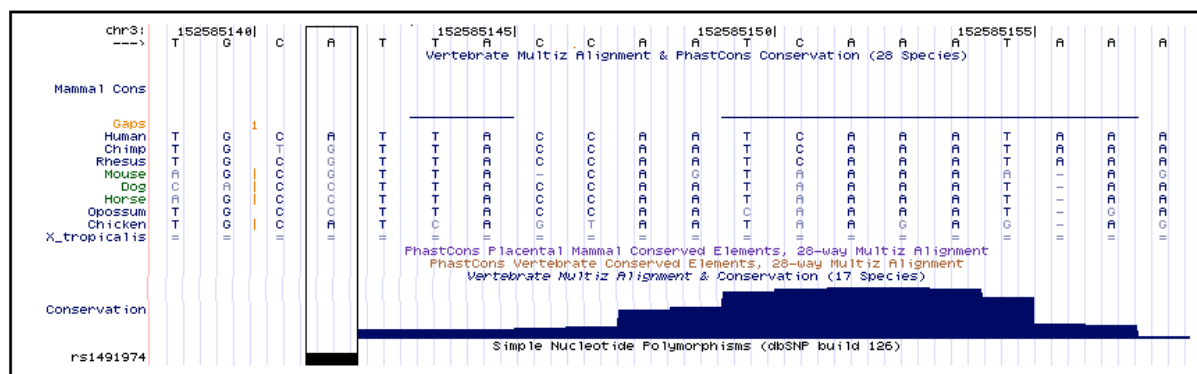


Abb. 7 Homologieabgleich durch BLAT im Bereich von rs1491974: In der obersten Zeile der Abbildung wird die eingegebene menschliche Sequenz mit genomischer Position angezeigt. In den nachfolgenden Zeilen werden neben menschlichen Sequenzen auch die anderer Spezies angegeben. So kann der Sequenzvergleich zwischen den Spezies durchgeführt werden. Ein dunkles Blau signalisiert eine Homologie, ein helles Blau einen Sequenzunterschied. Striche in der Sequenz zeigen einen einzelnen Basenunterschied an und ein Doppelstrich indiziert mehrfache Basenunterschiede. Die Blockgrafik am unteren Ende der Abbildung zeigt das Maß der Konservierung an. In der untersten Zeile wird die Variante (rs1491974) mit einem schwarzen Block gezeigt. Die schwarze Umrandung hebt die relevante Position des SNPs in der Homologieanalyse hervor. Die Variante befindet sich unmittelbar vor einem hochkonservierten Areal.



3.2.3.1.2 rs3821667

Bei den Individuen 1, 9 und 11 konnte ein weiterer bekannter SNP (rs3821667) in Exon 2 gefunden werden [108]. Der cG168A-Polymorphismus befindet sich im 5'-

UTR-Bereich des Transkripts. Die Allelfrequenz für cG168A liegt bei Kaukasiern im Referenzkollektiv bei 0,38 [97]. Abbildung 8 zeigt das Elektropherogramm für den heterozygoten Polymorphismus. In Abbildung 9 wird der BLAT-Homologieabgleich mit anderen Säuge- und Wirbeltieren gezeigt. Die Variante befindet sich 5 Basen nach und unmittelbar vor einer hochkonservierten Sequenz.

Abb. 8 Elektropherogramm des Patienten Nr. 1 mit rs3821667 als Variante: In der Mitte der Abbildung ist die Position der Variante markiert. Die Sequenzierungsmaschine hat an dieser Stelle die Signale zweier Nukleotide empfangen (schwarz für Guanin und grün für Adenin). Als Mehrdeutigkeitscode wird der Buchstabe „K“ in der Sequenz genannt.

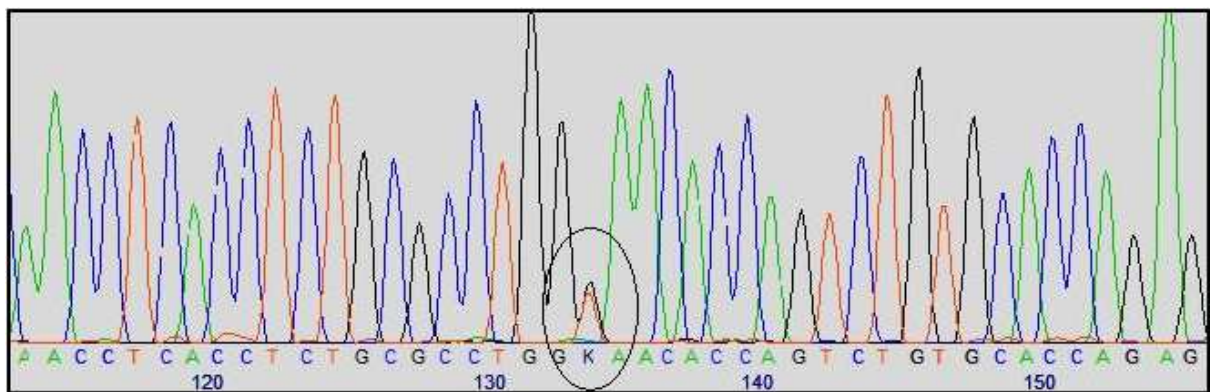
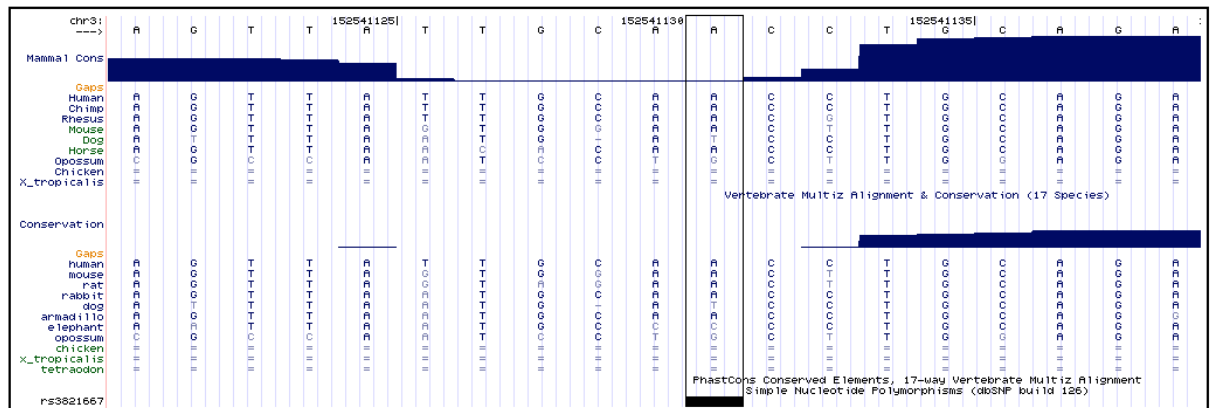


Abb. 9 Homologieabgleich durch BLAT im Bereich von rs3821667: Zu generellen Erläuterungen der Abbildung s. Abb. 7. Durch einen schwarzen Block wird die Variante (rs3821667) in der untersten Zeile gezeigt. Die schwarze Umrandung hebt die relevante Position des SNPs in der Homologieanalyse hervor. Die Variante befindet sich 5 Basen nach und unmittelbar vor einem hochkonservierten Areal.

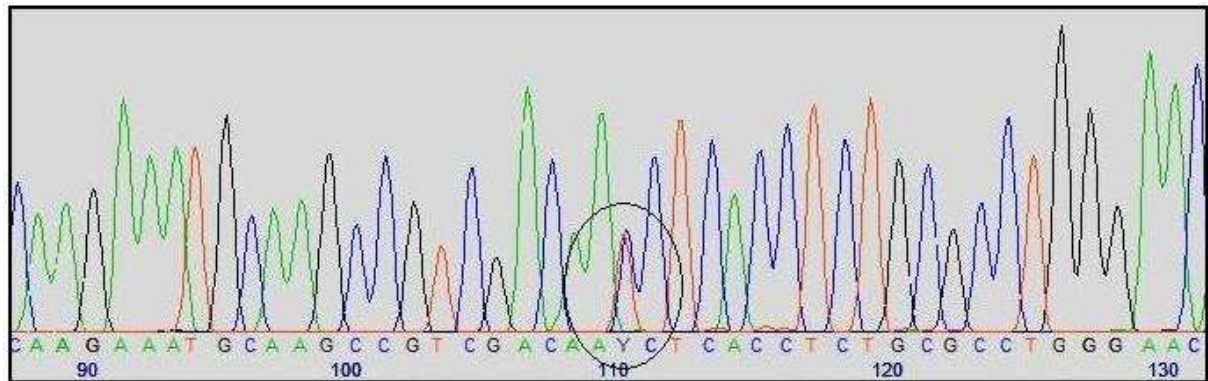


3.2.3.1.3 rs6785930

Bei den Patienten 3 bis 6, 12 und 14 konnte eine bekannte Variante (rs6785930) ermittelt werden [109]. Der G32A-Polymorphismus in Exon 3 (cG257A im Transkript) kodiert synonym an Position 6 des Proteins (pN6N) und hat somit keinen direkten

Einfluss auf das Genprodukt. Bei Kaukasiern liegt die Allelfrequenz für den SNP bei 0,52 [97]. Abbildung 10 zeigt das Elektropherogramm für den heterozygoten Polymorphismus.

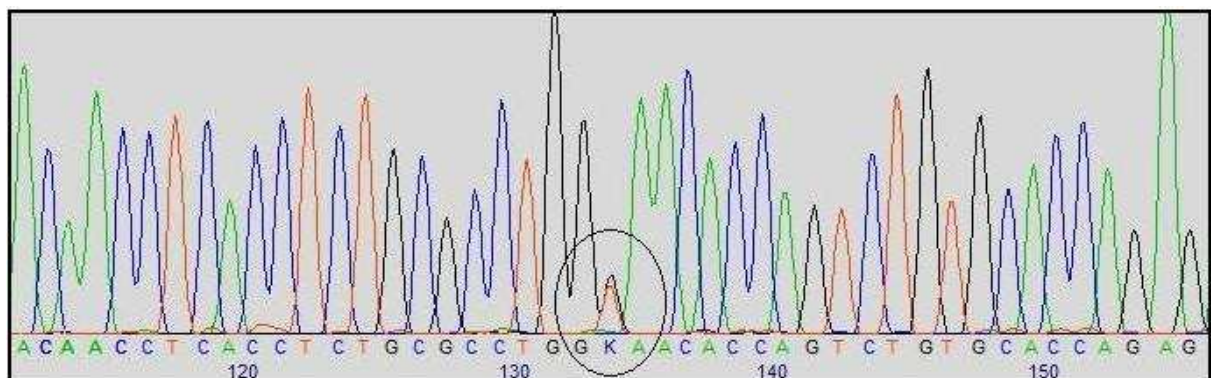
Abb. 10 Elektropherogramm des Patienten Nr. 3 mit rs6785930 als Variante: In der Mitte der Abbildung ist die Position der Variante markiert. Die Farbe Blau zeigt Cytosin und Rot steht für Thymin. Als Mehrdeutigkeitscode wird der Buchstabe „Y“ in der Sequenz genannt.



3.2.3.1.4 rs680999

Bei den Individuen 1, 9 und 11 konnte der bekannte A50C-Polymorphismus (rs6809699) in Exon 3 identifiziert werden [110]. Bei der Variante handelt es sich um einen synonym kodierenden Polymorphismus für Position cA275C im Transkript respektive pG12G im Protein. Die Allelfrequenz für die Variante beträgt bei Kaukasiern 0,38 [97]. Abbildung 11 zeigt das Elektropherogramm für den heterozygoten Polymorphismus.

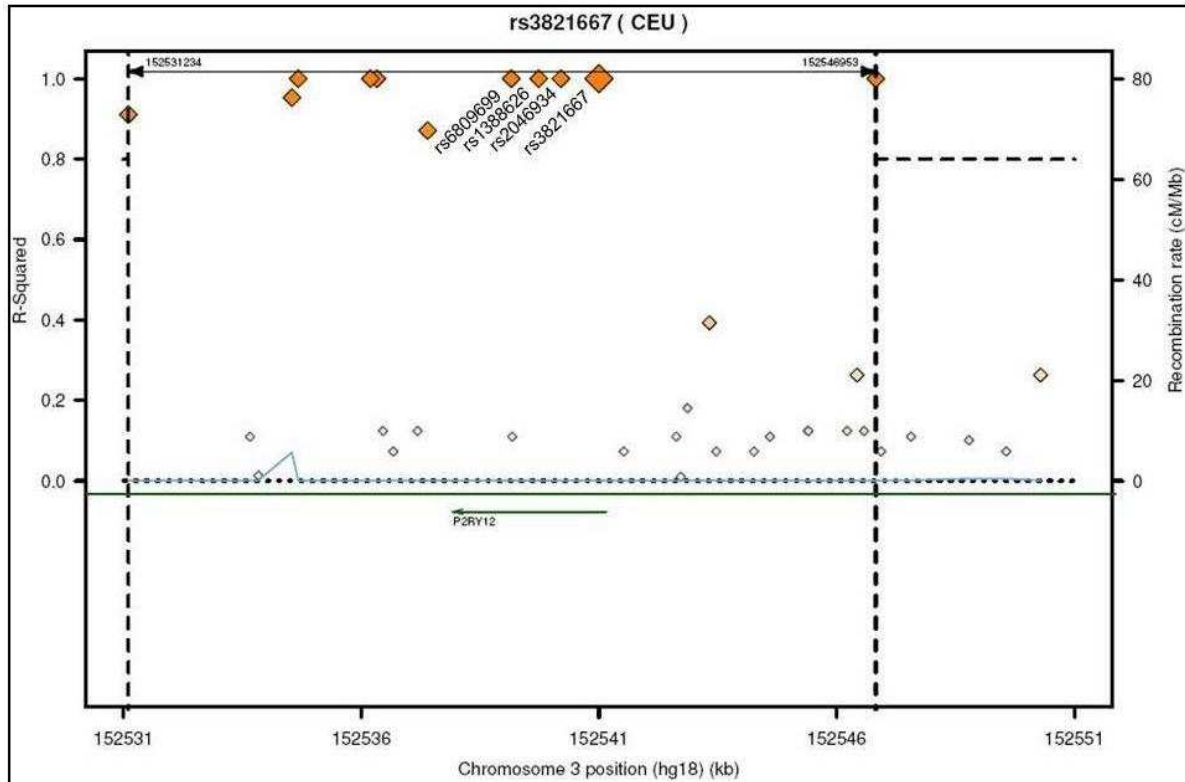
Abb. 11 Elektropherogramm des Patienten Nr. 1 mit rs6809699 als Variante: In der Mitte der Abbildung ist die Position der Variante markiert. In dem Elektropherogramm zeigt die Farbe Schwarz die Base Guanin und Rot Thymin an. Als Mehrdeutigkeitscode wird der Buchstabe „K“ verwendet.



3.2.3.1.5 LD-Analysen für die identifizierten P2RY12-Varianten

Im Zuge der Genotypisierung von P2RY12 wurden Kopplungsungleichgewichtsanalysen durchgeführt, um die identifizierten Varianten untereinander und mit anderen SNPs, die sich nicht in dem in dieser Arbeit sequenzierten Areal befinden, in einen Kontext zu bringen. Varianten, die auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit identifiziert wurden, sind der besseren Zuordnung wegen in diesem Kapitel **fett** gedruckt. Bei der Analyse wurde ein Kopplungsungleichgewicht von **rs6809699** zu **rs3821667** ($r^2=1,0$) festgestellt [97]. Das hohe Kopplungsungleichgewicht dieser SNPs wird durch das gleichzeitige Vorliegen beider Varianten bei den Patienten 1, 9 und 11 bestätigt. Des Weiteren konnte ein hohes Kopplungsungleichgewicht ($r^2=1,0$) der identifizierten Polymorphismen (**rs6809699** und **rs3821667**) zu den intronischen Varianten rs2046934 [111] und rs1388626 [112] ermittelt werden, die sich jedoch in Bereichen befinden, die für die vorliegende Arbeit nicht sequenziert wurden. Abbildung 12 illustriert das LD-Verhältnis für die o.g. SNPs. Die Verteilung der Polymorphismen auf die verschiedenen Patienten wird in den Tabellen 11 und 15 wiedergegeben. Die Variantenverteilung bei den Kollektivpatienten steht im Einklang mit der LD-Information aus der Referenzpopulation.

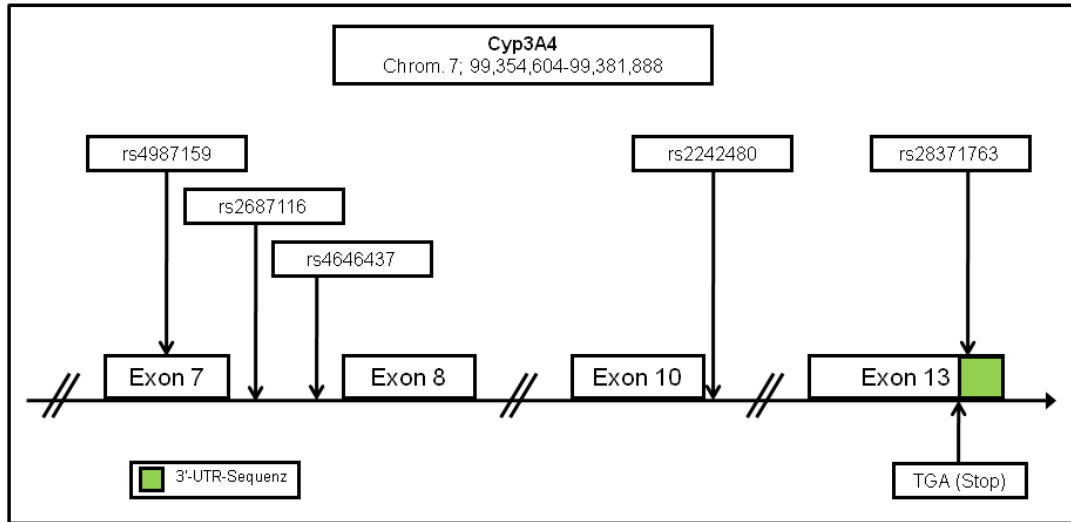
Abb. 12 LD für P2RY12 mit Fokus auf rs6809699 und rs3821667 [100]: Der Plot zeigt die detaillierte LD-Information im Bereich von P2RY12. Die LD-Information für die gezeigten Varianten bezieht sich auf die „HapMap-CEU“-Population. Im unteren Teil der Abbildung ist die Information über die genomische Position angegeben (10 kb-Fenster). Der grüne Streifen markiert die Position von P2RY12. Die orangefarbenen Vierecke markieren die Position der SNPs. Die Skala der r^2 -Werte für die Beschreibung der LD-Beziehungen ist auf der linken Seite des Plots angegeben. Der Fokus dieses Plots liegt auf **rs3821667** (größtes Viereck). Des Weiteren sind gekennzeichnet (von links nach rechts): **rs6809699**, rs1388626 und rs2046934. Die bezeichneten Varianten befinden sich alle im Bereich von P2RY12. Die SNPs rs1388626 und rs2046934 befinden sich nicht im sequenzierten Areal der Arbeit. Die SNPs unterliegen r^2 -Werten von 1,0. Auf der rechten Seite des Plots ist die Skala für die Rekombinationsrate (cM/Mb) aufgetragen. Die Rekombinationsrate ist in dem Plot durch die blauen Linien gekennzeichnet.



3.2.3.2 Cyp3A4

Im Folgenden werden die im Zuge der Genotypisierung identifizierten Varianten im Bereich von Cyp3A4 (Ensembl ID: ENSG00000160868, 26.11.2006) vorgestellt. Die Abbildung 13 fasst die SNPs im Kontext des Cyp3A4-Gens zusammen.

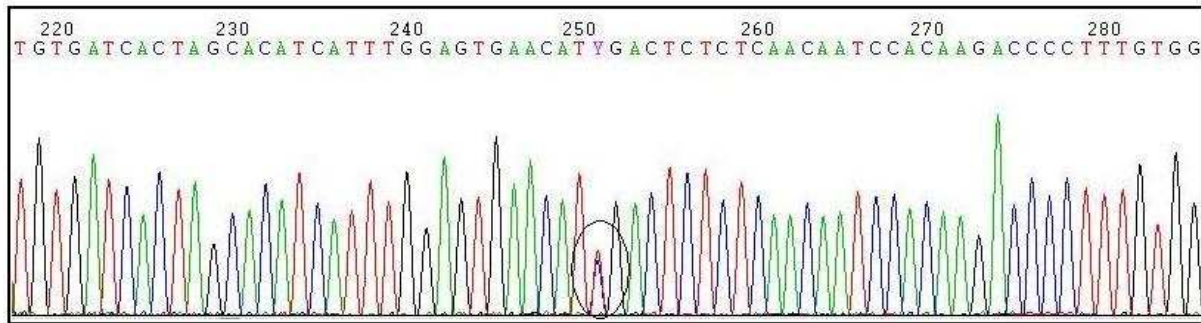
Abb. 13 Cyp3A4 mit Varianten: Für die generelle Erläuterung der Abbildung siehe Abb. 5. Bei dieser Darstellung der Positionen der SNPs auf dem Cyp3A4-Gen werden nur die relevanten Exons gezeigt. Sprünge in der Sequenz werden durch die diagonalen Doppelstriche auf dem waagerechten Pfeil gekennzeichnet.



3.2.3.2.1 rs4987159

Bei Patient 2 konnte ein Polymorphismus (rs4987159) ermittelt werden. Die G58A-Variante befindet sich in Exon 7 des Cyp3A4-Gens. Der Polymorphismus befindet sich an Position cG763A im Transkript und kodiert synonym an Position pI193I für das Protein [113]. Daten über eine Allelfrequenz für die heterozygote Form bei Kaukasiern liegen nicht vor [98]. Abbildung 14 zeigt das Elektropherogramm für die heterozygot vorliegende Variante.

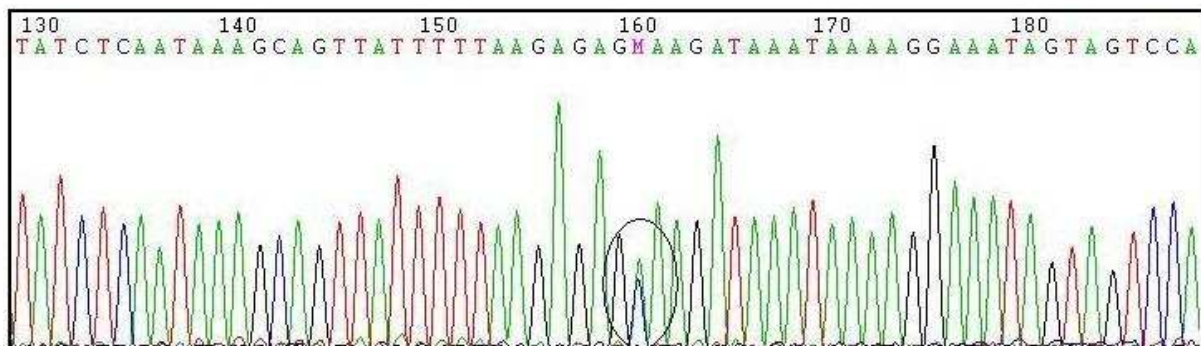
Abb. 14 Elektropherogramm des Patienten Nr. 2 mit rs4987159 als Variante: Der Polymorphismus ist in der Mitte der Abbildung markiert. Die Farbe Schwarz zeigt Thymin an. Blau steht für Cytosin. Als Mehrdeutigkeitscode wird der Buchstabe „Y“ verwendet.



3.2.3.2.2 rs2687116

Bei den Patienten 2, 10 und 11 konnte eine weitere intronische Variante identifiziert werden (rs2687116). Die +C34A-Variante befindet sich stromabwärts von Exon 7 des Cyp3A4-Gens [114]. Die Allelfrequenz für +C34A liegt für Kaukasier bei 0,07 [97]. Die Prüfung auf mögliche Einflüsse der Variante auf Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren (s. Kap. 3.2.2) fiel negativ aus. Die „Splice-Site-Score“-Berechnung für den Polymorphismus ergab eine Veränderung des Werts von -4,1 auf -6,8 (s. a. Kap. 2.15.3). Die Variante dient somit nicht als möglicher Angriffspunkt für ein alternatives Spleißen. Abbildung 15 zeigt das Elektropherogramm für den heterozygoten Cyp3A4-Polymorphismus.

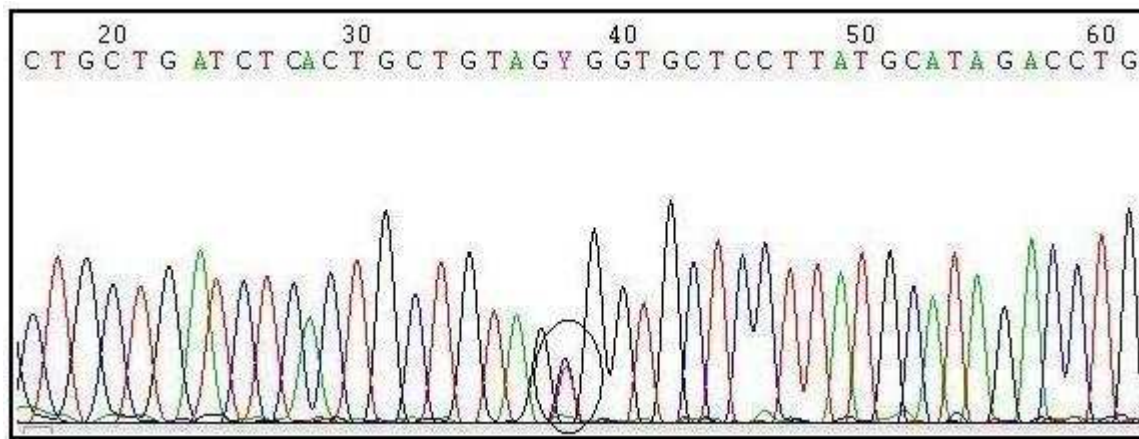
Abb. 15 Elektropherogramm des Patienten Nr. 10 mit rs2687116 als Variante: In der Mitte der Abbildung ist die Position der Variante durch den Kreis markiert. In der Grafik wird durch die Farbe Grün Adenin und durch Blau Cytosin angegeben. Der Buchstabe „M“ signalisiert die Mehrdeutigkeit in der Sequenz.



3.2.3.2.3 rs4646437

Bei den Individuen 2 und 10 konnte eine intronische Variante im Bereich des Exon 8 (rs4646437) gezeigt werden [115]. Die Allelfrequenz für –C202T liegt bei Kaukasiern in der Referenzpopulation bei 0,23 [97]. In der „Splice-Site-Score“-Berechnung entsteht durch die Variante keine Veränderung des Werts (-13,9 vs. -13,9). Die Abbildung 16 zeigt das Elektropherogramm für die heterozygote Variante. Die Variante wurde bezüglich eines Einflusses auf Transkriptionsfaktoren (s. Kap. 3.2.2) untersucht, wobei kein positives Ergebnis erlangt werden konnte.

Abb. 16 Elektropherogramm des Patienten Nr. 10 mit rs4646437 als Variante: Der Kreis in der Mitte der Abbildung markiert die Position der Variante. Die Farbe Schwarz steht für Guanin, Blau für Cytosin. Der Buchstabe „Y“ signalisiert an dieser Stelle die Mehrdeutigkeit.



3.2.3.2.4 rs2242480

In der Sequenzierung der PCR-Produkte der Patienten 2, 10 und 11 konnte der intronische +C12T-Polymorphismus (rs2242480) identifiziert werden. Die Allelfrequenz für die Variante im Bereich von Exon 10 liegt im Referenzkollektiv bei 0,08 [97]. Die „Splice-Site-Score“-Berechnung ergab für beide Allele keine Veränderung des Werts (-9,2 vs. -9,2). Abbildung 17 zeigt das Elektropherogramm für den heterozygoten Polymorphismus. Die Homologieanalyse mittels BLAT wird in Abbildung 18 gezeigt. In der Abbildung ist ersichtlich, dass sich der Polymorphismus eine Base vor einem hochkonservierten Areal befindet. Der Polymorphismus ist nicht an Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren beteiligt.

Abb. 17 Elektropherogramm des Patienten Nr. 11 mit rs2242480 als Variante: Der Kreis in der Mitte der Abbildung markiert die Position der Variante. Die Farbe Schwarz steht für Guanin, Grün für Adenin. Der Buchstabe „Y“ signalisiert an dieser Stelle die Mehrdeutigkeit.

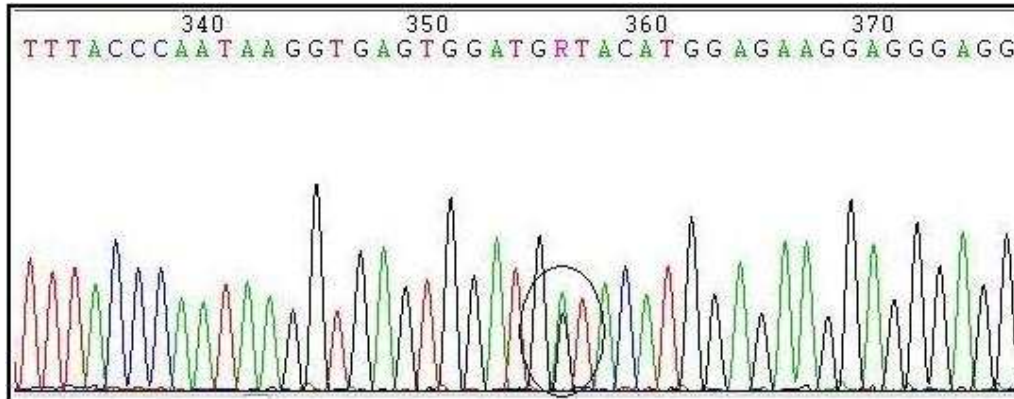
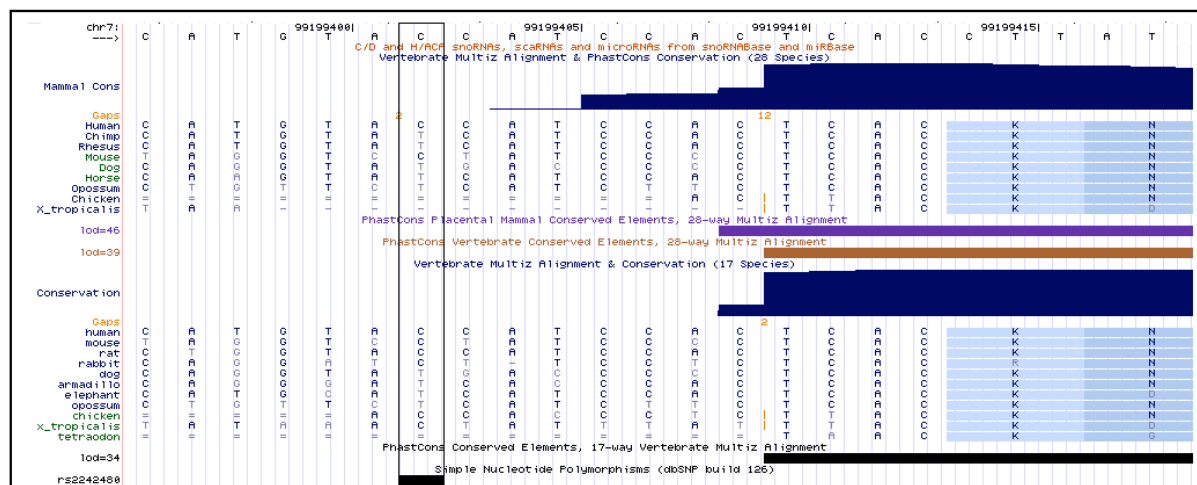


Abb. 18 Homologieabgleich durch BLAT im Bereich von rs2242480: Die Sequenz für die Homologieanalyse wurde so gewählt, dass von rechts nach links in der genomischen Sequenz stromaufwärts bedeutet. So liegt die +C12T-Variante in der Grafik vor Exon 10. Die Position von rs2242480 ist durch den schwarzen Kasten gekennzeichnet. Es ist erkennbar, dass die Variante sich unmittelbar an ein hochkonserviertes Areal anschließt. Für generelle Erläuterungen zur Grafik s.a. Abb. 7.

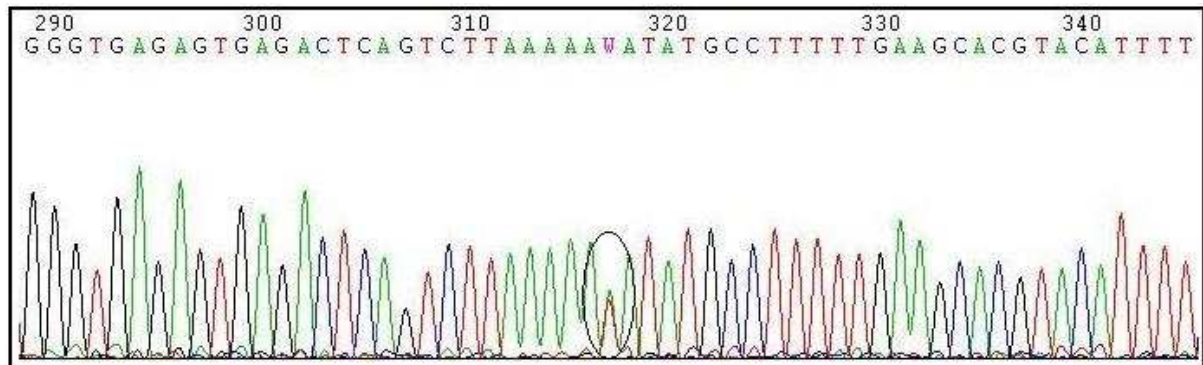


3.2.3.2.5 rs28371763

In der Sequenzierung von Cyp3A4 bei Patient 8 ergab sich eine weitere Variante im 3'-UTR-Bereich des Gens (rs28371763) [116]. Die T1044A-Variante in Exon 13 (Position cT2564A im Transkript) zeigt in der Referenzpopulation eine Allelfrequenz von 0,14 [97]. Dem Polymorphismus konnte bisher keine Auswirkung auf das Genprodukt nachgewiesen werden. Micro-RNAs binden an Sequenzen im 3'-UTR-Bereich. Der Variante konnte kein Einfluss auf Bindungsstellen für bekannte micro-RNAs nachge-

wiesen werden. Die Abbildung 19 zeigt das Elektropherogramm für den heterozygoten Polymorphismus.

Abb. 19 Elektropherogramm des Patienten Nr. 8 mit rs28371763 als Variante: Der Kreis im Zentrum der Abbildung zeigt die Position von rs28371763. Die Farbe Rot steht für Thymin, Grün für Adenin. Als Mehrdeutigkeitskode wird der Buchstabe „W“ benutzt.

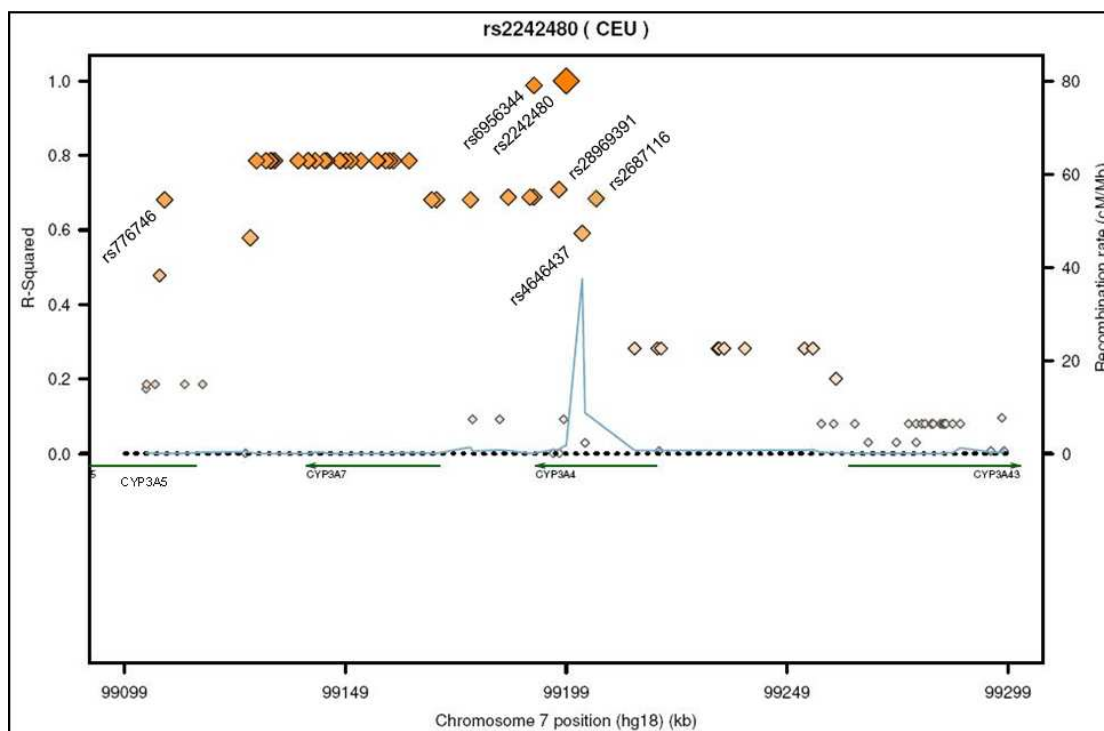


3.2.3.2.6 LD-Analysen für die identifizierten Cyp3A4-Varianten

Die Informationen über die LD-Verhältnisse wurden der „HapMap“-Referenzpopulation entnommen [97]. Die Analyse wurde durchgeführt, um die identifizierten Varianten untereinander bzw. mit weiteren SNPs aus Sequenzen, die nicht in dieser Arbeit sequenziert wurden, in einen Kontext zu bringen. Varianten, die auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit identifiziert wurden, sind der besseren Zuordnung wegen in diesem Kapitel **fett** gedruckt. Im Zuge der LD-Analysen konnten mehrere Varianten ermittelt werden, die mit **rs2242480** in LD stehen. Hierbei handelt es sich um die Varianten rs6956344 [117], **rs4646437** [115], **rs2687116** [114], rs28969391 [118] und rs776746 [119]. Die Abbildung 20 zeigt und erläutert die LD-Beziehungen der Varianten. Die rs6956344-Variante befindet sich in einem für die vorliegende Arbeit nicht sequenzierten Areal und zeigt in Bezug auf **rs2242480** ein hohes Kopplungsungleichgewicht ($r^2=1,0$). In der Abbildung 20 wird auch das LD-Verhältnis von **rs2242480** zu rs776746 in Cyp3A5 illustriert ($r^2= 0,68$). Der r^2 -Wert für die in der Arbeit identifizierten SNPs **rs4646437** und **rs2242480** liegt bei 0,591 (r^2). Das LD-Verhältnis von **rs2242480** zu **rs2687116** wird laut „Ensembl“ mit $r^2=0,652$ beziffert. Rs28969391 liegt zwar im für diese Arbeit sequenzierten Bereich, konnte aber bei keinem Kollektivpatienten nachgewiesen werden. Das Kopplungsungleichgewicht von **rs2242480** zu rs28969391 wird mit $r^2=0,732$ angegeben. Auffällig sind auch die

zahlreichen SNPs im Bereich von Cyp3A7, die sich in LD mit **rs2242480** befinden. Außerdem sind in der Abbildung 20 Informationen über die Rekombinationsrate im Bereich der SNPs enthalten. So befindet sich **rs4646437** in einem Areal mit einer Rekombinationsrate von 37,52 cM/mM.

Abb. 20 LD Cyp3A4 (100 kb-Fenster, modifiziert) nach [100]: Der Plot zeigt die LD-Informationen für **rs2242480**, **rs4646437**, rs6956344, **rs2687116**, rs28969391 und rs776746. Die LD-Informationen für die gezeigten Varianten wurden der HapMap-CEU-Population (Release 22) entnommen. Im unteren Teil der Abbildung ist die genomische Position angegeben (100 kb-Fenster). Der grüne Streifen markiert die Position von Cyp3A4. Die orangefarbenen Vierecke markieren die Position der SNPs. Die Skala der r^2 -Werte für die Beschreibung der LD-Beziehungen ist auf der linken Seite des Plots angegeben. Für weitere Erläuterungen zum Plot s. Abb. 12. In diesem Plot soll besonderes Augenmerk auf das LD-Verhältnis von **rs2242480** zu rs776746 ($r^2 = 0,68$) gerichtet werden. Rs776746 befindet sich im Bereich von Cyp3A5. Die Position der unterschiedlichen Gene wird durch den grünen Strich unterhalb der gekennzeichneten Variante wiedergegeben. **Rs2687116**, rs28969391 und rs6956344 befinden sich nicht in der Datenbank des SNAP-Programms. Allerdings konnte über die Ensembl-Datenbank eine LD-Information bezüglich der Variante ausgemacht werden, sodass **rs2687116**, rs28969391 und rs6956344 vom Autor in die Grafik eingefügt werden konnten. Der r^2 -Wert für **rs2242480** zu rs6956344 beträgt laut Ensembl 1,0, der von **rs2687116** zu **rs2242480** liegt bei $r^2=0,652$ und der von rs28969391 zu **rs2242480** liegt bei 0,732 [72].



3.3 Zusammenfassung der Phänotypisierung und der Genotypisierung

In den Kapiteln 3.1 und 3.2 wurde die Phänotypisierung und die Genotypisierung ausführlich beschrieben. Die Tabelle 15 fasst die Daten zusammen und gibt so einen umfassenden Überblick über die Verteilung der Merkmale auf die einzelnen Kollektivpatienten.

Tab. 15 Zusammenfassung der Phänotypisierung und der Genotypisierung

Nr. Kollektivpatient	Phänotypisierung													Genotypisierung									
	Alter [Jahre]	Geschlecht [w/m] *1)	body-mass-index [BMI in kg/m²]	positive Familienanamnese (KHK)	Diabetes mellitus [f/n] *2)	Hypercholesterinämie	Ejektionsfraktion [%]	Nikotinkonsum	Statin *3)	Protonenpumpeninhibitor *3)	BMS/DES	Clopidogrel *3)	ASS *3)	Zeitspanne [Tage] *4)	P2RY12			Cyp3A4					
															rs1491974	rs3821667	rs6785930	rs6809699	rs4987159	rs2687116	rs4646437	rs2242480	rs28371763
1	63	m	23,8	x	j	x	54,0			x	k.A.	x	x	3	x		x						
2	72	w	28,0	x	j	x	52,5			x	k.A.	x	x	4		x		x			x		
3	68	m	30,1		j		35,0	x	x		DES	x	x	7			x						
4	60	m	27,0		n	x	45,0	x	x	x	DES	x	x	8	x	x							
5	73	m	21,0		n	x	15,0	x			k.A.	x	x	19	x	x							
6	64	m	25,6	x	j	x	k.A.	x	x		k.A.	x	x	8	x	x							
7	41	m	28,4	x	n	x	35,0	x	x	x	BMS	x	x	48	x	x							
8	74	m	25,6		n		k.A.	x*5)			k.A.	x	x	280									x
9	65	w	k.A.		j	x	k.A.		x	x	BMS	x	x	8			x						
10	41	w	31,1		n	x	41,0	x	x	x	DES	x	x	11							x	x	
11	43	m	26,5		n	x	33,0	x	x	x	BMS	x	x	8	x	x					x	x	
12	76	m	k.A.		n	x	35,0		x		DES	x	x	12			x				x	x	
13	59	m	k.A.		n	x	k.A.		x	x	BMS	x	x	37	x								
14	56	m	29,6	x	j	x	25,0	x	x	x	DES	x	x	13			x						
15	55	w	27,8		j	x	46,0	x		x	k.A.	x	x	6	x								
60,7			27,0				37,9							31,5	Mittelwert								
	4w/11m			5	7j/8n	13		9, 1*5)	10	10	4BMS/5DES	15	15		Summe								

x = trifft auf Patient zu

--- = trifft auf Patient nicht zu bzw. Information war der Patientenakte nicht zu entnehmen

k.A. = keine Angabe in Patientenakte

*1) w = weiblich, m = männlich

*2) j = ja, n = nein

*3) Einnahme zum Zeitpunkt der Stentthrombose

*4) Zeitspanne zwischen Stentimplantation und Stentthrombose in Tagen

*5) ehemaliger Nikotinkonsument

4. Diskussion

Das Auftreten von Stentthrombosen als Folge einer Clopidogrel-Resistenz ist ein wichtiges Thema für die interventionelle Kardiologie. Um die Thematik weiter zu beleuchten, wurden für die vorliegende Arbeit ca. 6000 PTCA-Befunde gelesen und mit Blick auf Stentthrombosefälle untersucht. Insgesamt wurden so 15 Stentthrombose-Patienten (16 Fälle) eindeutig identifiziert und durch zwei interventionelle Kardiologen anhand der PTCA-Filme validiert. Anhand der Akten der 15 eindeutig Clopidogrel-resistenten Stentthrombosepatienten (s. Kap. 2.6.1) wurde ein Profil der Medikation erstellt und eine Phänotypisierung durchgeführt. Im Rahmen des Cardiogenics-Projekts der Medizinischen Klinik II am UK-SH Campus Lübeck lag Leukozyten-DNA der 15 Patienten vor. Für die vorliegende Arbeit wurden alle Exon-Sequenzen mit den angrenzenden intronischen Abschnitten der P2RY12- und Cyp3A4-Gene genotypisiert.

4.1 Phänotypisierung und Medikation

Die Stentthrombosefälle wurden eindeutig identifiziert, validiert und erfüllten die Diagnosekriterien des „academic research consortium“ (ARC) [5]. Mechanische Ursachen der Stentthrombosen wurden im Zuge der Validierung ausgeschlossen.

4.1.1 Phänotypisierung des Patientenkollektivs

Bei der Profilerstellung für die 15 Stentthrombosepatienten fielen verschiedene Charakteristika hinsichtlich der Diagnosen auf: Alle Patienten litten unter einer KHK mit Hypertonus, die den Eingriff der PTCA mit Stenting erst nötig gemacht hatten. Von den 15 Patienten des Kollektivs waren 7 an einem Diabetes mellitus erkrankt. Bei Patienten mit einem Diabetes mellitus treten Stentthrombosen häufiger auf [8], da bei ihnen die Thrombozytenaktivierung generell erhöht ist. Wie stark der Einfluss des Diabetes mellitus bei der Entstehung der Stentthrombosefälle im Kollektiv war, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht und kann daher nicht benannt werden. Das Vorliegen eines Diabetes mellitus kann allerdings als Ursache für eine Stentthrombose nicht allzu relevant sein, da eine Vielzahl der Patienten, die infolge

eines Herzinfarktes einen Stent erhalten, auch an Diabetes erkrankt sind. Wenn die generell erhöhte Thrombozytenaktivierung bei Diabetes mellitus an sich regelhaft eine Stentthrombose verursachen würde, müsste die Inzidenz der Stentthrombose deutlich höher ausfallen (s.a. Kap. 1.2.1). Auch ein erhöhter BMI kann mit einer Clopidogrel-Resistenz assoziiert sein [58]. Allerdings wiesen die Patienten im Kollektiv unterschiedliche BMI-Werte auf (s. Tab. 10 und 15). Der durchschnittliche BMI lag bei 27 kg/m^2 und somit im Bereich von Übergewichtigen. Die hohe Streuung des BMI ($21\text{-}31,1 \text{ kg/m}^2$) spricht jedoch nicht für eine klare Assoziation des Wertes mit der Stentthrombose. Trotzdem kann der hohe BMI bei einigen Patienten im Kollektiv durch ein erhöhtes Verteilungsvolumen durchaus mit einer daraus resultierenden Unterdosierung von Clopidogrel verbunden gewesen sein. Eine Assoziation der Stentthrombose mit einer niedrigen Ejektionsfraktion und einem hohen Alter wurde in der Literatur gezeigt [9, 10]. Auch für diese Werte zeigten sich im Kollektiv Streuungen der Patientenwerte (Alter: 41-72 Jahre, Ejektionsfraktion 15-55%; s.a. Tab. 10 und 15), sodass auch hier keine klaren Bezüge präsentiert werden können. Auch eine Überlegung dahingehend, dass eine genetische Prädisposition für die Clopidogrel-Resistenz speziell bei jüngeren Patienten gegenüber anderen Kriterien relevanter sein könnte, konnte am Kollektiv nicht belegt werden. Allerdings sind immerhin drei der 15 Kollektivpatienten ungewöhnlich jung (Patienten 7 und 10 waren 41 und Patient 11 war 43 Jahre alt; s.a. Tab. 10 und 15), sodass die jüngeren Patienten im Kollektiv ungewöhnlich stark vertreten sind (20%). Dennoch liegt das mittlere Alter der Patienten bei 60,7 Jahren und damit wiederum im Bereich von KHK-Patienten. Aufgrund der inkompletten Informationen über die verwendeten Stenttypen (DES vs. BMS; s. Tab 10 und 15) im Patientenkollektiv, kann keinerlei Aussage über einen Zusammenhang des Stenttypen mit dem Auftreten einer Stentthrombose gemacht werden. Im Kollektiv war bei DES-Patienten der Zeitraum von der Stentimplantation bis zur Stentthrombose tendenziell kürzer als bei BMS-Patienten (Tage bis Stentthrombose; s. Tab. 10 und 15). Aufgrund der wenigen Patienten (4 BMS und 5 DES) lassen sich diesbezüglich jedoch keine aussagekräftigen Rückschlüsse ziehen. Augenfällig ist die kurze Zeitspanne von der Stentimplantation bis zur Stentthrombose, die minimal 3 Tage und maximal 48 Tage betrug (durchschnittlich 13,7 Tage; Ausnahme: Patient 8 = 280 Tage). Dieser Sachverhalt spricht für eine tatsächliche Clopidogrel-Resistenz bei diesen Patienten, da gerade in der Frühphase

nach einer Stentimplantation der Fremdkörper und die Gefäßwandverletzung eine thrombogene Wirkung (s. Kap. 1.1.1) haben und der Stent noch keiner nennenswerten Endothelialisierung unterliegen dürfte. Diese Beobachtung unterstreicht die Qualität der Auswahl der Kollektivpatienten als solche mit einer tatsächlichen Clopidogrel-Resistenz.

4.1.2 Medikamenteninteraktion

Clopidogrel wird Cytochrom-P450-abhängig aktiviert. Den größten Anteil an dieser Aktivierung hat das Cyp3A4-Isoenzym. Allerdings spielen auch Cyp2C19 und Cyp3A5 für die Metabolisierung des Medikaments eine Rolle. Unter den im Patientenkollektiv eingenommenen Medikamenten befanden sich neben Clopidogrel Präparate, die ebenfalls über das Cyp3A4-Isoenzym metabolisiert werden. So nahmen 10 Patienten im Kollektiv Cyp3A4-abhängige Statine ein (s. Tab. 10 und 15). Über den Einfluss der Interaktion am Cyp3A4-Isoenzym durch die gleichzeitige Einnahme von Statinen und Clopidogrel auf die Thrombozytenaggregationshemmung wird widersprüchlich diskutiert [47, 48, 56]. Eine weitere Interaktion am Cyp3A4 ist durch die Einnahme von Protonenpumpeninhibitoren („PPI“, 10 Patienten; s.a. Tab. 10 und 15) denkbar. PPIs sind wie Clopidogrel auch Substrate von Cyp2C19 (s. Kap. 1.2.3.2). Auch an dieser Stelle ist die Information über die Relevanz der Interaktion nicht eindeutig. Eine kürzlich veröffentlichte Studie (n=13608) konnte ein verzögertes Ansprechen der „loading-dose“ bei der gleichzeitigen Einnahme von Clopidogrel und PPIs für die Thrombozytenaggregation zeigen [55]. Bei den primären Endpunkten ergaben sich allerdings keine Unterschiede für die Patienten, sodass diese Interaktion am Cyp2C19 nicht überbewertet werden sollte. Auch für die Patienten des Kollektivs kann über die Bedeutung einer Verabreichung bzw. der Dosierung einer „loading dose“ (Clopidogrel) für die Vermeidung einer Stentthrombose, aufgrund der unvollständigen Informationen aus den Patientenakten (Gabe einer „loading dose“ von 600 mg nur bei Pat. 3, 5, 12 gesichert), keine Aussage getätigt werden.

4.1.3 Compliance der Patienten

Die Compliance der Stentthrombosepatienten des Kollektivs wurde in den Akten durch die behandelnden Ärzte nicht kommentiert. Natürlich muss zunächst davon

ausgegangen werden, dass die Patienten den ärztlichen Anordnungen Folge leisteten. Allerdings kann eine unzureichende Compliance der Patienten mit einer unzureichenden Thrombozytenaggregationshemmung und einer Stentthrombose als Folge nicht vollends ausgeschlossen werden.

4.2 Genotypisierung

Die P2RY12- und Cyp3A4-Gene wurden amplifiziert und anschließend sequenziert (Genotypisierung). Die so erlangten Sequenz-Informationen wurden auf Gen-Varianten untersucht. Die identifizierten Gen-Varianten wurden in ihrer Funktion charakterisiert. Die neun identifizierten SNPs haben allesamt keinen verifizierbaren direkten Einfluss auf das Genprodukt der sequenzierten Gene. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine Identifikation neuer oder bekannter Varianten mit einer direkten Funktionsbeeinträchtigung gelungen ist, wurden die bekannten ermittelten SNPs beschrieben und charakterisiert. So konnten durch die Verwendung verschiedener Methoden einige Aussagen über bereits ermittelte Assoziationen (z.B. über LD-Analysen) der identifizierten Varianten bzw. über evolutionär relevante Sequenzen getätigt werden. Aufgrund des kleinen Kollektivs (n=15) können allerdings keine abschließenden Aussagen über eine Signifikanz der einzelnen Varianten in Bezug auf eine Clopidogrel-Resistenz mit Stentthrombose als Folge gemacht werden. Dennoch soll im Folgenden über die ggf. bestehende Relevanz der identifizierten Gen-Varianten der Genotypisierung diskutiert werden.

4.2.1 Identifikation von Gen-Varianten in P2RY12

4.2.1.1 Varianten in Exon-Bereichen

Die identifizierten exonischen Varianten (rs6785930 (Pat. 3-6, 12, 14), rs6809699 (Pat. 1, 9, 11), rs3821667 (Pat. 1, 9, 11; s.a. Kap. 4.2.1.3 und Tab. 15) haben auf den ersten Blick keine Auswirkung auf das Genprodukt. Bei rs6785930 und rs6809699 (beide Exon 3) handelt es sich um silente SNPs, und rs3821667 befindet sich im 5'-UTR-Bereich des Gens. Allerdings konnte im spezieübergreifenden BLAT-Homologieabgleich von rs3821667 (s. Abb. 9) eine aufschlussreiche Beobachtung gemacht werden: Diese Variante befindet sich zwischen zwei hochkonservierten

Arealen im 5'-UTR-Bereich von P2RY12. UTR-Bereiche können die Stabilität der mRNA beeinflussen. Außerdem enthalten UTR-Bereiche Informationen für die Initiierung bzw. regulatorische Elemente für die Translation. Die Position des SNPs zwischen zwei hochkonservierten Arealen spricht für eine Sequenz von größerer Bedeutung für die Verarbeitung der späteren mRNA. Allerdings sind hier nähere Aussagen über die konkrete Funktion der Variante nicht möglich.

4.2.1.2 Variante im Intron-Bereich

Bei der Sequenzierung von P2RY12 konnte mit rs1491974 (Pat. 4-7, 11, 13, 15) eine Variante im Intron von Exon 1 des Gens identifiziert werden. Die Variante hat keinen Einfluss auf Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren oder auf Spleiß-Enzyme. Allerdings konnte bei rs1491974 im Zuge der Homologieanalyse mittels BLAT gezeigt werden, dass sich der SNP direkt vor einem hochkonservierten Areal befindet (s. Abb. 7, Kap. 3.2.3.1.1). Der nachfolgenden Sequenz muss also eine evolutionär relevante Funktion zukommen. Da die Funktion intronischer Sequenzen derzeit noch nicht vollends verstanden ist, kann an dieser Stelle keine abschließende Aussage zur Bedeutung dieser Beobachtung bzw. zur Funktion der Sequenz und der Variante getätigt werden.

4.2.1.3 LD-Analysen

Bei der LD-Analyse für die identifizierten SNPs im Bereich von P2RY12 wurde Folgendes beobachtet: Die bei den Patienten 1, 9 und 11 jeweils identifizierten Varianten rs3821667 und rs6809699 befinden sich in LD ($r^2=1,0$). Außerdem konnte ein LD-Verhältnis zu zwei weiteren P2RY12-Varianten (rs1388626 und rs2046934), die sich nicht im für die vorliegende Arbeit sequenzierten Areal befinden, ermittelt werden. Diese Beobachtung ist im Hinblick auf bereits publizierte Literatur äußerst bemerkenswert. Der von Fontana et al. (n=98) etablierte H2 enthält auch die Variante rs6809699 [62], sodass Beobachtungen bezüglich H2 auch auf Träger der Variante und den zu dieser Variante in LD stehenden SNPs übertragen werden können. Die übrigen dem H2 zugehörigen Varianten konnten nicht identifiziert werden, da sie sich in Arealen befinden, die für diese Arbeit nicht sequenziert wurden. Aufgrund des gezeigten starken LD-Verhältnisses ($r^2=1,0$) der H2-Varianten kann davon ausge-

gangen werden, dass Träger von rs6809699 und rs3821667 (nicht im von Fontana beschriebenen H2, aber LD=1,0 zu H2-Varianten, s.a. Abb. 12) auch Träger der übrigen SNPs sind. Im Kollektiv sind 3 Patienten (1, 9, 11) Träger beider SNPs. Im Hinblick auf die Clopidogrel-Resistenz handelt es sich bei H2 um einen durchaus beachtenswerten Haplotypen. Im Vergleich zu Nicht-Trägern unterliegen Träger von H2 laut Fontana et al. einer erhöhten Thrombozytenaktivierung durch ADP [62]. Diese Beobachtung eines „gain of function“-Gens könnte das verminderte Ansprechen von Clopidogrel am P2RY12 erklären. So kann diskutiert werden, ob H2 zu einer relativen Clopidogrel-Resistenz führt, bei der beispielsweise mehr Rezeptoren exprimiert werden als bei Nicht-Trägern und somit die Standard-Dosis an Clopidogrel nicht ausreicht, um eine genügende Thrombozytenaggregationshemmung zu bewirken. Allerdings konnte in einer größeren Untersuchung mit PTCA-Patienten (n=416) die Assoziation von H2 mit einer erhöhten Thrombozytenaktivierung nicht bestätigt werden [65]. Auch die Thrombozytenaggregationshemmung unter einer hohen „loading dose“ Clopidogrel (600 mg) blieb in der Studie bei H2-Trägern unbeeinflusst. Die Überlegung, ob H2-Träger einer generell erhöhten Thrombozytenaktivierung mit relativer Clopidogrel-Resistenz unterliegen, kann aufgrund dieser widersprüchlichen Publikationen und im Rahmen dieser Arbeit nicht hinreichend geklärt werden, scheint aber gerechtfertigt.

Malek et al. präsentierten in ihrer Arbeit Ergebnisse, die für eine Assoziation von mehreren koexistenten SNPs mit der Clopidogrel-Resistenz sprechen [53]. So hatten gleichzeitige Träger von rs6809699 und einem SNP in Cyp2C19 (s.a. Kap. 1.3.1) eine höhere Thrombozytenaktivität unter Clopidogrel als Nicht-Träger oder Träger jeweils nur einer Variante. Die Arbeit verdeutlicht den möglicherweise vorhandenen additiven Einfluss verschiedener Polymorphismen auf die Wirkung von Clopidogrel. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass eine breiter angelegte Betrachtungsweise für die Erklärung der Clopidogrel-Resistenz erfolgversprechend sein könnte (s. Kap. 4.3).

Thrombotische Ereignisse im Zuge einer Arteriosklerose (z.B. Myokardinfarkte) können durch erhöhte Thrombozytenaktivierung bedingt sein. Fontana et al. zeigten in einer Fall-Kontroll-Studie die Assoziation des H2 mit der Arteriosklerose [63]. Aller-

dings konnten Zee et al. in ihrer Studie keinerlei Assoziationen des H2 mit thrombotischen Ereignissen wie Myokardinfarkten, Schlaganfällen und tiefen Venenthrombosen [66] nachweisen. Auch anhand dieser Untersuchungen bleibt eine Aussage über die Auswirkung des H2 auf thrombotische Ereignisse, die mit einer erhöhten Thrombozytenaktivierung einhergehen, schwierig.

Stellvertretend für H2 wurden auch anhand des Beispiels von rs6785930 in bisherigen Publikationen Aussagen mit Relevanz für die Erklärung der Clopidogrel-Resistenz getätigt. So zeigte die Arbeit von Ziegler et al., dass heterozygote Träger von rs6785930 ein 4,02-fach erhöhtes Risiko für neuro-vaskuläre Ereignisse hatten [67]. Allerdings wurde für den SNP rs6785930 kein Einfluss auf die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation ermittelt [62, 65, 68]. Dass die erhöhte neuro-vaskuläre Ereignis-Rate bei rs6785930-Trägern auf eine durch die Variante bedingte erhöhte Thrombozytenaktivierung mit relativer Clopidogrel-Resistenz zurückzuführen ist, erscheint dadurch fragwürdig.

4.2.2 Identifikation von Gen-Varianten in Cyp3A4

4.2.2.1 Varianten in Exon-Bereichen

Die beiden im Cyp3A4 identifizierten exonischen Varianten rs4987159 (Pat. 2; Exon 7) und rs28371763 (Pat. 8; Exon 13) kodieren synonym im Genprodukt und haben daher zunächst keine Auswirkung auf die Funktion des Enzyms. Die rs28371763-Variante befindet sich im 3'-UTR Bereich des Gens, liegt aber nicht im Bindungsbereich bekannter micro-RNA. Allerdings steigt die Zahl bekannter mirco-RNAs an, weshalb ein möglicher Einfluss der Variante auf Bindungsstellen von bisher unbekannten micro-RNAs mit regulierender Funktion für die Gen-Expression nicht auszuschließen ist.

4.2.2.2 Varianten in Intron-Bereichen

Die identifizierten intronischen Varianten rs2687116 (Pat. 2, 10, 11; Intron 7), rs4646437 (Pat. 2, 10; Intron 8) und rs2242480 (Pat. 2, 10, 11; Intron 10) liegen nicht in Sequenzen, die als Bindungsstellen bekannter Transkriptionsfaktoren dienen. Ferner kommt den SNPs keine Bedeutung für das Zustandekommen neuer Spleiß-

Varianten des Proteins zu. Rs2242480 liegt nur 12 Basen stromabwärts von Exon 10 des Cyp3A4. Im speziesübergreifenden Homologieabgleich mittels BLAT (s. Abb. 18, Kap. 3.2.3.2.4) befindet sich die Variante in der Nähe eines hochkonservierten Areals, dem Exon 10. Die Konservierung endet in diesem Bereich nicht abrupt mit dem Ende des Exons, sondern setzt sich noch abgeschwächt bis zur Variante fort. Ob der Variante durch das angrenzende konservierte Areal eine besondere Funktion zukommt, kann an dieser Stelle nicht ermittelt werden, ist aber denkbar. Allerdings geht dieser Ansatz über den derzeitigen Wissensstand bezüglich der Regulation der Genexpression hinaus. Dennoch scheint der sich dem Exon anschließenden Sequenz mit der Variante eine evolutionäre Relevanz zuzukommen.

Die in der vorliegenden Arbeit identifizierte Variante rs2242480 konnte in einer Studie in Assoziation mit einer verminderten GP-IIb/IIIa-Expression (s.a. Abb. 1, Kap. 1.2) unter Clopidogrel gebracht werden [83]. Dieser Einfluss konnte insbesondere für die ersten 24 Stunden nach einer „loading-dose“ von 300 mg gezeigt werden. Allerdings wurde dieser Effekt nur für die GP-IIb/IIIa-Expression und nicht für die ADP-Induktion gezeigt. Auch konnte kein Einfluss der Variante auf die generelle ADP-induzierte Thrombozytenaggregation präsentiert werden. Die Arbeit impliziert jedoch, dass genetische Varianten einen Einfluss auf die Parameter der Thrombozytenaggregation (z.B. GP-IIb/IIIa-Expression) haben können. Andere Studien versuchten, rs2242480 einen Einfluss auf das ADP-induzierte Thrombozytenaggregationsprofil unter Clopidogrel nachzuweisen. Zwei Studien mit einem ähnlichen Design konnten hingegen keinen Effekt der Variante auf die ADP-Induktion der Thrombozytenaggregation verzeichnen [51, 84]. Der Einfluss der Variante bleibt also fraglich und würde nur ein verbessertes Ansprechen von Clopidogrel, nicht jedoch die Clopidogrel-Resistenz erklären.

Für rs4646437 wurde eine Assoziation mit einem erhöhten Ciclosporinbedarf in der Immunsuppression bei nierentransplantierten Trägern der Variante ausgemacht [80]. Auch Ciclosporin wird Cyp3A4-abhängig metabolisiert [76]. In der Studie von Crettol et al. lag der Bedarf für Ciclosporin bei Trägern von rs4646437 während des gesamten Jahres höher als bei Nicht-Trägern. Die Beobachtung kann aufgrund der angestellten Analysen bezüglich der intronischen Variante auf Basis von heutigem

Wissen nicht begründet werden. Ggf. kann dieser erhöhte Bedarf der Ciclosporin-Medikation auf eine verminderte Aktivität des Cyp3A4-Enzyms zurückgeführt werden und könnte dann auch in Bezug auf Clopidogrel einen Erklärungsansatz für die Clopidogrel-Resistenz liefern (im Kollektiv Pat. 2, 10).

4.2.2.3 LD-Analysen

Für die identifizierten Varianten im Cyp3A4-Gen der Stentthrombosepatienten konnten verschiedene Aussagen über LD-Verhältnisse gemacht werden. Die in Abbildung 20 (Kap. 3.2.3.2.6) dargestellten Kopplungsungleichgewichtsverhältnisse der identifizierten Varianten zueinander und zu anderen, nicht identifizierten SNPs, wurden in ähnlicher Weise von Loukola et al. beschrieben [82]. So wird dem „Haplotype 4“ (u.a. rs2687116, rs2242480 und rs6956344 [rs6956344 liegt nicht im genotypisierten Areal der vorliegenden Arbeit], s.a. Kap. 3.2.3.2.6) eine inverse Assoziation mit einer niedrigen Aggressivität von Prostatakrebs zugeschrieben. In der Arbeit wird argumentiert, dass die Entstehung von Prostatakrebs direkt von der Menge an aktiviertem Testosteron abhängig ist. Da Cyp3A4 an der Deaktivierung von Testosteron beteiligt ist, könnte bei Vorliegen der Varianten des „Haplotype 4“ eine verminderte Deaktivierung des Hormons die Ausbildung eines Prostatakrebses begünstigen. Unter der Annahme, dass Loukolas „Haplotype 4“ eine verminderte Cyp3A4-Aktivität aufweist, kann u.U. geschlossen werden, dass gerade die Varianten-Kombination des „Haplotype 4“ auch für eine verminderte Clopidogrel-Aktivierung verantwortlich sein kann. Somit könnten die im Patientenkollektiv ermittelten Varianten rs2687116 und rs2242480 bei den Trägern zu einer Clopidogrel-Resistenz mit nachfolgender Stentthrombose geführt haben.

Clopidogrel wird neben Cyp3A4 auch durch Cyp3A5 aktiviert [48]. Mit der Darstellung des LD-Verhältnisses von rs2242480 (Cyp3A4; Pat. 2, 10, 11) zu rs776746 (Cyp3A5; $r^2=0,68$; s.a. Abb. 20) konnte ein Bezug zu einer aufschlussreichen Arbeit hergestellt werden: Cyp3A5*3 (rs776746) führt zu einer bekannten Spleiß-Variante mit eingeschränkter Aktivität des Enzyms [79]. Das LD-Verhältnis der beiden Varianten ist nicht außergewöhnlich stark ($r^2=0,68$). Allerdings kann argumentiert werden, dass die beiden SNPs häufiger zusammen vererbt werden als andere Varianten. Auch wenn die Aktivität von Cyp3A4 durch das Vorliegen von rs2242480 nicht weiter beeinflusst

wird, so könnte ein gleichzeitiges Vorliegen von rs776746 in einer insgesamt niedrigeren Aktivität des Cytochrom-P450-Systems resultieren. Dass rs776746 mit einem erhöhten Risiko für thrombotische Ereignisse assoziiert ist, konnte bereits gezeigt werden [54] und scheint die Relevanz des LD-Verhältnisses von rs2242480 zu rs776746 für die Erklärung der Clopidogrel-Resistenz zu bestätigen.

Augenfällig ist, dass die bereits in der Literatur diskutierten Polymorphismen nicht nur im Patientenkollektiv identifiziert wurden, sondern dass einige Patienten gleich mehrere Polymorphismen aufweisen, auch solche, die nicht miteinander in LD stehen. So weist beispielsweise Patient 2, der gleich zweifach eine Stentthrombose erlitt, neben den untereinander in LD stehenden Varianten (rs2242480, rs4646437, rs2687116) noch einen weiteren SNP auf (rs4987159), der im Patientenkollektiv nur bei ihm festgestellt wurde. Ob das gleichzeitige Vorliegen dieser 4 Varianten im Cyp3A4 für die Clopidogrel-Resistenz eine Rolle spielt und ggf. einen additiven Effekt bei der verminderten Wirkung des Clopidogrels hat, wie er von Malek et al. für Varianten im P2RY12-Gen diskutiert wurde [53], kann hier nicht entschieden werden und wurde auch in der Literatur noch nicht diskutiert, erscheint aber denkbar. Inwieweit ein Augenmerk auf die Anzahl der identifizierten Varianten pro Patient gelegt werden muss, kann auch für den Patienten 11 diskutiert werden. Neben den o.g. in der Literatur bereits etablierten Auswirkungen der bei Patient 11 festgestellten Varianten im P2RY12 (rs3821667 und rs6809699 [untereinander in LD]; zusätzlich rs1491974) und im Cyp3A4 (rs2687116 und rs2242480 [ebenfalls in LD]), stellt sich die Frage, ob das gleichzeitige Vorliegen aller identifizierten Varianten in beiden genotypisierten Genen bei Patient 11 insgesamt zu einer Clopidogrel-Resistenz beitragen kann. Diese Überlegung kann im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht belegt werden und müsste durch weitere Untersuchungen überprüft werden.

4.3 Ausblick

Das Problem der Clopidogrel-Resistenz mit Stentthrombose als phänotypisches Korrelat ist nach wie vor aktuell. Um die Nachsorge von PTCA-Patienten zu verbessern und damit gefährliche thrombotische Komplikationen zu vermeiden, sollten weiterhin Anstrengungen unternommen werden, die Clopidogrel-Resistenz zu erklären. Größer

angelegte Studien mit einem optimierten Design für Phänotypisierung einschließlich Medikation und Genotypisierung wären für die Erlangung einer adäquaten Erklärung der Clopidogrel-Resistenz angebracht.

Um die Identifikation von Stentthrombosen für eine Fortführung der vorliegenden Arbeit zu erleichtern, wäre die weitere Computerisierung des Befundsystems des UK-SH Campus Lübeck sinnvoll. Hierbei würde eine Suchfunktion für Diagnose-Begriffe wie „Stentthrombose“ eine Erleichterung mit Zeitersparnis bedeuten.

Für die erweiterte Phänotypisierung der Patienten in Bezug auf die Cyp3A4-Aktivität käme ein Erythromycin-Atem-Test in Frage, der bereits für Studien mit dem Ziel der Identifikation von Medikamenteninteraktionen verwendet wurde [47, 49]. Stentthrombosepatienten könnten nach erfolgreicher Therapie mit Hilfe des Erythromycin-Atem-Tests so auf die Cyp3A4-Aktivität geprüft werden. Die daraus entstehenden Befunde könnten mit einem später zu ermittelnden Genotyp korreliert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden Stentthrombosen als phänotypisches Korrelat für die Clopidogrel-Resistenz verwendet. Alle übrigen Faktoren, die eine Stentthrombose hätten verursachen können, wurden weitestgehend ausgeschlossen. Dennoch bleibt eine Unsicherheit, ob die Patienten reell Clopidogrel-resistent gewesen sind oder ob andere Faktoren (z. B. erhöhte Thrombozytenaktivierung bei Diabetes mellitus) die Stentthrombose auslösten. Um diese Unsicherheit zu vermeiden, könnten bei Stentthrombosepatienten eine Thrombozytenaggregationstestung unter Clopidogrel durchgeführt werden, um so Clopidogrel-resistente von nicht-resistenten Patienten zu trennen. In Studien mit ähnlichen Ansätzen wurden unterschiedliche Testverfahren verwendet [6, 36-43]. Die tatsächlich Clopidogrel-resistenten Patienten würden für weitere Untersuchungen mit einer Genotypisierung aller Cytochrom-P450-Enzyme, die bei der Clopidogrel-Aktivierung eine Rolle spielen, in Frage kommen.

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 9 identifizierte Varianten in P2RY12 (4 Varianten) und Cyp3A4 (5 Varianten) hinsichtlich ihres möglichen Einflusses bei der Entstehung der Clopidogrel-Resistenz diskutiert. Malek et al. zeigten, dass möglicherweise nicht ein einzelner SNP, sondern mehrere simultan vorliegende Varianten

in verschiedenen Genen die Clopidogrel-Resistenz erklären könnten (s.a. Kap. 4.2) [53]. Diese Möglichkeit wird durch additive Effekte der SNPs auf die Wirkung bzw. Nicht-Wirkung (Resistenz) erklärt. Um diesen möglichen Additionseffekt mehrerer SNPs zu klären, müssten Stentthrombosepatienten hinsichtlich ihrer ADP-induzierten Thrombozytenaggregation getestet und anschließend genotypisiert werden. Eine Zuordnung der Phänotypen (Thrombozytenaggregation) zu den jeweils ermittelten Genotypen wäre dann möglich.

In der näheren Vergangenheit sind durch neue Techniken große Fortschritte in der Genetik erzielt worden. Durch sogenannte „Genome-Wide-Association“-Studien (GWA-Studien) ist es gelungen, in der Erforschung genetischer Ursachen der KHK Gen-Orte zu identifizieren, die die Erblichkeit einer KHK erklären könnten [120-123]. Eine GWA-Studie ist durch die fast gänzliche Sequenzierung des humanen Genoms charakterisiert. Die Methode benötigt sehr große Kollektive, um eine Assoziation von Gen-Varianten mit Erkrankungen berechnen zu können, sodass ein hoher Kostenaufwand resultiert. Erst kürzlich wurde die neuartige „Whole-Exome-Sequenzierung“ mittels „Next-Generation-Sequenzierung“ entwickelt [124-126]. Dieser Methode zugrundeliegend ist die Tatsache, dass nur 1 % des menschlichen Genoms alle proteinkodierenden Informationen und dabei geschätzte 85 % der krankheitsverursachenden Mutationen enthält. Die fokussiertere „Whole-Exome-Sequenzierung“ beschränkt sich auf genau diese relevantere Erbinformation, sodass das Verfahren rationaler und kosteneffizienter ist als die umfangreichere GWA-Studie und für deutlich kleinere Kollektive in Frage kommt. Somit eignet sich die „Whole-Exome-Sequenzierung“ für die zukünftige Untersuchung der Clopidogrel-Resistenz und die Aufdeckung neuer Gen-Varianten.

In der Vergangenheit wurden etliche Gen-Varianten als mögliche Ursachen der Clopidogrel-Resistenz diskutiert. Hierzu zählen neben den Gen-Varianten der in dieser Arbeit untersuchten Kandidatengene P2RY12 und Cyp3A4 z.B. auch Polymorphismen im Cyp2C19 [50-53] oder im Cyp3A5 [54]. Ob diese Gen-Varianten letztlich wirklich verantwortlich für eine Clopidogrel-Resistenz sind, bleibt weiter offen. Im Anschluss an eine umfassendere Phänotypisierung (s.o.) könnte eine „Whole-Exome-Sequenzierung“ auch die Relevanz der in der Literatur bereits diskutierten Clopido-

grel-Resistenz-Gene hinreichender klären und die Versorgung der Patienten so verbessern. In der Zukunft könnte sich so auch die Möglichkeit eines Screening-Verfahrens für Clopidogrel-resistente Patienten ergeben.

Seit Februar 2009 wurde mit Prasugrel ein neues Pharmakon aus der Gruppe der Thienopyridine für den europäischen Markt zugelassen. Eine Studie konnte bei 13608 Patienten eine höhere Effektivität in der Prävention von ischämischen Ereignissen belegen [18]. Ein Vorteil von Prasugrel konnte im Vergleich zu Clopidogrel auch in der Prävention von Stentthrombosen gezeigt werden [18, 19]. Es bleibt abzuwarten, ob Prasugrel aufgrund der gegenüber Clopidogrel verbesserten Eigenschaften (z.B. Vermeidung von Blutungen; Wirksamkeit) bzw. ohne ein Auftreten von „Prasugrel-Resistenzen“ die Versorgung der PTCA-Patienten verbessern und langfristig die Zahl an Stentthrombosen vermindern kann.

5. Zusammenfassung

Bei der Stentthrombose handelt es sich um eine fatale Komplikation der PTCA mit Stentimplantation. In der Kombination mit ASS soll Clopidogrel thrombotische Ereignisse wie die Stentthrombose verhindern. Allerdings kommt es trotz dieser Prophylaxe weiterhin zu Ereignissen wie der Stentthrombose, was häufig Myokardinfarkte und Todesfälle zur Folge hat. Ursächlich für die Stentthrombose wird u.a. eine unzureichende Wirkung von Clopidogrel angesehen (Clopidogrel-Resistenz).

Die vorliegende Arbeit sollte weitere Erklärungsansätze für die Clopidogrel-Resistenz am phänotypischen Beispiel von Stentthrombosen liefern. Für diesen Zweck wurden aus ca. 6000 Herzkatheterbefunden 16 Stentthrombosefälle bei 15 Patienten eindeutig identifiziert und mittels der Patientenakten phänotypisiert. Die DNA der Stentthrombosepatienten lag im Rahmen des Cardiogenics-Projekts der Medizinischen Klinik II des UK-SH Campus Lübeck vor, sodass die Kandidatengene P2RY12 und Cyp3A4 bei den Patienten genotypisiert werden konnten. Bei P2RY12 handelt es sich um einen ADP-Rezeptor auf der Thrombozytenoberfläche, der nach der Aktivierung durch ADP eine Thrombozytenaggregation bewirkt. Clopidogrel inhibiert P2RY12, sodass auf diesem Wege im Regelfall eine Thrombozytenaggregation unterbunden wird. Cyp3A4 ist vorwiegend in der Leber lokalisiert und wird für die Umwandlung von Clopidogrel in die aktive Form verantwortlich gemacht.

Im Zuge der Genotypisierung der Kollektivpatienten wurden insgesamt 4 intronische und 5 exonische Gen-Varianten identifiziert. Die identifizierten exonischen Gen-Varianten waren silent. Den intronischen Gen-Varianten konnte kein Einfluss auf Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, micro-RNAs oder Spleiß-Enzyme nachgewiesen werden. Über Kopplungsungleichgewichtsanalysen konnten die identifizierten Gen-Varianten sowohl untereinander als auch mit solchen Gen-Varianten assoziiert werden, die sich nicht in dem für die vorliegende Arbeit sequenzierten Areal befanden. Eine eindeutige Assoziation der identifizierten Gen-Varianten mit der Clopidogrel-Resistenz konnte nicht präsentiert werden. Allerdings konnte die Relevanz einiger identifizierter Gen-Varianten für die Clopidogrel-Resistenz diskutiert werden.

6. Literaturverzeichnis

- [1] King, S.B., 3rd, S.C. Smith, Jr., J.W. Hirshfeld, Jr., A.K. Jacobs, D.A. Morrison, D.O. Williams, T.E. Feldman, M.J. Kern, W.W. O'Neill, H.V. Schaff, P.L. Whitlow, C.D. Adams, J.L. Anderson, C.E. Buller, M.A. Creager, S.M. Ettinger, J.L. Halperin, S.A. Hunt, H.M. Krumholz, F.G. Kushner, B.W. Lytle, R. Nishimura, R.L. Page, B. Riegel, L.G. Tarkington, and C.W. Yancy, *2007 Focused Update of the ACC/AHA/SCAI 2005 Guideline Update for Percutaneous Coronary Intervention: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: 2007 Writing Group to Review New Evidence and Update the ACC/AHA/SCAI 2005 Guideline Update for Percutaneous Coronary Intervention, Writing on Behalf of the 2005 Writing Committee*. Circulation, 2008. **117**(2): S. 261-295.

- [2] Keeley, E.C., J.A. Boura, and C.L. Grines, *Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials*. Lancet, 2003. **361**(9351): S. 13-20.

- [3] Cutlip, D.E., D.S. Baim, K.K. Ho, J.J. Popma, A.J. Lansky, D.J. Cohen, J.P. Carrozza, Jr., M.S. Chauhan, O. Rodriguez, and R.E. Kuntz, *Stent thrombosis in the modern era: a pooled analysis of multicenter coronary stent clinical trials*. Circulation, 2001. **103**(15): S. 1967-1971.

- [4] Wiviott, S.D., E. Braunwald, C.H. McCabe, I. Horvath, M. Keltai, J.P. Herrman, F. Van de Werf, W.E. Downey, B.M. Scirica, S.A. Murphy, and E.M. Antman, *Intensive oral antiplatelet therapy for reduction of ischaemic events including stent thrombosis in patients with acute coronary syndromes treated with percutaneous coronary intervention and stenting in the TRITON-TIMI 38 trial: a sub-analysis of a randomised trial*. Lancet, 2008. **371**(9621): S. 1353-1363.

- [5] Cutlip, D.E., S. Windecker, R. Mehran, A. Boam, D.J. Cohen, G.A. van Es, P.G. Steg, M.A. Morel, L. Mauri, P. Vranckx, E. McFadden, A. Lansky, M. Hamon, M.W. Krucoff, and P.W. Serruys, *Clinical end points in coronary stent trials: a case for standardized definitions*. Circulation, 2007. **115**(17): S. 2344-2351.

- [6] Ajzenberg, N., P. Aubry, M.G. Huisse, A. Cachier, W. El Amara, L.J. Feldman, D. Himbert, D. Baruch, M.C. Guillin, and P.G. Steg, *Enhanced shear-induced platelet aggregation in patients who experience subacute stent thrombosis: a case-control study*. J Am Coll Cardiol, 2005. **45**(11): S. 1753-1756.

- [7] Luscher, T.F., J. Steffel, F.R. Eberli, M. Joner, G. Nakazawa, F.C. Tanner, and R. Virmani, *Drug-eluting stent and coronary thrombosis: biological mechanisms and clinical implications*. Circulation, 2007. **115**(8): S. 1051-1058.

- [8] Silva, J.A., S.R. Ramee, C.J. White, T.J. Collins, J.S. Jenkins, E. Nunez, S. Zhang, and S.P. Jain, *Primary stenting in acute myocardial infarction: influence of diabetes mellitus in angiographic results and clinical outcome*. Am Heart J, 1999. **138**(3 Pt 1): S. 446-455.
- [9] Moussa, I., C. Di Mario, B. Reimers, T. Akiyama, J. Tobis, and A. Colombo, *Subacute stent thrombosis in the era of intravascular ultrasound-guided coronary stenting without anticoagulation: frequency, predictors and clinical outcome*. J Am Coll Cardiol, 1997. **29**(1): S. 6-12.
- [10] Schuhlen, H., A. Kastrati, J. Dirschinger, J. Hausleiter, S. Elezi, A. Wehinger, J. Pache, M. Hadamitzky, and A. Schomig, *Intracoronary stenting and risk for major adverse cardiac events during the first month*. Circulation, 1998. **98**(2): S. 104-111.
- [11] Kastrati, A., J. Mehilli, J. Pache, C. Kaiser, M. Valgimigli, H. Kelbaek, M. Menichelli, M. Sabate, M.J. Suttorp, D. Baumgart, M. Seyfarth, M.E. Pfisterer, and A. Schomig, *Analysis of 14 trials comparing sirolimus-eluting stents with bare-metal stents*. N Engl J Med, 2007. **356**(10): S. 1030-1039.
- [12] Drugbank. *Showing drug card for Paclitaxel (DB01229)*. Tag des letzten Zugriffs: 1.10.2009. URL: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01229>.
- [13] Drugbank. *Showing drug card for Sirolimus (DB00877)*. Tag des letzten Zugriffs: 1.10.2009. URL: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00877>.
- [14] Sousa, J.E., M.A. Costa, A.C. Abizaid, B.J. Rensing, A.S. Abizaid, L.F. Tanajura, K. Kozuma, G. Van Langenhove, A.G. Sousa, R. Falotico, J. Jaeger, J.J. Popma, and P.W. Serruys, *Sustained suppression of neointimal proliferation by sirolimus-eluting stents: one-year angiographic and intravascular ultrasound follow-up*. Circulation, 2001. **104**(17): S. 2007-2011.
- [15] Kolodgie, F.D., M. John, C. Khurana, A. Farb, P.S. Wilson, E. Acampado, N. Desai, P. Soon-Shiong, and R. Virmani, *Sustained reduction of in-stent neointimal growth with the use of a novel systemic nanoparticle paclitaxel*. Circulation, 2002. **106**(10): S. 1195-1198.
- [16] Joner, M., A.V. Finn, A. Farb, E.K. Mont, F.D. Kolodgie, E. Ladich, R. Kutys, K. Skorija, H.K. Gold, and R. Virmani, *Pathology of drug-eluting stents in humans: delayed healing and late thrombotic risk*. J Am Coll Cardiol, 2006. **48**(1): S. 193-202.

- [17] Drugbank. *Showing drug card for Clopidogrel (DB00758)*. Tag des letzten Zugriffs: 1.10.2009. URL: <http://www.drugbank.ca/cgi-bin/getCard.cgi?CARD=APRD00444.txt>.
- [18] Wiviott, S.D., E. Braunwald, C.H. McCabe, G. Montalescot, W. Ruzyllo, S. Gottlieb, F.J. Neumann, D. Ardissino, S. De Servi, S.A. Murphy, J. Riesmeyer, G. Weerakkody, C.M. Gibson, and E.M. Antman, *Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes*. N Engl J Med, 2007. **357**(20): S. 2001-2015.
- [19] Montalescot, G., S.D. Wiviott, E. Braunwald, S.A. Murphy, C.M. Gibson, C.H. McCabe, and E.M. Antman, *Prasugrel compared with clopidogrel in patients undergoing percutaneous coronary intervention for ST-elevation myocardial infarction (TRITON-TIMI 38): double-blind, randomised controlled trial*. Lancet, 2009. **373**(9665): S. 723-731.
- [20] McEwen, J., G. Strauch, P. Perles, G. Pritchard, T.E. Moreland, J. Necciari, and J.P. Dickinson, *Clopidogrel bioavailability: absence of influence of food or antacids*. Semin.Thromb.Hemost., 1999. **25 Suppl 2**: S. 47-50.
- [21] Savi, P., J.M. Pereillo, M.F. Uzabiaga, J. Combalbert, C. Picard, J.P. Maffrand, M. Pascal, and J.M. Herbert, *Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel*. Thromb Haemost, 2000. **84**(5): S. 891-896.
- [22] Hollopeter, G., H.M. Jantzen, D. Vincent, G. Li, L. England, V. Ramakrishnan, R.B. Yang, P. Nurden, A. Nurden, D. Julius, and P.B. Conley, *Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs*. Nature, 2001. **409**(6817): S. 202-207.
- [23] Savi, P., J.L. Zacharyus, N. Delesque-Touchard, C. Labouret, C. Herve, M.F. Uzabiaga, J.M. Pereillo, J.M. Culouscou, F. Bono, P. Ferrara, and J.M. Herbert, *The active metabolite of Clopidogrel disrupts P2Y12 receptor oligomers and partitions them out of lipid rafts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(29): S. 11069-11074.
- [24] Thebault, J.J., G. Kieffer, G.D. Lowe, W.S. Nimmo, and R. Cariou, *Repeated-dose pharmacodynamics of clopidogrel in healthy subjects*. Semin Thromb Hemost, 1999. **25 Suppl 2**: S. 9-14.
- [25] Angiolillo, D.J., A. Fernandez-Ortiz, E. Bernardo, F. Alfonso, C. Macaya, T.A. Bass, and M.A. Costa, *Variability in individual responsiveness to clopidogrel: clinical implications, management, and future perspectives*. J.Am.Coll.Cardiol., 2007. **49**(14): S. 1505-1516.

- [26] Chen, Z.M., L.X. Jiang, Y.P. Chen, J.X. Xie, H.C. Pan, R. Peto, R. Collins, and L.S. Liu, *Addition of clopidogrel to aspirin in 45,852 patients with acute myocardial infarction: randomised placebo-controlled trial*. Lancet, 2005. **366**(9497): S. 1607-1621.

- [27] Sabatine, M.S., C.P. Cannon, C.M. Gibson, J.L. Lopez-Sendon, G. Montalescot, P. Theroux, M.J. Claeys, F. Cools, K.A. Hill, A.M. Skene, C.H. McCabe, and E. Braunwald, *Addition of clopidogrel to aspirin and fibrinolytic therapy for myocardial infarction with ST-segment elevation*. N.Engl.J.Med, 2005. **352**(12): S. 1179-1189.

- [28] Mehta, S.R., S. Yusuf, R.J. Peters, M.E. Bertrand, B.S. Lewis, M.K. Natarajan, K. Malmberg, H. Rupprecht, F. Zhao, S. Chrolavicius, I. Copland, and K.A. Fox, *Effects of pretreatment with clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the PCI-CURE study*. Lancet, 2001. **358**(9281): S. 527-533.

- [29] Yusuf, S., F. Zhao, S.R. Mehta, S. Chrolavicius, G. Tognoni, and K.K. Fox, *Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation*. N.Engl.J.Med, 2001. **345**(7): S. 494-502.

- [30] Steinhubl, S.R., P.B. Berger, J.T. Mann, III, E.T. Fry, A. DeLago, C. Wilmer, and E.J. Topol, *Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial*. JAMA, 2002. **288**(19): S. 2411-2420.

- [31] Sabatine, M.S., C.P. Cannon, C.M. Gibson, J.L. Lopez-Sendon, G. Montalescot, P. Theroux, B.S. Lewis, S.A. Murphy, C.H. McCabe, and E. Braunwald, *Effect of clopidogrel pretreatment before percutaneous coronary intervention in patients with ST-elevation myocardial infarction treated with fibrinolytics: the PCI-CLARITY study*. JAMA, 2005. **294**(10): S. 1224-1232.

- [32] von Beckerath, N., D. Taubert, G. Pogatsa-Murray, E. Schomig, A. Kastrati, and A. Schomig, *Absorption, metabolization, and antiplatelet effects of 300-, 600-, and 900-mg loading doses of clopidogrel: results of the ISAR-CHOICE (Intracoronary Stenting and Antithrombotic Regimen: Choose Between 3 High Oral Doses for Immediate Clopidogrel Effect) Trial*. Circulation, 2005. **112**(19): S. 2946-2950.

- [33] Bonello, L., L. Camoin-Jau, S. Armero, O. Com, S. Arques, C. Burignat-Bonello, M.P. Giacomoni, R. Bonello, F. Collet, P. Rossi, P. Barragan, F. Dignat-George, and F. Paganelli, *Tailored clopidogrel loading dose according to platelet reactivity monitoring to prevent acute and subacute stent thrombosis*. Am J Cardiol, 2009. **103**(1): S. 5-10.
- [34] Schulz, S., T. Schuster, J. Mehilli, R.A. Byrne, J. Ellert, S. Massberg, J. Goedel, O. Bruskina, K. Ulm, A. Schomig, and A. Kastrati, *Stent thrombosis after drug-eluting stent implantation: incidence, timing, and relation to discontinuation of clopidogrel therapy over a 4 year period*. Eur Heart J, 2009.
- [35] Jaremo, P., T.L. Lindahl, S.G. Fransson, and A. Richter, *Individual variations of platelet inhibition after loading doses of clopidogrel*. J Intern Med, 2002. **252**(3): S. 233-238.
- [36] Bonello, L., L. Camoin-Jau, S. Arques, C. Boyer, D. Panagides, O. Wittenberg, M.C. Simeoni, P. Barragan, F. Dignat-George, and F. Paganelli, *Adjusted clopidogrel loading doses according to vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation index decrease rate of major adverse cardiovascular events in patients with clopidogrel resistance: a multicenter randomized prospective study*. J Am Coll Cardiol, 2008. **51**(14): S. 1404-1411.
- [37] Buonamici, P., R. Marcucci, A. Migliorini, G.F. Gensini, A. Santini, R. Panizza, G. Moschi, A.M. Gori, R. Abbate, and D. Antoniucci, *Impact of platelet reactivity after clopidogrel administration on drug-eluting stent thrombosis*. J Am Coll Cardiol, 2007. **49**(24): S. 2312-2317.
- [38] Barragan, P., J.L. Bouvier, P.O. Roquebert, G. Macaluso, P. Commeau, B. Comet, A. Lafont, L. Camoin, U. Walter, and M. Eigenthaler, *Resistance to thienopyridines: clinical detection of coronary stent thrombosis by monitoring of vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation*. Catheter Cardiovasc Interv, 2003. **59**(3): S. 295-302.
- [39] Matetzky, S., B. Shenkman, V. Guetta, M. Shechter, R. Bienart, I. Goldenberg, I. Novikov, H. Pres, N. Savion, D. Varon, and H. Hod, *Clopidogrel resistance is associated with increased risk of recurrent atherothrombotic events in patients with acute myocardial infarction*. Circulation, 2004. **109**(25): S. 3171-3175.
- [40] Gurbel, P.A., K.P. Bliden, W. Samara, J.A. Yoho, K. Hayes, M.Z. Fissaha, and U.S. Tantry, *Clopidogrel effect on platelet reactivity in patients with stent thrombosis: results of the CREST Study*. J Am Coll Cardiol, 2005. **46**(10): S. 1827-1832.

- [41] Cuisset, T., C. Frere, J. Quilici, P.E. Morange, L. Nait-Saidi, C. Mielot, L. Bali, M. Lambert, M.C. Alessi, and J.L. Bonnet, *High post-treatment platelet reactivity is associated with a high incidence of myonecrosis after stenting for non-ST elevation acute coronary syndromes*. Thromb Haemost, 2007. **97**(2): S. 282-287.
- [42] Pinto Slottow, T.L., L. Bonello, R. Gavini, P. Beauzile, S.J. Sushinsky, M. Scheinowitz, K. Kaneshige, Z. Xue, R. Torguson, U. Tantry, A.D. Pichard, L.F. Satler, W.O. Suddath, K. Kent, P. Gurbel, and R. Waksman, *Prevalence of aspirin and clopidogrel resistance among patients with and without drug-eluting stent thrombosis*. Am J Cardiol, 2009. **104**(4): S. 525-530.
- [43] Snoep, J.D., M.M. Hovens, J.C. Eikenboom, J.G. van der Bom, J.W. Jukema, and M.V. Huisman, *Clopidogrel nonresponsiveness in patients undergoing percutaneous coronary intervention with stenting: a systematic review and meta-analysis*. Am.Heart J., 2007. **154**(2): S. 221-231.
- [44] Lau, W.C. and P.A. Gurbel, *Antiplatelet drug resistance and drug-drug interactions: Role of cytochrome P450 3A4*. Pharm.Res., 2006. **23**(12): S. 2691-2708.
- [45] Karow, T.L.-R., Ruth, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Vol. 17. 2009, Köln: Karow. 1293 S.
- [46] Savi, P., J. Combalbert, C. Gaich, M.C. Rouchon, J.P. Maffrand, Y. Berger, and J.M. Herbert, *The antiaggregating activity of clopidogrel is due to a metabolic activation by the hepatic cytochrome P450-1A*. Thromb Haemost, 1994. **72**(2): S. 313-317.
- [47] Lau, W.C., L.A. Waskell, P.B. Watkins, C.J. Neer, K. Horowitz, A.S. Hopp, A.R. Tait, D.G. Carville, K.E. Guyer, and E.R. Bates, *Atorvastatin reduces the ability of clopidogrel to inhibit platelet aggregation: a new drug-drug interaction*. Circulation, 2003. **107**(1): S. 32-37.
- [48] Clarke, T.A. and L.A. Waskell, *The Metabolism of Clopidogrel Is Catalyzed by Human Cytochrome P450 3A and Is Inhibited by Atorvastatin*. 2003. **31**(1): S. 53-59.
- [49] Lau, W.C., P.A. Gurbel, P.B. Watkins, C.J. Neer, A.S. Hopp, D.G. Carville, K.E. Guyer, A.R. Tait, and E.R. Bates, *Contribution of hepatic cytochrome P450 3A4 metabolic activity to the phenomenon of clopidogrel resistance*. Circulation, 2004. **109**(2): S. 166-171.

- [50] Mega, J.L., S.L. Close, S.D. Wiviott, L. Shen, R.D. Hockett, J.T. Brandt, J.R. Walker, E.M. Antman, W. Macias, E. Braunwald, and M.S. Sabatine, *Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel*. N Engl J Med, 2009. **360**(4): S. 354-362.
- [51] Giusti, B., A.M. Gori, R. Marcucci, C. Saracini, I. Sestini, R. Panicia, S. Valente, D. Antoniucci, R. Abbate, and G.F. Gensini, *Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism, but not CYP3A4 IVS10 + 12G/A and P2Y12 T744C polymorphisms, is associated with response variability to dual anti-platelet treatment in high-risk vascular patients*. Pharmacogenet Genomics, 2007. **17**(12): S. 1057-1064.
- [52] Sibbing, D., J. Stegherr, W. Latz, W. Koch, J. Mehilli, K. Dorrlar, T. Morath, A. Schomig, A. Kastrati, and N. von Beckerath, *Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism and stent thrombosis following percutaneous coronary intervention*. Eur Heart J, 2009. **30**(8): S. 916-922.
- [53] Malek, L.A., B. Kisiel, M. Spiewak, M. Grabowski, K.J. Filipiak, G. Kostrzewa, Z. Huczek, R. Ploski, and G. Opolski, *Coexisting polymorphisms of P2Y12 and CYP2C19 genes as a risk factor for persistent platelet activation with clopidogrel*. Circ J, 2008. **72**(7): S. 1165-1169.
- [54] Suh, J.W., B.K. Koo, S.Y. Zhang, K.W. Park, J.Y. Cho, I.J. Jang, D.S. Lee, D.W. Sohn, M.M. Lee, and H.S. Kim, *Increased risk of atherothrombotic events associated with cytochrome P450 3A5 polymorphism in patients taking clopidogrel*. Cmaj, 2006. **174**(12): S. 1715-1722.
- [55] O'Donoghue, M.L., E. Braunwald, E.M. Antman, S.A. Murphy, E.R. Bates, Y. Rozenman, A.D. Michelson, R.W. Hautvast, P.N. Ver Lee, S.L. Close, L. Shen, J.L. Mega, M.S. Sabatine, and S.D. Wiviott, *Pharmacodynamic effect and clinical efficacy of clopidogrel and prasugrel with or without a proton-pump inhibitor: an analysis of two randomised trials*. Lancet, 2009. **374**(9694): S. 989-997.
- [56] Saw, J., S.R. Steinhubl, P.B. Berger, D.J. Kereiakes, V.L. Serebruany, D. Brennan, and E.J. Topol, *Lack of adverse clopidogrel-atorvastatin clinical interaction from secondary analysis of a randomized, placebo-controlled clopidogrel trial*. Circulation, 2003. **108**(8): S. 921-924.
- [57] Wiviott, S.D. and E.M. Antman, *Clopidogrel resistance: a new chapter in a fast-moving story*. Circulation, 2004. **109**(25): S. 3064-3067.

- [58] Angiolillo, D.J., A. Fernandez-Ortiz, E. Bernardo, R.C. Barrera, M. Sabate, C. Fernandez, R. Hernandez-Antolin, J. Escaned, F. Alfonso, and C. Macaya, *Platelet aggregation according to body mass index in patients undergoing coronary stenting: should clopidogrel loading-dose be weight adjusted?* J.Invasive.Cardiol., 2004. **16**(4): S. 169-174.

- [59] Cuisset, T., C. Frere, J. Quilici, P.E. Morange, L. Camoin, L. Bali, M. Lambert, I. Juhan-Vague, M.C. Alessi, and J.L. Bonnet, *Relationship between aspirin and clopidogrel responses in acute coronary syndrome and clinical predictors of non response.* Thromb Res, 2009. **123**(4): S. 597-603.

- [60] Angiolillo, D.J., E. Bernardo, M. Sabate, P. Jimenez-Quevedo, M.A. Costa, J. Palazuelos, R. Hernandez-Antolin, R. Moreno, J. Escaned, F. Alfonso, C. Banelos, L.A. Guzman, T.A. Bass, C. Macaya, and A. Fernandez-Ortiz, *Impact of platelet reactivity on cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease.* J.Am.Coll.Cardiol., 2007. **50**(16): S. 1541-1547.

- [61] Ensembl. *Ensembl Gene Report for ENSG00000169313, P2RY12.* Tag des letzten Zugriffs: 8.12.2009. URL: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/geneview?gene=ENSG00000169313

- [62] Fontana, P., A. Dupont, S. Gandrille, C. Bachelot-Loza, J.L. Reny, M. Aiach, and P. Gaussem, *Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation is associated with P2Y12 gene sequence variations in healthy subjects.* Circulation, 2003. **108**(8): S. 989-995.

- [63] Fontana, P., P. Gaussem, M. Aiach, J.N. Fiessinger, J. Emmerich, and J.L. Reny, *P2Y12 H2 haplotype is associated with peripheral arterial disease: a case-control study.* Circulation, 2003. **108**(24): S. 2971-2973.

- [64] Amisten, S., O.O. Braun, L. Johansson, M. Ridderstrale, O. Melander, and D. Erlinge, *The P2Y 13 Met-158-Thr polymorphism, which is in linkage disequilibrium with the P2Y 12 locus, is not associated with acute myocardial infarction.* PLoS One, 2008. **3**(1): S. e1462.

- [65] von Beckerath, N., O. von Beckerath, W. Koch, M. Eichinger, A. Schomig, and A. Kastrati, *P2Y12 gene H2 haplotype is not associated with increased adenosine diphosphate-induced platelet aggregation after initiation of clopidogrel therapy with a high loading dose.* Blood Coagul Fibrinolysis, 2005. **16**(3): S. 199-204.

- [66] Zee, R.Y., S.E. Michaud, K.A. Diehl, D.I. Chasman, J. Emmerich, P. Gaussem, M. Aiach, and P.M. Ridker, *Purinergic receptor P2Y₁₂, G-protein coupled, 12 gene variants and risk of incident ischemic stroke, myocardial infarction, and venous thromboembolism*. *Atherosclerosis*, 2008. **197**(2): S. 694-699.

- [67] Ziegler, S., M. Schillinger, M. Funk, K. Felber, M. Exner, W. Mlekusch, S. Sabeti, J. Amighi, E. Minar, M. Brunner, M. Muller, and C. Mannhalter, *Association of a functional polymorphism in the clopidogrel target receptor gene, P2Y₁₂, and the risk for ischemic cerebrovascular events in patients with peripheral artery disease*. *Stroke*, 2005. **36**(7): S. 1394-1399.

- [68] Hetherington, S.L., R.K. Singh, D. Lodwick, J.R. Thompson, A.H. Goodall, and N.J. Samani, *Dimorphism in the P2Y₁ ADP receptor gene is associated with increased platelet activation response to ADP*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(1): S. 252-257.

- [69] Cattaneo, M., A. Lecchi, A.M. Randi, J.L. McGregor, and P.M. Mannucci, *Identification of a new congenital defect of platelet function characterized by severe impairment of platelet responses to adenosine diphosphate*. *Blood*, 1992. **80**(11): S. 2787-2796.

- [70] Nurden, P., P. Savi, E. Heilmann, C. Bihour, J.M. Herbert, J.P. Maffrand, and A. Nurden, *An inherited bleeding disorder linked to a defective interaction between ADP and its receptor on platelets. Its influence on glycoprotein IIb-IIIa complex function*. *J Clin Invest*, 1995. **95**(4): S. 1612-1622.

- [71] Cattaneo, M., M.L. Zighetti, R. Lombardi, C. Martinez, A. Lecchi, P.B. Conley, J. Ware, and Z.M. Ruggeri, *Molecular bases of defective signal transduction in the platelet P2Y₁₂ receptor of a patient with congenital bleeding*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 2003. **100**(4): S. 1978-1983.

- [72] Ensembl. *Ensembl Gene Report for ENSG00000160868, Cyp3A4*. Tag des letzten Zugriffs: 8.12.2009. URL: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/geneview?gene=ENSG00000160868

- [73] Watkins, P.B., S.A. Wrighton, P. Maurel, E.G. Schuetz, G. Mendez-Picon, G.A. Parker, and P.S. Guzelian, *Identification of an inducible form of cytochrome P-450 in human liver*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. **82**(18): S. 6310-6314.

- [74] Shimada, T., H. Yamazaki, M. Mimura, Y. Inui, and F.P. Guengerich, *Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians*. J Pharmacol Exp Ther, 1994. **270**(1): S. 414-423.

- [75] Lehmann, J.M., D.D. McKee, M.A. Watson, T.M. Willson, J.T. Moore, and S.A. Kliewer, *The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions*. J Clin Invest, 1998. **102**(5): S. 1016-1023.

- [76] Flockhart, D. *Drug Interactions: Cytochrome P450 Drug Interaction Table*. Tag des letzten Zugriffs: 9.10.2009. URL: <http://medicine.iupui.edu/clinpharm/ddis/>.

- [77] Ingelman-Sundberg, A.K.D.D.W.N.M. *Home Page of the Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee*. Tag des letzten Zugriffs: 9.10.2009. URL: <http://www.cypalleles.ki.se/cyp3a4.htm>.

- [78] Fukushima-Uesaka, H., Y. Saito, H. Watanabe, K. Shiseki, M. Saeki, T. Nakamura, K. Kurose, K. Sai, K. Komamura, K. Ueno, S. Kamakura, M. Kitakaze, S. Hanai, T. Nakajima, K. Matsumoto, H. Saito, Y. Goto, H. Kimura, M. Katoh, K. Sugai, N. Minami, K. Shirao, T. Tamura, N. Yamamoto, H. Minami, A. Ohtsu, T. Yoshida, N. Saijo, Y. Kitamura, N. Kamatani, S. Ozawa, and J. Sawada, *Haplotypes of CYP3A4 and their close linkage with CYP3A5 haplotypes in a Japanese population*. Hum Mutat, 2004. **23**(1): S. 1-8.

- [79] Kuehl, P., J. Zhang, Y. Lin, J. Lamba, M. Assem, J. Schuetz, P.B. Watkins, A. Daly, S.A. Wrighton, S.D. Hall, P. Maurel, M. Relling, C. Brimer, K. Yasuda, R. Venkataramanan, S. Strom, K. Thummel, M.S. Boguski, and E. Schuetz, *Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression*. Nat.Genet., 2001. **27**(4): S. 383-391.

- [80] Crettol, S., J.P. Venetz, M. Fontana, J.D. Aubert, M. Pascual, and C.B. Eap, *CYP3A7, CYP3A5, CYP3A4, and ABCB1 genetic polymorphisms, cyclosporine concentration, and dose requirement in transplant recipients*. Ther Drug Monit, 2008. **30**(6): S. 689-699.

- [81] Schirmer, M., A. Rosenberger, K. Klein, B. Kulle, M.R. Toliat, P. Nurnberg, U.M. Zanger, and L. Wojnowski, *Sex-dependent genetic markers of CYP3A4 expression and activity in human liver microsomes*. Pharmacogenomics, 2007. **8**(5): S. 443-453.

- [82] Loukola, A., M. Chadha, S.G. Penn, D. Rank, D.V. Conti, D. Thompson, M. Cicek, B. Love, V. Bivolarevic, Q. Yang, Y. Jiang, D.K. Hanzel, K. Dains, P.L. Paris, G. Casey, and J.S. Witte, *Comprehensive evaluation of the association between prostate cancer and genotypes/haplotypes in CYP17A1, CYP3A4, and SRD5A2*. Eur J Hum Genet, 2004. **12**(4): S. 321-332.

- [83] Angiolillo, D.J., A. Fernandez-Ortiz, E. Bernardo, C. Ramirez, U. Cavallari, E. Trabetti, M. Sabate, R. Hernandez, R. Moreno, J. Escaned, F. Alfonso, C. Banelos, M.A. Costa, T.A. Bass, P.F. Pignatti, and C. Macaya, *Contribution of gene sequence variations of the hepatic cytochrome P450 3A4 enzyme to variability in individual responsiveness to clopidogrel*. Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol., 2006. **26**(8): S. 1895-1900.

- [84] Fontana, P., J.S. Hulot, P. De Moerloose, and P. Gaussem, *Influence of CYP2C19 and CYP3A4 gene polymorphisms on clopidogrel responsiveness in healthy subjects*. J Thromb Haemost, 2007. **5**(10): S. 2153-2155.

- [85] Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich, *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol., 1986. **51 Pt 1**: S. 263-273.

- [86] Don, R.H., P.T. Cox, B.J. Wainwright, K. Baker, and J.S. Mattick, *'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(14): S. 4008.

- [87] Kent, J. *Human Search BLAT*. Tag des letzten Zugriffs: 8.12.2009. URL: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start&org=Human&db=hg18&hgsid=96766592>.

- [88] Strom, T. *Primer Design - ExonPrimer*. Tag des letzten Zugriffs: 8.12.2009. URL: <http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/ExonPrimer.html>.

- [89] MWG-biotech. *Seq-Download*. Tag des letzten Zugriffs: 17.8.2007. URL: <http://www.mwg-biotech.com/html/all/index.php>.

- [90] Seqlab, S.L.G.G.-. *Seq-Download*. Tag des letzten Zugriffs: 28.3.2007. URL: <http://www.seqlab.de/index.php?id=seqlab>.

- [91] Ensembl. *Genome Browser Ensembl*. Tag des letzten Zugriffs: 7.12.2009. URL: <http://www.ensembl.org/index.html>.
- [92] NCBI. *Entrez SNP*. Tag des letzten Zugriffs: 7.12.2009. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp>.
- [93] SNPSeek, W.U.S.o.M.S.R.F.-. *SNPSeek*. Tag des letzten Zugriffs: 8.12.2009. URL: <http://snp.wustl.edu/cgi-bin/SNPseek/index.cgi>.
- [94] Kent, W.J., *BLAT--the BLAST-like alignment tool*. Genome Res, 2002. **12**(4): S. 656-664.
- [95] Löffler, P., *Biochemie & Pathobiochemie*. 7 ed. 2003: Springer-Verlag. 1267 S.
- [96] nakai@imcb.osaka-u.ac.jp. *Splice Sites Score Calculation*. Tag des letzten Zugriffs: 8.12.2009. URL: http://rulai.cshl.edu/new_alt_exon_db2/HTML/score.html.
- [97] HapMap. *HapMap-CEU Population*. Tag des letzten Zugriffs: 17.7.2009. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_viewTable.cgi?pop=1409.
- [98] HapMap. *International HapMap Projekt*. Tag des letzten Zugriffs: 8.12.2009. URL: <http://www.hapmap.org/>.
- [99] Universität-Jena. *Einführung in die Populationsgenetik- Rekombination*. Tag des letzten Zugriffs: 18.12.2009. URL: http://www.uni-jena.de/unijenamedia/Downloads/faculties/bio_pharm/ls_genetik/Teaching/PopGenHeckel/recombination_handout.pdf.
- [100] Johnson, A.D., R.E. Handsaker, S.L. Pulit, M.M. Nizzari, C.J. O'Donnell, and P.I. de Bakker, *SNAP: a web-based tool for identification and annotation of proxy SNPs using HapMap*. Bioinformatics, 2008. **24**(24): S. 2938-2939.
- [101] He, L. and G.J. Hannon, *MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation*. Nat Rev Genet, 2004. **5**(7): S. 522-531.
- [102] Griffiths-Jones, S., R.J. Grocock, S. van Dongen, A. Bateman, and A.J. Enright, *miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature*. 2006. **34**(suppl_1): S. D140-144.

- [103] Whitehead-Institute. *Target-Scan 5.1*. Tag des letzten Zugriffs: 15.10.2009. URL: <http://www.targetscan.org/>.
- [104] Manchester-University. *miRBase*. Tag des letzten Zugriffs: 15.10.2009. URL: <http://www.mirbase.org/search.shtml>.
- [105] Kim, S.S. *Acute and Subacute Stent Thrombosis in A Patient with Clopidogrel Resistance*. Circulation Korea Tag des letzten Zugriffs: 12.9.2009. URL: <http://www.circulation.or.kr/info/case/200908/case200908.htm>.
- [106] Bethke, L., E. Webb, G. Sellick, M. Rudd, S. Penegar, L. Withey, M. Qureshi, and R. Houlston, *Polymorphisms in the cytochrome P450 genes CYP1A2, CYP1B1, CYP3A4, CYP3A5, CYP11A1, CYP17A1, CYP19A1 and colorectal cancer risk*. BMC Cancer, 2007. 7: S. 123.
- [107] Ensembl. *Variation: rs1491974*. Tag des letzten Zugriffs: 7.12.2009. URL: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Mappings?source=dbSNP;v=rs1491974.
- [108] Ensembl. *Variation: rs3821667*. Tag des letzten Zugriffs: 16.9.2009. URL: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Mappings?source=dbSNP;v=rs3821667.
- [109] Ensembl. *Variation: rs6785930*. Tag des letzten Zugriffs: 8.9.2009. URL: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Mappings?source=dbSNP;v=rs6785930.
- [110] Ensembl. *Variation: rs6809699*. Tag des letzten Zugriffs: 7.12.2009. URL: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Mappings?source=dbSNP;v=rs6809699.
- [111] Ensembl. *Variation: rs2046934*. Tag des letzten Zugriffs: 16.9.2009. URL: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Summary?source=dbSNP;v=rs2046934.
- [112] Ensembl. *Variation: rs1388626*. Tag des letzten Zugriffs: 14.10.2009. URL: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Summary?source=dbSNP;v=rs1388626.
- [113] Ensembl. *Variation: rs4987159*. Tag des letzten Zugriffs: 7.12.2009. URL: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Mappings?r=7:99203379-99204379;v=rs4987159;vdb=variation;vf=3859239.

- [114] Ensembl. *Variation: rs2687116*. Tag des letzten Zugriffs: 7.12.2009. URL: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Mappings?source=dbSNP;v=rs2687116.

- [115] Ensembl. *Variation: rs4646437*. Tag des letzten Zugriffs: 16.9.2009. URL: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Summary?source=dbSNP;v=rs4646437.

- [116] Ensembl. *Variation: rs28371763*. Tag des letzten Zugriffs: 7.12.2009. URL: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?r=7:99203379-99204379;v=rs28371763;vdb=variation;vf=10009590.

- [117] Ensembl. *Variation: rs6956344* Tag des letzten Zugriffs: 16.9.2009. URL: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Mappings?source=dbSNP;v=rs6956344.

- [118] Ensembl. *Variation: rs28969391*. Tag des letzten Zugriffs: 16.9.2009. URL: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Mappings?source=dbSNP;v=rs28969391.

- [119] Ensembl. *Variation: 776746*. Tag des letzten Zugriffs: 15.10.2009. URL: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Summary?source=dbSNP;v=rs776746.

- [120] Samani, N.J., J. Erdmann, A.S. Hall, C. Hengstenberg, M. Mangino, B. Mayer, R.J. Dixon, T. Meitinger, P. Braund, H.E. Wichmann, J.H. Barrett, I.R. Konig, S.E. Stevens, S. Szymczak, D.A. Tregouet, M.M. Iles, F. Pahlke, H. Pollard, W. Lieb, F. Cambien, M. Fischer, W. Ouwehand, S. Blankenberg, A.J. Balmforth, A. Baessler, S.G. Ball, T.M. Strom, I. Braenne, C. Gieger, P. Deloukas, M.D. Tobin, A. Ziegler, J.R. Thompson, and H. Schunkert, *Genomewide association analysis of coronary artery disease*. N.Engl.J.Med., 2007. **357**(5): S. 443-453.

- [121] Erdmann, J., A. Grosshennig, P.S. Braund, I.R. Konig, C. Hengstenberg, A.S. Hall, P. Linsel-Nitschke, S. Kathiresan, B. Wright, D.A. Tregouet, F. Cambien, P. Bruse, Z. Aherrahrou, A.K. Wagner, K. Stark, S.M. Schwartz, V. Salomaa, R. Elosua, O. Melander, B.F. Voight, C.J. O'Donnell, L. Peltonen, D.S. Siscovick, D. Altshuler, P.A. Merlini, F. Peyvandi, L. Bernardinelli, D. Ardisino, A. Schillert, S. Blankenberg, T. Zeller, P. Wild, D.F. Schwarz, L. Tiret, C. Perret, S. Schreiber, N.E. El Mokhtari, A. Schafer, W. Marz, W. Renner, P. Bugert, H. Kluter, J. Schrezenmeir, D. Rubin, S.G. Ball, A.J. Balmforth, H.E. Wichmann, T. Meitinger, M. Fischer, C. Meisinger, J. Baumert, A. Peters, W.H. Ouwehand, P. Deloukas, J.R. Thompson, A. Ziegler, N.J. Samani, and H. Schun-

- kert, *New susceptibility locus for coronary artery disease on chromosome 3q22.3*. Nat Genet, 2009. **41**(3): S. 280-282.
- [122] Kathiresan, S., B.F. Voight, S. Purcell, K. Musunuru, D. Ardissino, P.M. Mannucci, S. Anand, J.C. Engert, N.J. Samani, H. Schunkert, J. Erdmann, M.P. Reilly, D.J. Rader, T. Morgan, J.A. Spertus, M. Stoll, D. Girelli, P.P. McKeown, C.C. Patterson, D.S. Siscovick, C.J. O'Donnell, R. Elosua, L. Peltonen, V. Salomaa, S.M. Schwartz, O. Melander, D. Altshuler, D. Ardissino, P.A. Merlini, C. Berzuini, L. Bernardinelli, F. Peyvandi, M. Tubaro, P. Celli, M. Ferrario, R. Fève, N. Marziliano, G. Casari, M. Galli, F. Ribichini, M. Rossi, F. Bernardi, P. Zoncin, A. Piazza, P.M. Mannucci, S.M. Schwartz, D.S. Siscovick, J. Yee, Y. Friedlander, R. Elosua, J. Marrugat, G. Lucas, I. Subirana, J. Sala, R. Ramos, S. Kathiresan, J.B. Meigs, G. Williams, D.M. Nathan, C.A. MacRae, C.J. O'Donnell, V. Salomaa, A.S. Havulinna, L. Peltonen, O. Melander, G. Berglund, B.F. Voight, S. Kathiresan, J.N. Hirschhorn, R. Asselta, S. Duga, M. Spreafico, K. Musunuru, M.J. Daly, S. Purcell, B.F. Voight, S. Purcell, J. Nemesh, J.M. Korn, S.A. McCarroll, S.M. Schwartz, J. Yee, S. Kathiresan, G. Lucas, I. Subirana, R. Elosua, A. Surti, C. Guiducci, L. Gianniny, D. Mirel, M. Parkin, N. Burt, S.B. Gabriel, N.J. Samani, J.R. Thompson, P.S. Braund, B.J. Wright, A.J. Balmforth, S.G. Ball, A.S. Hall, H. Schunkert, J. Erdmann, P. Linsel-Nitschke, W. Lieb, A. Ziegler, I. König, C. Hengstenberg, M. Fischer, K. Stark, A. Grosshennig, M. Preuss, H.E. Wichmann, S. Schreiber, H. Schunkert, N.J. Samani, J. Erdmann, W. Ouwehand, C. Hengstenberg, P. Deloukas, M. Scholz, F. Cambien, M.P. Reilly, M. Li, Z. Chen, R. Wilensky, W. Matthai, A. Qasim, H.H. Hakonarson, J. Devaney, M.S. Burnett, A.D. Pichard, K.M. Kent, L. Satler, J.M. Lindsay, R. Waksman, S.E. Epstein, D.J. Rader, T. Schefold, K. Berger, M. Stoll, A. Hage, D. Girelli, N. Martinelli, O. Olivieri, R. Corrocher, T. Morgan, J.A. Spertus, P. McKeown, C.C. Patterson, H. Schunkert, J. Erdmann, P. Linsel-Nitschke, W. Lieb, A. Ziegler, I.R. König, C. Hengstenberg, M. Fischer, K. Stark, A. Grosshennig, M. Preuss, H.E. Wichmann, S. Schreiber, H. Holm, G. Thorleifsson, U. Thorsteinsdottir, K. Stefansson, J.C. Engert, R. Do, C. Xie, S. Anand, S. Kathiresan, D. Ardissino, P.M. Mannucci, D. Siscovick, C.J. O'Donnell, N.J. Samani, O. Melander, R. Elosua, L. Peltonen, V. Salomaa, S.M. Schwartz and D. Altshuler, *Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants*. Nat Genet, 2009. **41**(3): S. 334-341.
- [123] Tregouet, D.A., I.R. König, J. Erdmann, A. Munteanu, P.S. Braund, A.S. Hall, A. Grosshennig, P. Linsel-Nitschke, C. Perret, M. DeSuremain, T. Meitinger, B.J. Wright, M. Preuss, A.J. Balmforth, S.G. Ball, C. Meisinger, C. Germain, A. Evans, D. Arveiler, G. Luc, J.B. Ruidavets, C. Morrison, P. van der Harst, S. Schreiber, K. Neureuther, A. Schäfer, P. Bugert, N.E. El Mokhtari, J. Schrezenmeier, K. Stark, D. Rubin, H.E. Wichmann, C. Hengstenberg, W. Ouwehand, A. Ziegler, L. Tiret, J.R. Thompson, F. Cambien, H. Schunkert, and N.J. Samani, *Genome-wide haplotype association study identifies the SLC22A3-LPAL2-LPA gene cluster as a risk locus for coronary artery disease*. Nat Genet, 2009. **41**(3): S. 283-285.

- [124] Ng, S.B., A.W. Bigham, K.J. Buckingham, M.C. Hannibal, M.J. McMillin, H.I. Gildersleeve, A.E. Beck, H.K. Tabor, G.M. Cooper, H.C. Mefford, C. Lee, E.H. Turner, J.D. Smith, M.J. Rieder, K. Yoshiura, N. Matsumoto, T. Ohta, N. Nii-kawa, D.A. Nickerson, M.J. Bamshad, and J. Shendure, *Exome sequencing identifies MLL2 mutations as a cause of Kabuki syndrome*. Nat Genet, 2010. **42**(9): S. 790-793.
- [125] Ng, S.B., E.H. Turner, P.D. Robertson, S.D. Flygare, A.W. Bigham, C. Lee, T. Shaffer, M. Wong, A. Bhattacharjee, E.E. Eichler, M. Bamshad, D.A. Nickerson, and J. Shendure, *Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes*. Nature, 2009. **461**(7261): S. 272-276.
- [126] Choi, M., U.I. Scholl, W. Ji, T. Liu, I.R. Tikhonova, P. Zumbo, A. Nayir, A. Bakaloglu, S. Ozen, S. Sanjad, C. Nelson-Williams, A. Farhi, S. Mane, and R.P. Lifton, *Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(45): S. 19096-19101.

7. Anhang

7.1 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Geräte
Tab. 2	Chemikalien
Tab. 3	Verbrauchsmaterialien
Tab. 4	Verwendete Auswertungssoftware
Tab. 5	Probenansatz für ein Gesamtvolumen von 20 µl je Probe
Tab. 6	PCR-Standardprotokoll
Tab. 7	Primer für P2RY12 „forward“ (F) und „reverse“ (R)
Tab. 8	Primer für Cyp3A4 „forward“ (F) und „reverse“ (R)
Tab. 9	Standardreihe für die Fluorometrie zur Ermittlung der DNA-Konzentration der PCR-Produkte
Tab. 10	Phänotypisierung und Medikation der Kollektivpatienten
Tab. 11	Überblick über die Ergebnisse der Sequenzierung für P2RY12
Tab. 12	Überblick über die Ergebnisse der Sequenzierung für Cyp3A4
Tab. 13	„Splice-Site-Score“-Berechnung P2RY12
Tab. 14	„Splice-Site-Score“-Berechnung Cyp3A4
Tab. 15	Zusammenfassung der Phänotypisierung und der Genotypisierung

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Vereinfachte Darstellung der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation und Hemmung des P2RY12-Rezeptors durch Clopidogrel nach [25]
Abb. 2	Genexpression nach [95]
Abb. 3	Stentthrombose im therapeutischen Verlauf [105]
Abb. 4	Gelelektrophorese
Abb. 5	P2RY12 mit Varianten
Abb. 6	Elektropherogramm des Patienten Nr. 5 mit rs1491974 als Variante
Abb. 7	Homologieabgleich durch BLAT im Bereich von rs1491974
Abb. 8	Elektropherogramm des Patienten Nr. 1 mit rs3821667 als Variante
Abb. 9	Homologieabgleich durch BLAT im Bereich von rs3821667
Abb. 10	Elektropherogramm des Patienten Nr. 3 mit rs6785930 als Variante
Abb. 11	Elektropherogramm des Patienten Nr. 1 mit rs6809699 als Variante
Abb. 12	LD für P2RY12 mit Fokus auf rs6809699 und rs3821667 [100]
Abb. 13	Cyp3A4 mit Varianten
Abb. 14	Elektropherogramm des Patienten Nr. 2 mit rs4987159 als Variante
Abb. 15	Elektropherogramm des Patienten Nr. 10 mit rs2687116 als Variante
Abb. 16	Elektropherogramm des Patienten Nr. 10 mit rs4646437 als Variante
Abb. 17	Elektropherogramm des Patienten Nr. 11 mit rs2242480 als Variante
Abb. 18	Homologieabgleich durch BLAT im Bereich von rs2242480
Abb. 19	Elektropherogramm des Patienten Nr. 8 mit rs28371763 als Variante
Abb. 20	LD Cyp3A4 (100 kb-Fenster, modifiziert) nach [100]

7.3 Abkürzungsverzeichnis

A	A denin
Abb.	A bbildung
ACS	Englisch: „ a cute c oronary s yndrome“
ADP	A denosin d iphosphat
ARC	Englisch: „ a cademic r esearch c onsortium“
ASS	A cetyl s alicyl s äure
BLAST	Englisch: „ b asic l ocal a lignment s earch t ool“
BLAT	Englisch: „ B LAST-like a lignment t ool“
BMI	Englisch: „ b ody m ass i ndex“ (kg/m ²)
BMS	Stent ohne Medikamentenbeschichtung, Englisch: „ b are m etal s tent“
bp	B asen p aar
bzw.	b eziehung s weise
C	C ytosin
ca.	c irca
cAMP	c yklisches A denosin m onophosphat
cDNA	Englisch: „ c omplementary D N“A“
CLARITY-Studie	Englisch: „ C lopidogrel as a dju n c t ive r eper f usion t herap y “-Studie
cM	C entimorgan (Maßeinheit für die Rekombinationsfrequenz)
CREDO-Studie	Englisch: „ C lopidogrel for the r eduction of e vents d uring o bservation“-Studie
CURE-Studie	Englisch: „ C lopidogrel in u nstable a ngina to prevent r ecurrent i schemic e vents“-Studie
Cyp	C ytochrom P (igment) 450-Superfamilie mit Isoenzymen (u.a. Cyp3A4, Cyp3A5, Cyp2C19)
DES	Medikamentenbeschichteter Stent, Englisch: „ d rug e luting s tent“
d.h.	d as h eißt
DNA	DNS, Desoxyribonukleinsäure; Englisch: „ D eoxyribonucleic-acid“
dNTP	D esoxyribonukleosid t riphosphat
EDTA	E thylendiamintetra a acetat

engl.	englisch
G	G uanin in Bezug auf DNA, G lycin in Bezug auf Aminosäure
g.	g enomische Position
GC-Box	G uanin- und C ytosin-reiches regulatorisches Element der eukaryotischen Genexpression
ggf.	g egebenenfalls
GmbH	G esellschaft mit b eschränkter H aftung
GP-IIb/IIIa	G lykoprotein- IIb/IIIa -Rezeptor auf Thrombozytenoberfläche
°C	Grad C elsius
H	H altetemperatur (PCR)
H1	H aplotyp 1
H2	H aplotyp 2
HapMap-CEU	„CEPH (Französisch: C entre d' E tude du Polymorphisme Humain) from U tah“ (=CEU)-Population des Internationalen HapMap -Projekts
I	I soleucin
ID	I dentifikationsnummer (SNP)
Int.	I ntron
ISAR-CHOICE-Studie	Englisch: “intracoronary s tenting and antithrombotic regimen: choose between 3 h igh o ral doses for immediate c lopidogrel e ffect“-Studie
K	K eto, Mehrdeutigkeitskode für Guanidin und Thymin
Kb	K ilobase
KHK	K oronare H erzkrankheit
LAD	Ramus interventricularis anterior (Koronargefäß), Englisch: „ l eft anterior d escending“
LD	Kopplungsungleichgewicht, Englisch: „ l inkage d isequilibrium“
M	Amino, Mehrdeutigkeitskode für Adenin und Cytosin
MAF	Allelfrequenz der Mutation, Englisch: „ m ajor a llele f requency“
Mb	M egabase
µl	M ikroliter
min.	m indestens
ml	M illiliter
mM	M illimorgan (Maßeinheit für die Rekombinationsfrequenz)

mmol/l	Millimol pro Liter (Stoffmengenkonzentration)
mRNA	messenger-RNS, Ribonukleinsäure; Englisch: „ messenger-ribonucleic acid “
micro-RNA	micro-RNS, Ribonukleinsäure; Englisch: „ micro-ribonucleic acid “
mV	Millivolt
N	Asparagin
n	Anzahl
NCBI	Englisch: „ n ational c enter for b io t echnology i nformation“
nm	Nanometer
p	Position im P rotein
P2RY12	Englisch: „ p urinergic r eceptor 2 , G-protein-coupled (Y) 12 “ auf Thrombozytenoberfläche
Pat.	Patient
PCI-CLARITY	Englisch: „ p ercutaneous c oronary i ntervention- C lopidogrel as a dju n ctive r eper f usion t herap y “, Substudie der CLARITY-Studie
PCI-CURE	Englisch: „ p ercutaneous c oronary i ntervention- C lopidogrel in u nstable a ngina to p revent r ecurrent e vents“, Substudie der CURE-Studie
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, Englisch: „ p olymerase c hain r eaction“
Pos.	Position
PPI	Protonenpumpeninhibitor
PTCA	Perkutane transluninale coronare Angioplastie
PXR	Englisch: „ p regnane- X -receptor“
r^2	Bestimmtheitsmaß
RNA	RNS, Ribonukleinsäure; Englisch: „ r ibonucleic a cid“, auch mRNA (messenger-RNA) und micro-RNA
s.	siehe
s.a.	siehe auch
SDS	Natriumdodecylsulfat, Englisch: „ s odium d odecyl s ulfate“
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus, Englisch: „ s ingle n ucleotide p olymorphism“
T	Thymin
Tab.	Tabelle

TATA-Box	DNA-Sequenz in der Promotorregion zur Regulierung der Genexpression bei Eukaryoten
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA -Puffer
TE	TRIS-EDTA -Puffer
sec	Sekunde
u.a.	unter anderem
u.U.	unter Umständen
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
usw.	und so weiter
UTR	nicht translatierter Bereich (5'-UTR oder 3'-UTR), Englisch: „ untranslated region “
v.a.	vor allem
Y	Pyrimidin, Mehrdeutigkeitskode für Thymin und Cytosin
Z1	Zyklus 1 (PCR)
Z2	Zyklus 2 (PCR)
Z3	Zyklus 3 (PCR)
Z4	Zyklus 4 (PCR)

7.4 Erklärung zur Zustimmung der Ethikkommission

UNIVERSITÄTSKLINIKUM

Schleswig-Holstein

Campus Lübeck

Medizinische Klinik II

Direktor: Prof. Dr. med. Heribert Schunkert

Ansprechpartnerin: Prof. Dr. rer. nat. Jeanette Erdmann

Tel: 0451 / 500-4857

Fax: 0451 / 500-6437

E-Mail: j.erdmann@cardiogenics.eu

Internet: www.uk-s-h.de

Eine Genehmigung der Ethikkommission zur Asservierung und Untersuchung von Blutproben zum Aufbau eines Lübecker Registers von Probanden mit struktureller Herzerkrankung im Rahmen der Routine-Herzkatheterdiagnostik in der Medizinischen Klinik II lag vor und ermöglichte somit die Durchführung der experimentellen Arbeiten für die vorliegende Dissertation.

Aktenzeichen: Az 04-041

Datum des Genehmigungsschreibens: 22.10.2004

8. Danksagung

Für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes und die nötigen Materialien zur Erstellung meiner Dissertationschrift gilt dem Direktor der Medizinischen Klinik II des UK-SH Campus Lübeck, Herrn Prof. Dr. med. Heribert Schunkert, mein besonderer Dank.

Frau Prof. Dr. rer. nat. Jeanette Erdmann danke ich für die Überlassung des Themas und für die Betreuung während der Experimente im Molekulargenetischen Labor I des UK-SH Campus Lübeck. Bei der Auswertung der Experimente und während der Fertigstellung der Dissertationsschrift war sie mir bei Fragen stets behilflich. Durch die profunden Kenntnisse auf dem Gebiet der Genetik, konnte Frau Prof. Dr. Erdmann den Fortschritt der Arbeit mit wertvollen Anregungen und Ratschlägen fördern.

Herrn Dr. med. Björn Mayer möchte ich für die Heranführung an die Thematik der Arbeit, für die Hilfe und Unterstützung bei der Phänotypisierung des Patientenkollektivs und die Vorstellung im Molekulargenetischen Labor danken.

Bei allen Mitarbeitern des Molekulargenetischen Labors I des UK-SH Campus Lübeck möchte ich mich für die herzliche Aufnahme und die schnelle Integration bedanken. Jederzeit traf ich auf geduldige Mitarbeiter, die mir mit weiterführenden Ratschlägen und Hilfe zur Seite standen. Insbesondere gebührt Herrn Dr. hum. biol. Zouhair Aherrahrou, Frau Sandra Wrobel und Frau Petra Bruse mein großer Dank für die exzellente Einarbeitung und Betreuung am Arbeitsplatz. Herrn Dr. hum. biol. Zouhair Aherrahrou danke ich darüber hinaus für seine stetige Bereitschaft zu Diskussionen, die den Fortgang der Arbeit sehr gefördert haben.

Schließlich möchte ich meiner Familie und meiner Partnerin für die Unterstützung während meiner Dissertationstätigkeit danken.

9. Lebenslauf

Name	Jan Sebastian Heyckendorf
Geburtsdatum	9.4.1982
Geburtsort	Hamburg
Staatsangehörigkeit	deutsch