

Aus der

Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin III

(Schwerpunkt: Kardiologie und Angiologie)

**Zusammenhang zwischen thrombozytärem Cyclophilin A
und kardiovaskulären Ereignissen bei Patienten mit
symptomatischen Herz-Kreislauf-Erkrankungen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

**Monzien-Katzenberger, Mona Lorena Wanda,
geb. Monzien-Busch**

2024

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. T. Geisler

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Mahrholdt

Tag der Disputation: 02.05.2024

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnisse	Seite 5-6
1.) Einleitung:	Seite 7-21
• Ätiologie und Epidemiologie der KHK	Seite 7
• Pathophysiologie der Atherosklerose	Seite 8-10
• Thrombozytopoese und Morphologie	Seite 10-11
• Aufbau eines Thrombozyten	Seite 11-12
• Aktivierung der Thrombozyten	Seite 13
• Rolling	Seite 14
• Die Rolle des Thrombozyten bei der Atherosklerose	Seite 14-15
• Thrombozyten-Endothel Interaktion	Seite 15
• EMMPRIN	Seite 16
• EMMPRIN und Cyclophilin A	Seite 17
• Cyclophiline	Seite 18-19
• Cyclophilin A	Seite 19-21
• Fragestellung	Seite 21
2.) Material und Methoden	Seite 22-27
3.) Ergebnisse	Seite 28-47
4.) Diskussion	Seite 48-55
5.) Zusammenfassung	Seite 56-57
6.) Literaturverzeichnis	Seite 58-63
7.) Anlagen	Seite 64

Verzeichnisse

Abkürzungsverzeichnis

Å	:	Ångström
ACS	:	akutes Koronarsyndrom
ADP	:	Adenosindiphosphat
BNP	:	B-natriuretisches Peptid
Ca.	:	Circa
Ca ²⁺	:	Kalzium
CCS	:	chronisches Koronarsyndrom
CD36	:	Thrombozytenglykoprotein 4
CRP	:	C-reaktives Protein
CsA	:	Cyclosporin A
CyPA	:	Cyclophilin A
eCyPA	:	extrazelluläres Cyclophilin A
iCyPA	:	intrazelluläres Cyclophilin A
EKG	:	Elektrokardiographie
EMMPRIN	:	extrazellulärer Matrix-Metalloproteinasen-Induktor
ELISA	:	Enzymgebundenes-Antikörper-Nachweisverfahren
E-Selektin	:	Endothel-Selektin
FACS	:	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
GP	:	Glykoprotein
HR	:	Hazard Ratio
HSPG	:	Heparansulfat-Proteoglykane
ICAM-1	:	intrazelluläres Adhäsionsmolekül-1
IgG	:	Immunglobulin G
Ka ⁺	:	Kalium
kDa	:	Kilodalton
KI	:	Konfidenzintervall
KMK	:	Kaplan-Meier-Kurve
KHK	:	Koronare Herzkrankheit
LDL	:	Lipoprotein niederer Dichte
LVEF	:	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
M-CSF	:	Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
MMPs	:	Matrix-Metalloproteinasen
MT1-MMP	:	Membran-Typ-1 Matrix-Metalloproteinase
MFIs	:	mittlere Fluoreszenzintensität
Na ⁺	:	Natrium
NFAT	:	nuklearer Faktor aktivierter T-Zellen
NO	:	Stickstoffmonoxid
P2Y	:	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
P2X	:	Ionenkanal
Par	:	Protease-aktivierte Rezeptoren

PECAM-1	:	Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül
ROS	:	oxidativer Stress
SMC	:	glatte Muskelzelle
SNP	:	Einzelnukeotid-Polymorphismus
SRA	:	Scavenger-Rezeptor A
TRAP	:	Thrombinrezeptor-aktivierendes Peptid
VCAM-1	:	Gefäßzelladhäsionsmolekül-1
VSMCs	:	glatte Gefäßmuskelzellen
vWF	:	von-Willebrand-Faktor

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1) CyPA induzierte Thrombozytenaktivierung	Seite 17
Abbildung 2) Rolle des extrazellulären und intrazellulären CyPA	Seite 21
Abbildung 3) Schema Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung	Seite 25
Abbildung 4) Kaplan-Meier-Kurve, kombinierter Endpunkt	Seite 36
Abbildung 5) Kaplan-Meier-Kurve, Tod	Seite 38
Abbildung 6) Kaplan-Meier-Kurve, Myokardinfarkt	Seite 40
Abbildung 7) Kaplan-Meier-Kurve, ischämischer Schlaganfall	Seite 41
Abbildung 8) Kaplan-Meier-Kurve, Blutung	Seite 43

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1) Übersicht Thrombozytenrezeptoren und entsprechende Liganden	Seite 12
Tabelle 2) Basischarakteristika Gesamtpatientenkollektiv	Seite 29-30
Tabelle 3) Basischarakteristika für CyPA ≤ Median und CyPA > Median	Seite 31-32
Tabelle 4) Ereignis- und Inzidenzrate pro 100 Personenjahre	Seite 33-34
Tabelle 5) Cox-Regressionsanalyse, kombinierter Endpunkt	Seite 45
Tabelle 6) Cox-Regressionsanalyse, Tod	Seite 46
Tabelle 7) Cox-Regressionsanalyse, Myokardinfarkt	Seite 47

Einleitung

Ätiologie und Epidemiologie der KHK

Die koronare Herzkrankheit (KHK) stellt sich trotz moderner Diagnostik und Therapie als die häufigste Todesursache in den Industrienationen dar. In den Vereinigten Staaten von Amerika ist einer von vier Todesfällen durch eine Herzkrankheit bedingt. Dabei waren bei 75% der Myokardanfälle Plaquerupturen für das klinische Ereignis verantwortlich (Pahwa u. a. 2019). Auch in Europa sind die Zahlen an kardiovaskulär bedingten Todesfällen beachtlich. Durchschnittlich alle acht Sekunden verstirbt auf dem europäischen Kontinent ein Patient an einem kardiovaskulär bedingten Ereignis (Schmied 2018). Die KHK stellt eine entzündliche Manifestation der großen kardiovaskulären Gefäße dar. Mögliche klinische pathologische Ereignisse können ein auftretendes akutes Koronarsyndrom, wie der Myokardinfarkt oder aber auch eine instabile Angina pectoris sein. In den letzten Jahrzehnten konnten die therapeutischen Mittel zwar immer wieder aktualisiert und verbessert werden, jedoch bringt die aktuelle medikamentöse Therapie der an KHK leidenden Patienten mit beispielsweise Betablockern, Statinen und Aspirin keinen befriedigenden Erfolg für die Mehrheit dieser Patienten (Malakar u. a. 2019). Um eine bessere Vorhersagbarkeit potentiell auftretender kardiovaskulärer Ereignisse zu ermöglichen, bedarf es der genaueren Betrachtung spezieller Biomarker. Die bereits bekannten Biomarker, wie das CRP, BNP, oder Fibrinogen können einen Hinweis anhand ihrer Plasmakonzentration geben. Doch sind diese Werte im Allgemeinen bei entzündlichen Vorgängen erhöht. Aus diesem Grund müssen für die Bewertung des individuellen Patientenrisikos zielführende Biomarker hinzugezogen werden (Ohtsuki u. a. 2017). Cyclophilin A (CyPA) stellt mit seinem sowohl intrazellulären, als auch extrazellulären Vorkommen einen interessanten Biomarker dar. Einige Studien haben bereits auf die pathologische Eigenschaft des CyPA bezüglich Herz-Kreislauf-Erkrankungen hingewiesen (Sato u. a. 2010).

Pathophysiologie der Atherosklerose

Der Begriff der Atherosklerose lässt sich aus dem Griechischen ableiten und bedeutet Verdickung der arteriellen Intima und eine dortige Ansammlung von Fett. Dabei lässt sich das Wort Atherosklerose noch weiter in Atherosis und Sklerose unterteilen. Die Atherosis steht dabei für die Ansammlung von Fett in Flankierung weiterer Makrophagen und Sklerose für eine Fibroseschicht, die aus glatten Muskelzellen, Leukozyten und Bindegewebe gebildet wird (Rafieian-Kopaei u. a. 2014).

Dabei spielen die „fatty streaks“, die Fibrose der Intima, die Proliferation der VSMCs (glatte Gefäßmuskelzellen), die Migration der Monozyten in die Gefäßwand und deren anschließende Umwandlung durch den Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (M-CSF) zu Makrophagen eine besondere Rolle. Dies stellt das zelluläre Bild auf den Entzündungsreiz dar (Napoli u. a. 1997) (Pahwa u. a. 2019) (Rafieian-Kopaei u. a. 2014). Mehrere Studien belegen, dass es sich bei einer Atherosklerose um einen entzündlichen chronischen Prozess handelt, aus dem sich bei der Loslösung einer gebildeten Plaque ein kritisches klinisches Ereignis entwickeln kann. Die Migration der Leukozyten erfolgt durch eine vorhergehende Chemotaxis, dem Selektin-vermittelten „Rolling“ über das Endothel, der Adhäsion und der transendothelialen Diapedese (Weber u. a. 2011) (Lusis 2000). Zu den prädisponierenden Faktoren, die eine Entstehung der Atherosklerose begünstigen, zählen unter anderem der Nikotinabusus, Diabetes mellitus, Hypertonie und die Dyslipoproteinämie (Pahwa u. a. 2019) (Bergheanu u. a. 2017).

Ein ansteigender Cholesterinwert erhöht die Permeabilität der Gefäßendothelien, wobei die Hypercholesterinämie als hervorzuhebender Faktor zu nennen ist. Vorausgegangene Studien zeigen, dass mütterliche Hypercholesterinämie zu einer deutlich vermehrten Ausbildung von „fatty streaks“ bereits beim Fötus führt (Singh u. a. 2002).

Durch die erhöhte Permeabilität kommt es zu einem gesteigerten Einwandern von Lipiden. Einen großen Anteil der Lipide macht dabei das Low Density Lipoprotein (LDL) aus (Bergheanu u. a. 2017). Die Größe und Komplexität der

entstehenden Läsion nimmt mit der Einwanderung weiterer LDL zu (Stary u. a. 1994). Lipoproteine bestehen aus Phospholipiden, Proteinen und Lipiden. Dabei haben die LDL einen besonders hohen Stellenwert beim Progress der Atherosklerose. In verzweigten oder gekrümmten Arterienbereichen stellen die Endothelzellen sich nicht elyptisch dar (wie in Arterien mit gleichmäßiger und laminarer Strömung), sondern polygonal. Dies führt in diesem Bereich ebenfalls zu einer erhöhten Permeabilität für LDL und damit zur möglichen Entstehung einer neuen Läsion (Lusis 2000). Bei der beginnenden Atherosklerose kommt es zu einer Akkumulation des im subendothelial liegenden LDL. Diese ist umso höher, je höher die LDL Konzentration im Blut ist und der Transport und die Retention im Bereich der Läsion zunehmen (Lusis 2000). Dabei wird das LDL von Proteoglykanen eingeschlossen und es erfolgt eine Lipidoxidation. Oxidiertes LDL führt zu einer verminderten NO Produktion, welches die antiatherogene Eigenschaft des NO, die Vasodilatation, herabsetzt. Außerdem kommt es zur folgenden Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle wie E-Selektinen, P-Selektinen, VCAM-1 und PECAM-1. Durch die Lipidoxidation kommt es zur weiteren Monozyten- und Lymphozyten Rekrutierung, als auch zur Produktion von Zytokinen (Singh u. a. 2002) (Lusis 2000). Dabei stellt die Zellproliferation in der Intimaschicht das typische Bild der initialen Veränderung der Erkrankung dar (Murata u. a. 1986). Die Aufnahme des modifizierten LDL erfolgt über den CD36- oder SRA-Rezeptor der Makrophagen, welche zu einer Umwandlung in Schaumzellen führt (Pahwa u. a. 2019). Zu der ersten sichtbaren Läsion der Atherosklerose zählt der „fatty streak“ in der Intima, was durch Human- und Tierstudien bereits bewiesen wurde (Lusis 2000). Die „fatty streaks“ entstehen durch Schaumzellen in der Intima. Nach der Lipidaufnahme entwickeln sich die Makrophagen zu Schaumzellen und bilden einen flächigen Teppich, der als Zeichen einer etablierten Atherosklerose steht (Crowther 2005). Zuvor muss es allerdings zu einer Lipidoxidation gekommen sein, da die Makrophagen nicht oxidiertes LDL nicht schnell genug aufnehmen.

Die mit der Zeit zu Grunde gehenden Schaumzellen bilden den nekrotischen Kern und die von der Media einwandernden SMCs tragen mit der fibrösen Fasersekretion zum Wachstum der Läsion bei. Das anfängliche adventitiär

gerichtete Wachstum wechselt mit der Zeit zu einem lumenwärtigen Wachstum, was zu einer Einengung führt. Die SMC und extrazelluläre Matrix bilden eine die Läsion umgebende Faserkappe. Es kommt zu einem Einwandern von Lymphozyten und Monozyten, welche als T-Lymphozyten und Makrophagen durch ihre Zytokine für eine fortschreitende SMC-Proliferation und wachsende Extrazellulärmatrix sorgen.

Kalziumablagerungen und Fibrosierung führen zu einer Sklerose und der daraus folgenden Arterienverkalkung (Lusis 2000) (Rafieian-Kopaei u. a. 2014).

Thrombozytose und Morphologie

Der Thrombozyt (Blutplättchen) wurde 1882 von Giulio Bizzozero entdeckt und stellt einen wichtigen Entzündungsmarker dar (Ghoshal u. a. 2014). Thrombozyten haben einen Durchmesser von 2-4 μm und keinen Zellkern, weshalb sie auch als „anukleäre Zellen“ bezeichnet werden. Rund ein Drittel aller Thrombozyten befinden sich in Leber und Nieren und stehen im ständigen Austausch mit zirkulierenden Thrombozyten (Gawaz 2001:4).

Die Entwicklung des Thrombozyten erfolgt durch einen Abspaltungsprozess aus dem Megakaryozyten, welcher sich, wie alle Zellen des Blutes, aus einer multipotenten hämatopoetischen Stammzelle entwickelt (Aumüller u. a. 2010:137–138). Thrombozyten zirkulieren ca. 10 Tage im Blutkreislauf und werden danach in der Leber oder der Milz abgebaut (Lüllmann-Rauch 2009:268–270). Aus einem Megakaryozyten spalten sich bis zu 500 Thrombozyten ab. Kommt es zu einer Gefäßverletzung, so erfolgt der primäre Wundverschluss durch die Aggregation mit vielen weiteren Thrombozyten. Thrombozyten können in einem ruhenden und aktivierten Zustand vorliegen. Im ruhenden Zustand haben die Thrombozyten eine glatte Oberfläche und erscheinen leicht oval und flach. Sobald es zu einer Aktivierung der Thrombozyten, wie durch ADP oder Thrombin kommt, verändert sich ihr äußeres Erscheinungsbild und sie bilden Pseudopodien aus, welche ihnen die

Aggregation mit anderen Thrombozyten ermöglichen. Dabei kommt es zu einer Oberflächenvergrößerung von $8 \mu\text{m}^2$ (ruhender Zustand) auf $13 \mu\text{m}^2$ (aktivierter Zustand) (Klinke u. a. 2005:245–247) (Gawaz 2001:4).

Aufbau eines Thrombozyten

Bei der genauen Betrachtung des Aufbaus eines Thrombozyten lassen sich vier verschiedene Bereiche charakterisieren, wobei jedem eine funktionelle Bedeutung zukommt:

- Periphere Zone
- Strukturelle Zone
- Organellenzone
- Bereich des Membransystems

(Gawaz 2001:4)

Periphere Zone: Eine nach extrazellulär gerichtete Glykokalix aus Proteinen, Glykoproteinen und Mukopolysacchariden ermöglicht durch die verschiedenen Rezeptoren eine Kommunikation mit z.B. anderen Thrombozyten, Leukozyten oder dem Endothel (Pöttsch u. a. 2010:18-22).

Strukturelle Zone: In ihr befinden sich zahlreiche Mikrotubuli. In der ruhenden Phase des Thrombozyten sorgt die strukturelle Zone für die dyskoide Form. Aktin- und Myosinfilamente stehen mit den Zellorganellen in Verbindung und sorgen bei der Aktivierung für eine Formveränderung des Thrombozyten (Gawaz 2001:6).

Organellenzone: Diese bildet die Mitte des Thrombozyten. In ihr befinden sich die für Thrombozyten charakteristische α -Granula, die dichte Granula und die Lysosomen (Gawaz 2001:6) (Geraldo u. a. 2014).

Membransystem: Das Membransystem besteht aus einem offenen kanalikulären und einem dichten tubulären System. Dort befindet sich ein Speicher für Ca^{2+} , welcher beim Überschreiten einer bestimmten zytoplasmatischen Ca^{2+} Konzentration für die Kontraktilität und die Degranulierung der Thrombozyten sorgt (Gawaz 2001:6-8) (Geraldo u. a. 2014).

Tabelle 1: Übersicht Thrombozytenrezeptoren und entsprechende Liganden (modifiziert nach Niemeyer u. a. 2017:115-118 und Schmidt u. a. 2008:302-309).
 Abkürzungen: GP = Glykoprotein ; Par = Protease-aktivierte Rezeptoren ; vWF = von-Willebrand-Faktor ; ADP = Adenosindiphosphat ; Na^+ = Natrium ; Ka^+ = Kalium ; Ca^{2+} = Kalzium ; P2Y = G-Protein-gekoppelter Rezeptor ; P2X = Ionenkanal ; EMMPRIN = extrazellulärer Matrix-Metalloproteinasen-Induktor

Thrombozytenrezeptoren	Liganden
GPVI	Kollagen
$\alpha_{IIb}\beta_{III}$ (GPIIb/IIIa)	Fibrinogen
GPIb/V/IX	vWF
Par – 1	Thrombin
Par – 4	Thrombin
$\alpha_2\beta_1$ (GPIa/IIa)	Kollagen
P2Y ₁₂	ADP
P2Y ₁	ADP
P2X ₁	Na^+ , Ka^+ , Ca^{2+}
EMMPRIN	Cyclophilin A

Aktivierung der Thrombozyten

Auf der Oberfläche der Thrombozyten befindet sich ein spezieller Glykoproteinkomplex, welcher die Verbindung der Thrombozyten mit freiliegender Kollagen ermöglicht. Dabei kommt den oberflächlichen Integrinen nicht nur die Aufgabe einer Bindung mit den Kollagenfasern zu, sondern auch die Thrombozytenaggregation, die Kommunikation mit Leukozyten und außerdem der Kontakt mit der subendothelialen Matrix (Roskamm u. a. 2013:903). Kommt es zu einer Gefäßverletzung, sezerniert das verletzte Endothel unter anderem das Protein von-Willebrand-Faktor. Die durch die Verletzung freiliegenden Kollagenfasern bieten die Anheftungsstellen für die Thrombozyten. Der Thrombozyt heftet sich durch den von-Willebrand-Faktor, Fibronektin und Laminin an die Kollagenfasern. Daraufhin erfolgt die Aktivierung der Thrombozyten. Während dieser Aktivierung durchläuft der Thrombozyt drei Stadien:

1. → Sekretion von Agonisten
2. → Formveränderung mit der Ausbildung langer Pseudopodien
3. → Aggregation weiterer aktivierter Thrombozyten

Durch diesen Prozess kommt es zu der Ausbildung eines Pfropfes (Klinke u. a. 2005:245–247).

Der Effekt der positiven Rückkopplung ermöglicht ein vermehrtes Vorkommen aktivierter Thrombozyten. Das sezernierte granuläre ADP bindet nun an die thrombozytären Rezeptoren $P2Y_1$ und $P2Y_{12}$ und bewirkt dadurch eine Expression des GPIIb/IIIa Rezeptors, welcher wiederum mit Thromboxan A₂ eine Aggregation der aktivierten Thrombozyten ermöglicht (Saad & Schoenberger 2019).

Rolling

Vor über 150 Jahren wurde bereits beschrieben, dass Blutzellen über das Endothel von Venolen rollen. Das hauptsächliche Adhäsionsmolekül P-Selektin lässt sich in der Speichergranula von Thrombozyten und Endothelzellen finden und ist, durch die Weibel-Palade-Körperchen exprimiert, erforderlich für das Thrombozytenrolling. Der Aktivitätszustand der Thrombozyten spielt dabei keine Rolle (Frenette u. a. 1995). Die kurze Anbindung des Thrombozyten an das Endothel führt zu einer langsameren Fließgeschwindigkeit und Fortbewegung selbiger. Eine Verringerung der Scherkraft wird dadurch aber nicht initiiert. Auf das Rolling folgt eine dezente Integrin-vermittelte Adhäsion, welche durch ein entzündlich aktiviertes Endothel angeregt wurde. Das Rolling über das Endothel führt zu einer Aktivierung der Endothelzellen und der Thrombozyten selbst. Durch deren beider Aktivierung erfolgt eine beidseitige chemokine Wirkung (Lindemann u. a. 2007).

Die Rolle des Thrombozyten bei der Atherosklerose

Thrombozyten spielen nicht nur bei der Hämostase eine wichtige Rolle, sondern haben auch bei der Entstehung der Atherosklerose eine besondere Stellung (Davi u. a. 2007) (Lindemann u. a. 2007). Bereits bei Kindern und jungen Erwachsenen wurden auf arteriellem Endothel ohne fortgeschrittene Läsionen mikroskopische Ablagerungen von Thrombozyten und Fibrin entdeckt. Diese Beobachtung bestätigt die Annahme, dass Thrombozytenablagerungen den Beginn einer Atherosklerose darstellen können (Stary u. a. 1994). Dass Thrombozyten einen großen Anteil als entzündungsfördernde Zellen tragen, spiegelt die große Menge an sezernierten Mediatoren wider, welche eine Interaktion mit Leukozyten und dem Endothel ermöglichen. Die Thrombozytenadhäsion am Endothel bewirkt eine Monozyteneinwanderung auf der Entzündungsseite. Diese lipidreichen Schaumzellen führen zu der Entwicklung einer atherosklerotischen Plaque, welche wiederum zu einer

erhöhten Aktivität der Matrix-Metalloproteinasen unterhalb der Plauekappe führt. Schließlich kommt es zu einer Plaqueruptur und die nun freiliegende Matrix kann mit den im Blut zirkulierenden Thrombozyten kommunizieren. Die Kommunikation bewirkt eine Aktivierung der Thrombozyten und veranlasst die Thrombozytenaggregation, welche zu einem thromboembolischen Verschluss führt und somit das Eintreten eines Myokardinfarkts oder Schlaganfalls negativ begünstigt (Lindemann u. a. 2007).

Thrombozyten-Endothel Interaktion

Obwohl sich Thrombozyten und Endothelzellen grundlegend unterscheiden, haben sie die Gemeinsamkeit, aus einer Vorläuferzelle zu entstammen. Dies zeigt sich darin, dass z.B. beide ihr bioaktives Material intrazellulär in Granulat speichern (Ghoshal u. a. 2014). Die Thrombozyten-Endothel Interaktion mit dem aktivierten Endothel bewirkt nachfolgende Schritte:

1. Thrombozytenrolling vermittelt durch GPIb-IX-V mit dem vWF und dem P-Selektin
2. Der Adhäsion durch $\alpha_{IIb}\beta_3$ mit endothelialen $\alpha_v\beta_3$ (durch den vWF, Fibrinogen, oder Fibronectin) und ICAM-1 (durch Fibrinogen). Bei höheren Scherkräften erfolgt eine zusätzliche Bindung des Kollagens an GPVI und ermöglicht eine mechanische Adhäsion.
3. Die Thrombinstimulation, weitere Thrombozytenaktivierung und Bildung eines stabilen Thrombus durch die Fibrinogenbindung des $\alpha_{IIb}\beta_3$ Integrins (Coenen u. a. 2017) (Nording u. a. 2015).

EMMPRIN

Bei dem extrazellulären Matrix-Metalloproteinasen-Induktor (EMMPRIN) handelt es sich um ein zur Familie der Immunglobuline gehörendes Transmembranprotein. Dieses findet sich unter anderem auf Oberflächen von Tumorzellen, Makrophagen, Monozyten, Schaumzellen und Thrombozyten wieder. Innerhalb der Thrombozyten wird es in der α -Granula gespeichert. Das Transmembranprotein stimuliert die Produktion von Matrix-Metalloproteinasen. EMMPRIN trägt außerdem die Namen Basigin, CD147, „tumor collagenase stimulatory factor“ (TCSF), OX-47, Neurothelin oder Hab18G. Entdeckt wurde es vor über 35 Jahren auf dem Forschungsgebiet der Tumorthherapie (Nawroth u. a. 2008) (Guo u. a. 2000) (Nawroth u. a. 2010) (Schmidt u. a. 2008) (Zierfuss 2017). EMMPRIN kann in der häufigeren Isoform mit zwei Immunglobulindomänen, oder der Isoform, mit drei Immunglobulindomänen vorliegen. Die Isoformen ergeben sich durch das unterschiedliche Spleißen und die verschiedenen Transkriptionsinitiationsstellen. Die Codierung für EMMPRIN befindet sich auf dem 19. Chromosom und besteht aus zehn Exons. Die Molekülmasse des EMMPRINs beträgt 29 kDa (Muramatsu 2016) (Iacono u. a. 2007).

EMMPRIN spielt bei vielen Prozessen wie der Entwicklung des Fötus, Neuronen, Lymphozyten, der Fähigkeit des Sehens und der Spermio-genese eine wichtige Rolle. Außerdem trägt es auch einen Anteil an der Entwicklung pathologischer Veränderungen wie Schlaganfall, Alzheimer, Herzerkrankungen und Krebs bei (Iacono u. a. 2007) (Muramatsu 2016). In einer Mausmodellstudie wurde gezeigt, dass die Abwesenheit eines EMMPRIN Liganden zu einem geringeren Vorkommen an inflammatorischen Zellen in Plaques und einer geringeren atherosklerotischen Last führte. Des Weiteren wurde während des klinischen Ereignisses eines akuten Myokardinfarktes vermehrt exprimiertes EMMPRIN beobachtet (Zierfuss 2017).

EMMPRIN und Cyclophilin A

Dockt extrazelluläres CyPA (eCyPA) an oberflächlichem thrombozytären EMMPRIN an, so führt dies zu einer Initiierung eines Entzündungsweges, einer verbesserten Adhäsion und somit zu einer Thrombenbildung. Diese Thrombozytenaktivierung erfolgt unabhängig von intrazellulärem CyPA. In unterschiedlichen Tierstudien wurde der Zusammenhang des Entzündungsausmaßes in Korrelation mit dem Zusammenspiel von EMMPRIN und CyPA festgestellt. Daraus ging hervor, dass eine erhöhte extrazelluläre CyPA Konzentration ein erhöhtes Maß einer Entzündung zur Folge hat. Ebenfalls wurde gezeigt, dass es durch die oberflächliche EMMPRIN Blockade durch Antikörper zu einer Herabsetzung der Entzündung kam. Das Ausmaß der oberflächlichen EMMPRIN Expression hängt dabei mit dem pathologischen Zustand der Koronararterien zusammen (Seizer u. a. 2014) (Seizer u. a. 2015).

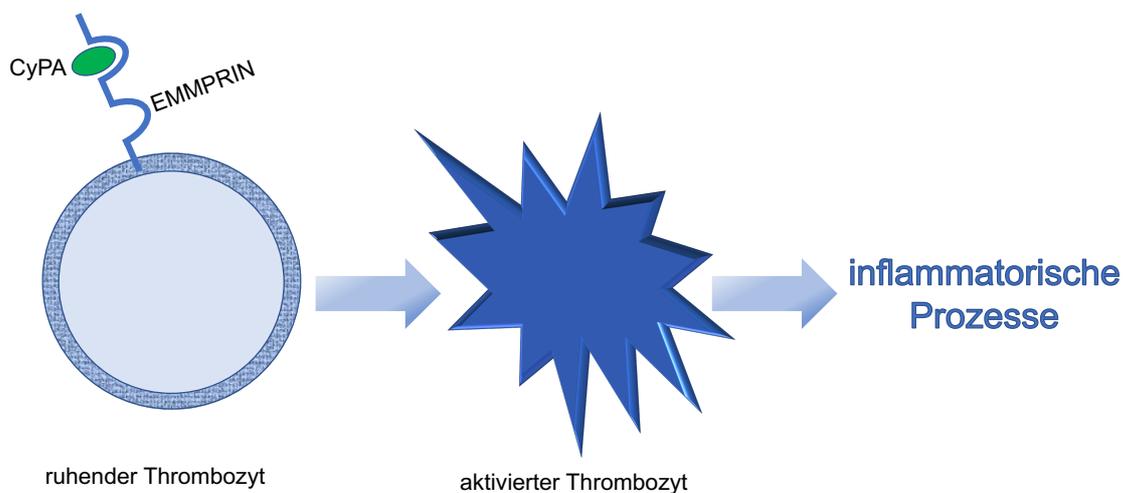


Abbildung 1: CyPA induzierte Thrombozytenaktivierung
(modifiziert nach Arce u. a. 2019 und Seizer u. a. 2014)
CyPA = Cyclophilin A ; EMMPRIN = extrazellulärer Matrix-Metalloproteinasen-Induktor

Cyclophiline

Cyclophiline sind Proteine und kommen in jeder prokaryontischen und eukaryontischen Zelle vor (Nigro u. a. 2013). Diese zeichnen sich durch ihre Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase Aktivität (PPIase) aus. In menschlichen Zellen finden sich bis zu 18 verschiedene Cyclophilin-Proteinarten (Xue u. a. 2018). Dabei besteht jedes Cyclophilin aus 106 Aminosäuren und ist von weiteren Domänen umgeben, welche jedem Cyclophilin seine charakteristischen Eigenschaften verleihen (Wang u. a. 2005). Cyclophiline haben einen kugeligen Aufbau mit einem Gesamtradius von 17 Å. Im Inneren befinden sich die meisten hydrophoben Seitenketten (Kallen u. a. 1991). Die Peptidbindung und ihr partieller Doppelbindungscharakter ermöglicht das Vorliegen in einer energetisch günstigeren trans-Form, wobei sich die Ketten um 180° gegenüber befinden, oder in der cis-Form, bei der die Seitenketten sich auf der gleichen Seite befinden. Da Peptidyl-Prolyl Bindungen häufig in der cis-Form vorliegen, erfordert die spontane Isomerisierung Energie und läuft sehr langsam ab. Somit wird ein schneller Faltungsprozess behindert. Als Übergangsstabilisatoren und Beschleuniger fungieren dabei die Cyclophiline bei der cis-trans-Isomerie der Proteine (Wang u. a. 2005). Jedes Cyclophilin besitzt die konservierte Cyclophilin-like-Domäne (CLD). Aufgrund ihrer Fähigkeit an immunsuppressive Moleküle binden zu können, werden Cyclophiline als Immunophilinie bezeichnet (Kumari u. a. 2013). Eine acht mal antiparallele beta-Faltblattstruktur und zwei entgegengepackte alpha-Helices liegen in jedem Cyclophilin vor (Davis u. a. 2010). Intrazellulär dienen die Cyclophiline als Rezeptoren für das immunsupprimierende Cyclosporin A (CsA) (Nigro u. a. 2013). Dabei wirkt CyPA besonders als intrazelluläres Bindungsprotein auf CsA, was bereits 1984 festgestellt wurde. CsA wirkt der Abstoßung von Organtransplantaten und der T-Zellaktivierung entgegen. Der CyPA-CsA-Komplex erzeugt eine immunsupprimierende Wirkung. Die Intensität der Immunsuppression hängt dabei von der Stärke des Bindungscharakters des CyPA-CsA-Komplexes mit Calcineurin ab, welches in dieser Konstellation nicht

den NFAT (nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen) der T-Zellen aktiviert (Seizer u. a. 2014) (Kallen u. a. 1991).

Cyclophilin A

Cyclophilin A (CypA) ist das prozentual am häufigsten vorkommende Cyclophilin (Watashi u. a. 2007). CyPA spielt bei vielen zellulären Prozessen, wie der Immunmodulation, dem zellulären Transport, Zellsignalen und der Proteinfaltung eine wichtige Rolle (Chen u. a. 2016). Neuere Studien haben gezeigt, dass CyPA nicht nur als intrazelluläres Protein agiert, sondern auch als Reaktion auf entzündungsbedingte Reize, oxidativen Stress und Hypoxie von Zellen sezerniert werden kann. Dabei hat das CyPA selbst ebenfalls entzündungsfördernde Eigenschaften und wirkt extrazellulär vorkommend auf die Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen (VSMCs) und des Weiteren stark chemotaktisch (u. a. durch Stimulation des CD-147-Rezeptors) auf Monozyten, Lymphozyten und Leukozyten (Nigro u. a. 2013). Weitere pathologische Eigenschaften des CyPA zeigen sich an der Steigerung des oxidativen Stresses, Entstehung von Gefäßerkrankungen, der Interaktion mit dem humanen Immundefizienzvirus (HIV) und der rheumatoiden Arthritis. Ein besonderer Zusammenhang und als Hinweis auf seine Rolle bei malignen Tumoren wurde das Ausmaß der CyPA Expression, welches mit dem Schweregrad der Krebserkrankung korreliert, erforscht (Chen u. a. 2016). Die Thrombozytenaggregation und Hämostase werden ebenfalls von CyPA beeinflusst (Wang u. a. 2014). Der Plasmaanteil des CyPA ist umso höher, je höher der anatomische Schweregrad einer z.B. stabilen Koronararterienkrankheit ist. Eine vermehrte Endothelzellaktivierung, Gefäßwandentzündung und eine erhöhte Monozytenrekrutierung sind ebenfalls auf das CyPA zurückzuführen (Ramachandran u. a. 2016). Durch seine katalytische Eigenschaft der Proteinfaltung reguliert das CyPA die Thrombozytenaktivierung, die Zellteilung und die T-Zelldifferenzierung. Dabei agiert das CyPA sowohl bei der ursprünglichen Proteinfaltung, als auch

bei der Proteinrückfaltung. Eine erleichterte Kommunikation zwischen dem Integrin $\alpha_{IIb}\beta_{III}$ und dem Zytoskelett der Thrombozyten wird durch den erhöhten Kalziumeinstrom durch die Initiierung des CyPA erreicht (Xue u. a. 2018). Wie zuvor beschrieben, bindet CyPA an das oberflächlich exprimierte EMMPRIN. Vor dieser Verbindung steht jedoch eine andere Interaktion. Die auf der Zelloberfläche sitzenden HSPGs (Heparansulfat-Proteoglykane) stellen die primäre Bindungsstelle für CyPA dar, welche als Voraussetzung für die anschließende Bindung des CyPA an EMMPRIN gilt (Yurchenko u. a. 2006). Neue Erkenntnisse aus der aktuellen Forschung zeigen, dass CyPA als moderner Biomarker für KHK herangezogen werden kann (Xue u. a. 2018). Erhöhte eCyPA Werte wurden bei den klinischen Ereignissen wie instabiler Angina pectoris und akuten Myokardinfarkten festgestellt (Yan u. a. 2012). In einer Studie wurden erhöhte extrazelluläre CyPA Werte bei einem akuten ischämischen Schlaganfall klinisch nachgewiesen. Dabei war bei den stationär aufgenommenen Patienten mit hohem Blutdruck prozentual mehr eCyPA vorzufinden, als bei den Patienten mit normalem Blutdruck. Das gleiche konnte bei hypertensiven Schlaganfällen (erhöhte Konz. eCyPA) und nicht hypertensiven Schlaganfällen (geringere Konz. eCyPA) beobachtet werden (Chang u. a. 2020).

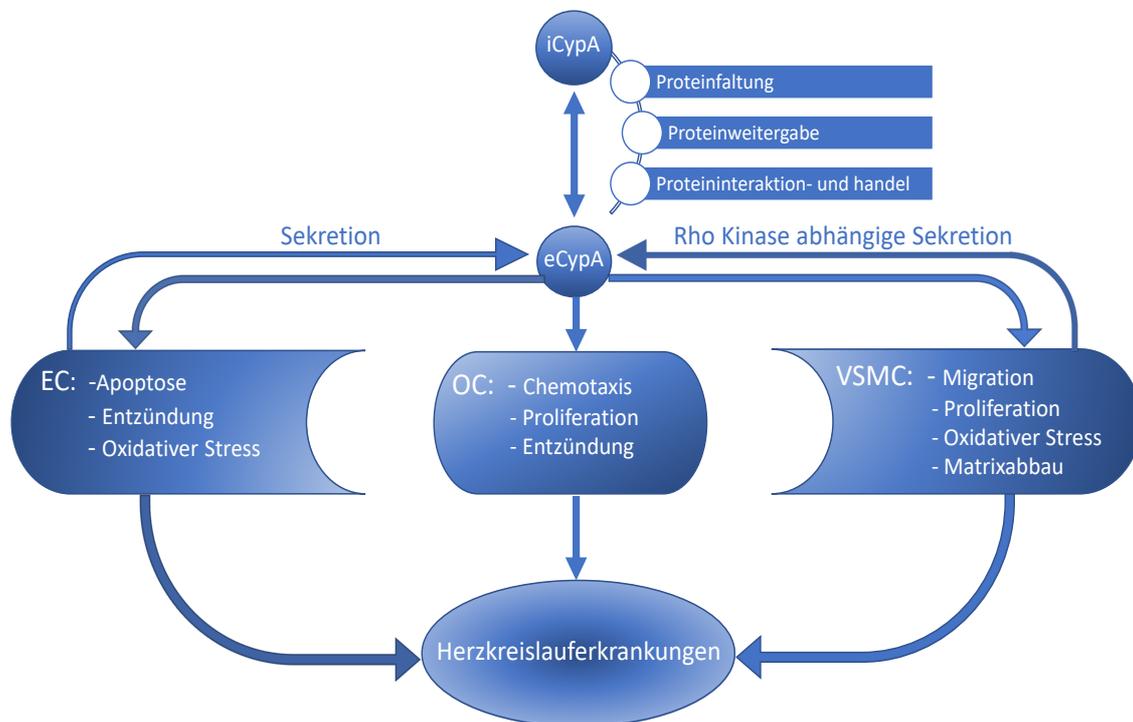


Abbildung 2: Zellspezifische Aspekte des extrazellulären Cyclophilin A auf unterschiedliche Zellen und die Rolle des intrazellulären Cyclophilin A (modifiziert nach Xue u. a. 2018)

EC = endothelial cells = Endothelzellen ; OC = other cells = andere Zellen

VSMC = vascular smooth muscle cell = glatte Gefäßmuskelzelle

iCypA = intrazelluläres Cyclophilin A ; eCypA = extrazelluläres Cyclophilin A

Fragestellung

In der vorliegenden Dissertation sollen mögliche Assoziationen zwischen Thrombozyten-assoziiertem CyPA und kardiovaskulären Ereignissen bei Nachsorgepatienten mit symptomatischer KHK untersucht werden. Die Ergebnisse sollen dazu dienen, um in Zukunft Biomarker-basierte Risikostratifizierungssysteme für erneut auftretende kardiovaskuläre Ereignisse zu erstellen, welche neben anderen Faktoren thrombozytär gebundenes CyPA beinhalten.

Material und Methoden

Patientenkollektiv und Studiendesign

Bei dieser Arbeit handelt es sich um eine prospektive konsekutive klinische Studie.

Die Daten für die Studie entstammen aus einem Patientenkollektiv der kardiologischen Abteilung des Universitätsklinikums Tübingen.

Das Einschlusskriterium für die Studie stellte eine symptomatische KHK dar.

Dabei wurden bei 335 Patienten während einer perkutanen Koronarintervention Blutproben entnommen und diese unverzüglich mittels Durchflusszytometrie auf eine oberflächliche Expression von CyPA und Glykoprotein Ib auf Thrombozyten untersucht.

Nach Studieneinschluss wurden die Patienten nach 1080 Tagen anhand eines Telefoninterviews über aufgetretene Blutungen oder kardiovaskuläre Ereignisse befragt. Die schriftliche Einwilligung für das Telefoninterview erfolgte bereits zu Beginn der Studie. 31 Studienteilnehmer konnten nicht nachverfolgt werden, was einen prozentualen Anteil von 9,2 % von der gesamten Studienkohorte ausmacht.

Der primäre kombinierte Endpunkt ist definiert als das erste Auftreten des Tods und/oder eines neu auftretenden Myokardinfarkts und/oder eines ischämischen Schlaganfalls und/oder einer klinisch relevanten Blutung. Das individuelle Auftreten dieser Ereignisse beschreibt den sekundären Endpunkt.

Die Dissertation soll einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Thrombozyten-assoziierten CyPA und der symptomatischen KHK untersuchen. Diese Ergebnisse sollen in Zukunft dazu dienen, Biomarker-basierte Risikostratifizierungssysteme zu erstellen, um Hochrisikokollektive zu identifizieren und gegebenenfalls stringenter zu behandeln (Rath u. a. 2020).

Erhobene Patientendaten

Alle 304 Patienten (exklusive der aus der Studie ausgeschiedenen Patienten) erfüllten eine oder mehrere der folgenden Kriterien:

Chronisches Koronarsyndrom (CCS) :

- Vermutung einer KHK bei stabiler Angina pectoris mit/ohne Dyspnoe
- Vermutung einer KHK bei linksventrikulärer Dysfunktion oder neu aufgetretener Herzinsuffizienz
- Symptomatische Patienten mit stabilisierten Symptomen oder asymptomatische Patienten nach Revaskularisation oder nach ACS < 1 Jahr
- Symptomatische Patienten mit stabilisierten Symptomen oder asymptomatische Patienten nach Revaskularisation oder > 1 Jahr nach Diagnose einer KHK
- Angina pectoris mit Verdacht auf vasospastische oder mikrovaskuläre Erkrankung
- Durch ein Screening diagnostizierte KHK bei asymptomatischen Patienten

(Knuuti u. a. 2020) (Dürschmied u. a. 2019)

Akutes Koronarsyndrom (ACS) :

- Akuter Myokardinfarkt (STEMI, NSTEMI)
- Instabile Angina pectoris

(Singh u. a. 2020)

Definition der Kriterien:

Akuter Myokardinfarkt → Anstieg und/oder Abfall des kardialen Biomarkers Troponin mit mindestens einem Wert über der Obergrenze der 99ten Perzentile und mit wenigstens einem der folgenden Befunde:

- Ischämiesymptome
- Bildgebender Beweis von Myokardverlust oder neuen Wandbewegungsstörungen
- Entwicklung pathologischer Q-Wellen im EKG
- vermutete oder neue signifikante Veränderung der ST-Segment-T-Wellen
- neuer Linksschenkelblock
- angiographische Identifikation eines intrakoronaren Thrombus

Ischämischer Schlaganfall oder ZNS-Infarkt → durch Ischämie verursachte Zelldegeneration des Rückenmarks, des Gehirns oder der Netzhaut, welche wiederum durch Pathologie oder Bildgebung dargestellt wurden oder rein durch die spezifischen klinischen Symptome, welche mindestens 24 Stunden anhielten oder bis zum Tod führten, identifizierbar waren. Vorausgesetzt, diese konnten keinem anderen Ursprung zugeordnet werden (Sacco u. a. 2013).

Blutungen → klinisch signifikante Blutungen wurden mit Hilfe der BARC-Blutungs-Ergebnisse von Typ 0 – Typ 5 bewertet (Mehran u. a. 2011).

Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS)

Das während der Koronarintervention entnommene Patientenblut wurde innerhalb einer Stunde für die fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS) markiert. Für die FACS-Untersuchung des Blutes wurden 50µl in spezielle FACS-Röhrchen gefüllt. Zuvor wurde das Vollblut 1:50 mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS von Gibco) verdünnt.

Für die 30-minütige Inkubation wurden folgende konjugierte Antikörper verwendet:

- CD42b-PE von BD Bioscience
- CD62p-FITC von Beckman Coulter
- CyPA-FITC mAbs anti-CyPA von Abcam, Cambridge, MA, USA

Die zu untersuchenden Zellen wurden für weitere 30 Minuten doppelt gefärbt. Die Färbung erfolgte entweder mit Thrombinrezeptor-aktivierenden Peptiden (TRAP) oder ADP. TRAP (SFLLRN) und ADP wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen. Zur anschließenden Fixierung wurde 0,5%-iges Paraformaldehyd verwendet. Die fixierten Zellen wurden bei 4°C gelagert, um innerhalb der folgenden 24 Stunden im BD FACSCalibur-Durchflusszytometrie Gerät analysiert zu werden. Durch die nicht durchgeführte Permeabilisierung der Thrombozyten konnte die oberflächliche Expression des CyPA ermittelt werden (Rath u. a. 2020) (Rath u. a. 2014).

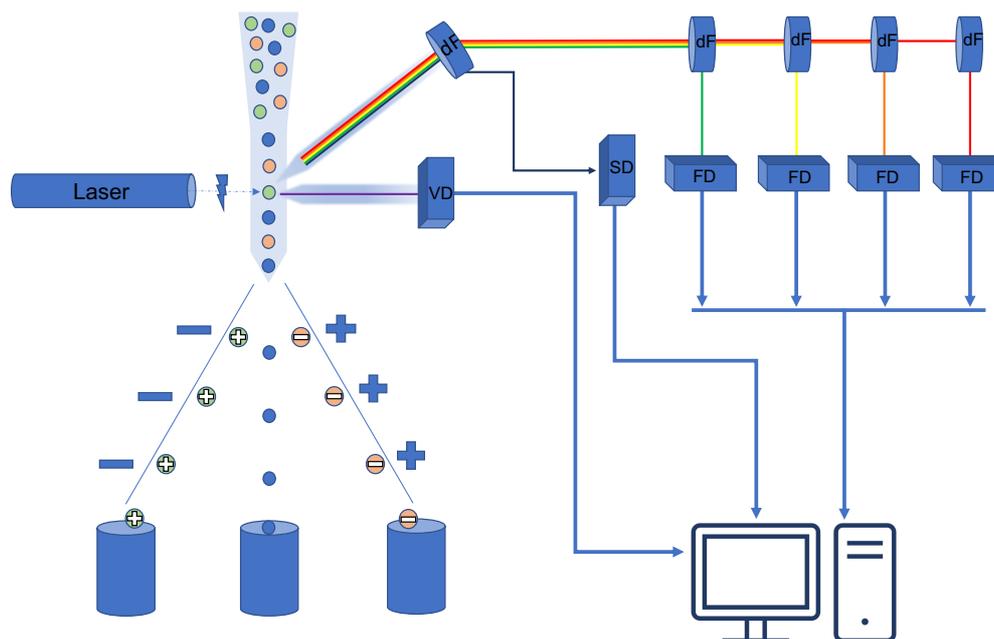


Abbildung 3: Schema Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (modifiziert nach Betters 2015, Jaye u. a. 2012, Hodne u. a. 2015 und Cho u. a. 2010)
dF = dichroitischer Filter ; FD = Fluoreszenz Detektor ; SD = Seitwärtsstreulicht Detektor ; VD = Vorwärtsstreulicht Detektor

Statistische Analyse

Die statistische Analyse in der vorliegenden Arbeit wurde mit dem Statistik Programm SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) Version 25.0 durchgeführt. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFIs) wurde mittels Median mit 25./75. Perzentilen dargestellt. Um den Vergleich der CyPA Werte des chronischen Koronarsyndroms und des akuten Koronarsyndroms zu ermöglichen, wurde der Mann-Whitney U-Test herangezogen. Durch die Erstellung von deskriptiven Kreuztabellen konnte die Verteilung der Endpunkte von CyPA Werten \leq als der Median, oder CyPA Werten $>$ als der Median festgestellt werden. Zusätzlich wurden die Inzidenzraten pro Personenjahre angegeben. Für die vorliegende Arbeit wurden Kaplan-Meier-Kurven, Log-Rang-Tests und Hazard-Ratios für die zensierten Daten verwendet. Eine Dichotomisierung der CyPA Werte erfolgte anhand des Medians. Außerdem erfolgte eine Ermittlung der log CyPA Werte ohne Dichotomisierung. Für die Berechnung von unabhängigen Assoziationen der CyPA Werte mit den Endpunkten wurden multiple COX-Regressionsanalysen berechnet. P-Werte wurden mittels der Bonferroni Korrektur für multiples Testen angepasst (Rath u. a. 2020).

Ethikkommission

Die vorliegende Studie wurde von der institutionellen Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen am 26.12.2017 (Nr. 019/2018BO2, 270/2011BO1 und 238/2018BO2) genehmigt.

Die Genehmigung erfolgte durch Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult. Hans-Peter Zenner.

Sie entspricht den Erklärungen von Helsinki und den Richtlinien für gute klinische Praxis (Directive 2001/20/EC of the European Parliament and of the Council of 4 April 2001 on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the member states relating to the implementation of good clinical practice in the conduct of clinical trials on medicinal products for

human use 2002) (ICH harmonized tripartite guideline: Guideline for Good Clinical Practice 2001) (World Medical Association Declaration of Helsinki. Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects 1997).

Ergebnisse

In Tabelle 2 und Tabelle 3 sind die Basischarakteristika der Studienkohorte ersichtlich. In Tabelle 3 findet eine Unterscheidung in Patienten mit CyPA \leq Median und CyPA $>$ Median statt. Tabelle 4 zeigt die Anzahl der Ereignisse und Inzidenzrate pro 100 Personen pro Jahr. Nicht aufgeführt sind die 31 Patienten, welche innerhalb der drei Jahre aus der Studie ausgeschieden sind. Die Kaplan-Meier-Kurven 1 - 5 zeigen die Überlebenszeitanalysen für die Ereignisse kombinierter Endpunkt, Tod, Myokardinfarkt, ischämischer Schlaganfall und Blutung. Die Cox-Regressionsanalysen in tabellarischer Darstellung 5 - 9 zeigen die gleichen Endpunkte, welche auch in den Kaplan-Meier-Kurven dargestellt werden.

Tabelle 2) Basischarakteristika Gesamtkollektiv

Das Durchschnittsalter der Studienteilnehmer lag bei 68.6 Jahren, wobei eine Altersvarianz von 11.4 Jahren als Standardabweichung gegeben war.

Hervorzuheben ist dabei der größere Anteil an männlichen Studienteilnehmern von 70.4% (214 Patienten). Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion stellte sich mit dem Wert von 50.4% leicht eingeschränkt dar.

Für die Kategorie der kardiovaskulären Risikofaktoren kristallisierte sich insbesondere die arterielle Hypertonie mit 257 Patienten (84.5%) heraus. Gefolgt wurde diese von 189 Patienten (62.2%) mit einer Hyperlipidämie.

Einen Nikotinabusus zeigten 131 Patienten (43.1%) und mehr als ein Drittel (34.5%) waren an Diabetes Typ II erkrankt.

Zu den am häufigsten verabreichten Medikamenten in der Studienkohorte zählten Betablocker (59.5%), ASS (58.9%) und Statine (52.9%). 135 Patienten (44.4%) standen unter einer ACE-Hemmer-Therapie. Geringere Prozentzahlen machten Medikamente wie Ca-Kanal-Blocker (20.4%), AT1-Antagonisten (19.1%), Clopidogrel (13.2%), Ticagrelor (4.9%) und Prasugrel (1.9%) aus.

Zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses litten 156 Patienten (51.3%) an einem akuten und weitere 148 Patienten (48.7%) an einem chronischen Koronarsyndrom. Prozentual unterschieden sich diese beiden Gruppen lediglich um 2.7%.

Tabelle 2: Basischarakteristika Gesamtpatientenkollektiv

Abkürzungen: SA = Standardabweichung ; LVEF = Linksventrikuläre Ejektionsfraktion ; CVRF = Kardiovaskuläre Risikofaktoren ; ASS = Acetylsalicylsäure ; ACE = Angiotensin-konvertierendes Enzym ; Ca = Kalzium ; AT1 = Angiotensin II-Rezeptorantagonist ; ACS = akutes Koronarsyndrom ; CCS = chronisches Koronarsyndrom

Basischarakteristika	Gesamtpatientenkollektiv (n=304)
Alter (\pm SA)	68.6 (\pm 11.4)
Männliches Geschlecht	214 (70.4%)
LVEF% (\pm SA)	50.4 (\pm 10.9)
CVRF	
Arterielle Hypertonie	257 (84.5%)
Hyperlipidämie	189 (62.2%)
Diabetes Typ II	105 (34.5%)
Raucher	131 (43.1%)
Medikamente bei Aufnahme	
ASS	179 (58.9%)
Clopidogrel	40 (13.2%)

Prasugrel	6 (1.9%)
Ticagrelor	15 (4.9%)
ACE-Hemmer	135 (44.4%)
AT1-Antagonisten	58 (19.1%)
Ca-Kanal-Blocker	62 (20.4%)
Betablocker	181 (59.5%)
Statine	161 (52.9%)
Aufnahmegrund	
ACS	156 (51.3%)
CCS	148 (48.7%)

Tabelle 3) Basischarakteristika CyPA \leq Median vs. $>$ Median

Das Alter der Patienten, das männliche Geschlecht und die linksventrikuläre Ejektionsfraktion zeigten in der Studienkohorte für die Verteilungen CyPA \leq Median oder $>$ Median keinen signifikanten Unterschied. Ebenfalls sind in der Einteilung zwischen CyPA \leq oder $>$ Median in den jeweiligen Kategorien nur geringe Unterschiede vorhanden.

Bei der Zuordnung der Patienten mit den kardiovaskulären Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie, Diabetes Typ II und Raucher in die Gruppen der CyPA \leq Median und CyPA $>$ Median zeigen sich nur kleine prozentuale Abweichungen. Die kardiovaskulären Risikofaktoren stellen keine signifikanten Unterschiede dar.

In der Kategorie Medikamente zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich eines Pharmazeutikums. Dabei handelt es sich um den

Thrombozytenaggregationshemmer Clopidogrel. 40 Patienten (13.2%) nahmen Clopidogrel zum Zeitpunkt des Einschlusses in die Studie ein. Eine signifikant abweichende Verteilung ($p=0.037$) stellt dabei die Zuordnung von 26 Patienten (17.1%) zu der Gruppe \leq Median dar. Lediglich 14 Patienten (9.2%) konnten der Gruppe $>$ Median zugeordnet werden.

Der Vergleich der anderen Pharmaka der Studienkohorte in den jeweiligen Gruppen \leq Median und $>$ Median zeigt keine signifikanten Unterschiede.

Patienten mit akutem und chronischem Koronarsyndrom waren in beiden Gruppen nicht signifikant abweichend verteilt ($p=0.066$).

Tabelle 3: Basischarakteristika für CyPA \leq Median und CyPA $>$ Median
 Abkürzungen: SA = Standardabweichung ; CyPA = Cyclophilin A ; LVEF = Linksventrikuläre Ejektionsfraktion ; CVRF = Kardiovaskuläre Risikofaktoren ; ASS = Acetylsalicylsäure ; ACE = Angiotensin-konvertierendes Enzym ; Ca = Kalzium ; AT1 = Angiotensin II Rezeptorantagonist ; ACS = akutes Koronarsyndrom ; CCS = chronisches Koronarsyndrom

Basischarakteristika	CyPA \leq Median (n=152)	CyPA $>$ Median (n=152)	p
Alter (\pm SA)	68.6 (\pm 11.8)	68.6 (\pm 10.9)	0.962
Männliches Geschlecht	108 (71.1%)	106 (69.7%)	0.802
LVEF (\pm SA)	49.8 (\pm 11.4)	50.8 (\pm 10.5)	0.416
CVRF			
Arterielle Hypertonie	125 (82.2%)	132 (86.8%)	0.239
Hyperlipidämie	94 (61.8%)	95 (62.5%)	0.965
Diabetes Typ II	58 (38.2%)	47 (30.9%)	0.182
Raucher	72 (47.4%)	59 (38.8%)	0.116

Medikamente bei Aufnahme			
ASS	89 (58.6%)	90 (59.2%)	0.962
Clopidogrel	26 (17.1%)	14 (9.2%)	0.037
Prasugrel	4 (2.6%)	2 (1.3%)	0.400
Ticagrelor	6 (3.9%)	9 (5.9%)	0.442
ACE-Hemmer	68 (44.7%)	67 (44.1%)	0.908
AT1-Antagonisten	29 (19.1%)	29 (19.1%)	1
Ca-Kanal-Blocker	30 (19.7%)	32 (21.1%)	0.776
Betablocker	90 (59.2%)	91 (59.9%)	0.907
Statine	83 (54.6%)	78 (51.3%)	0.566
Aufnahmegrund			
ACS	86 (56.6%)	70 (46.1%)	0.066
CCS	66 (43.4%)	82 (53.9%)	0.066

Tabelle 4) Ereignisse und Inzidenzraten

In der folgenden Tabelle 4 sind diejenigen Ereignisse aufgelistet, welche sich laut der Telefoninterviews innerhalb der 1080 Tage ereignet haben.

Auffällig ist, dass sowohl bei der Anzahl der Ereignisse, als auch bei der Inzidenzrate pro 100 Personenjahre, die pathologischen Vorkommnisse eindeutig bei der Gruppe CyPA \leq Median einzuordnen sind.

Besonders hervorzuheben ist dabei der kombinierte Endpunkt, den 71 Patienten der Studie aufwiesen. 43 dieser Patienten, was eine Prozentzahl von 60,6% ausmacht, gehörten der Gruppe CyPA \leq Median an. Mit $p=0.042$ stellt

dies eine signifikant unterschiedliche Zuordnung dar.

In der Gruppe der 32 Patienten, welche unter dem Ereignis Tod aufgelistet sind, lassen sich 23 (71,9%) Patienten der CyPA ≤ Median Gruppe zuordnen und lediglich 9 Patienten der CyPA > Median Gruppe. Hierbei wird das signifikant gehäufte Auftreten (p=0.009) pathologischer Ereignisse im Zusammenhang mit geringeren CyPA Werten besonders deutlich.

Innerhalb der 1080 Tage erlitten 36 Patienten einen Myokardinfarkt, was im Vergleich zu dem Ereignis Tod 4 Patienten mehr darstellt.

Dabei ist anzumerken, dass bei 19 Patienten, die einen Myokardinfarkt erlitten, CyPA Werte ≤ Median und bei 17 Patienten CyPA Werte > Median festgestellt werden konnten. Daraus lässt sich keine eindeutige Tendenz des Auftretens eines Myokardinfarkts im Zusammenhang speziell mit CyPA Werten ≤ Median ableiten.

Auch wenn das Ereignis des ischämischen Schlaganfalles mit nur 11 Fällen innerhalb der 1080 Tage dokumentiert wurde, so ist auch hier die Gewichtung mit 72,7 % zu 27,3% eindeutig auf der Seite der CyPA Werte ≤ Median zu erkennen.

Die Betrachtung des Blutungsereignisses bestätigt ebenfalls die zuvor genannte Tendenz. Die gehäuften Blutungsereignisse von n=18 in der Gruppe CyPA ≤ Median, gegenüber n=14 in der Gruppe CyPA > Median, spiegeln diese Tendenz wider.

Tabelle 4: Ereignis- und Inzidenzrate pro 100 Personenjahre
Abkürzungen: IR = Inzidenzrate ; PJ = Personenjahre ; CyPA = Cyclophilin A

Ereignisse	Anzahl der Ereignisse (CyPA ≤ oder > als der Median)	IR / 100 PJ (CyPA ≤ oder > als der Median)	p
kombinierter Endpunkt (n=71)	43/28	9.4/6.1	0.042

Tod (n=32)	23/9	5.0/2.0	0.009
Myokardinfarkt (n=36)	19/17	4.2/3.7	0.723
ischämischer Schlaganfall (n=11)	8/3	1.8/0.7	0.064
Blutung (n=32)	18/14	3.9/3.1	0.455

Kaplan-Meier-Kurven

Die folgenden Kaplan-Meier-Kurven (KMK) Nr. 4 – 8) zeigen auf der x-Achse den Nachverfolgungszeitraum von 1080 Tagen. Auf der y-Achse ist das jeweilige untersuchte Ereignis dargestellt. Dabei wurde der entsprechende Kurvenverlauf der Patienten in der Gruppe $CyPA \leq Median$ in Blau und $CyPA > Median$ in Rot dargestellt. Zu Beginn der Studie lag die Verteilung bei jeweils 152 Patienten mit $CyPA \leq Median$ und 152 Patienten mit $CyPA > Median$. Im Laufe der Studie sank die Zahl der zugehörigen Risikopatienten, da diese während der 1080 Tage ein entsprechendes Ereignis erlitten, oder aus der Studie ausschieden. Zur besseren Übersicht wurden die zensierten Bereiche aus den Kurven gelöscht.

Abbildung 4) Kumulatives Überleben für das Ereignis kombinierter Endpunkt

In den ersten 100 Tagen zeigt sich in der Kaplan-Meier-Kurve sowohl in der $CyPA > Median$ Gruppe, als auch in der $CyPA \leq Median$ Gruppe ein stetiges

Auftreten des kombinierten Endpunktes. Im Bereich der 100 Tagesgrenze kommt es zu einer Überlappung der beiden Gruppen. Innerhalb dieses gemeinsamen Streckenverlaufes traten weder in der einen, noch in der anderen beobachteten Gruppe Ereignisse auf. Der darauffolgende gemeinsam abfallende Streckenbereich spiegelt ein gleich hohes Auftreten an kombinierten Endpunkten in beiden Gruppen wider. Während in den ersten 100 Tagen die höhere Ereignisrate bei $CyPA > Median$ beobachtet werden konnte, änderte sich dies nach dem gemeinsamen Streckenverlauf. Danach traten häufiger Ereignisse des kombinierten Endpunktes in der Gruppe $CyPA \leq Median$ auf, als in $CyPA > Median$. Dies ist im deutlich steiler abfallenden Kurvenverlauf der $CyPA \leq Median$ Gruppe über den restlichen Beobachtungszeitraum erkennbar. Auch in der Gruppe der $CyPA > Median$ zeigten sich weiter auftretende Ereignisse, welche jedoch in ihrer Anzahl nicht so häufig wie die der anderen Gruppe sind. Einen fast gleichzeitig konstanten Verlauf einer ereignisfreien Periode zeigen beide Gruppen in der Zeit von Tag 900 bis Tag 1000.

Bei Betrachtung der Zahlen der Risikopatienten fällt ebenfalls auf, dass im Verlauf der Studie ein deutlich höherer Verlust an Risikopatienten in der Gruppe der $CyPA \leq Median$ zu finden ist, als in der Gruppe der $CyPA > Median$. Nach 1000 Tagen sind 83.2% der Risikopatienten der $CyPA > Median$ Gruppe ohne Ereignis. In der $CyPA \leq Median$ Gruppe zeigen lediglich 73.9% der Risikopatienten kein stattgefundenes Ereignis. Mit $p=0.048$ zeigt sich dieser Zusammenhang zwischen den beiden Variablen als statistisch signifikant.

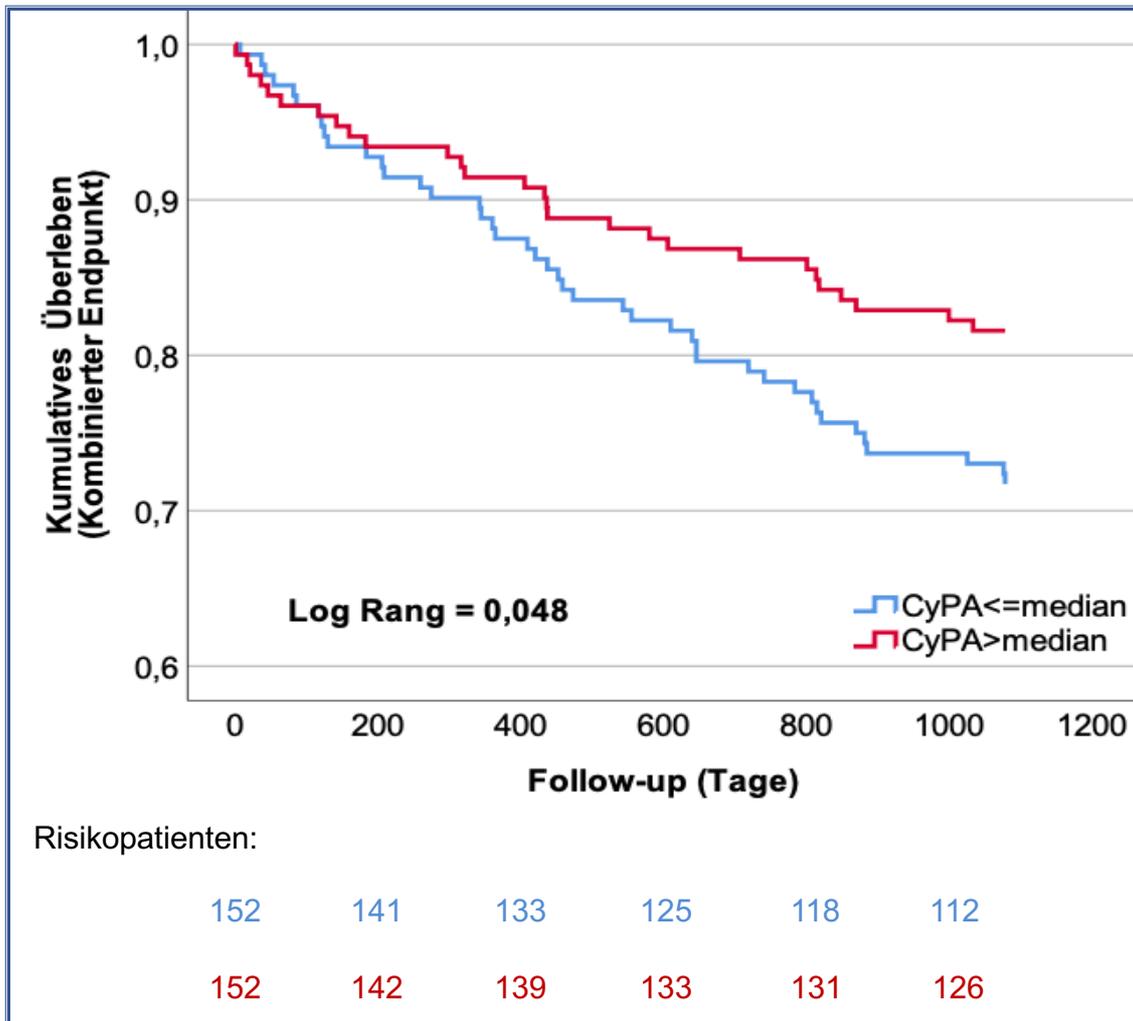


Abbildung 4: Kaplan-Meier-Kurve, kombinierter Endpunkt

Abbildung 5) Kumulatives Überleben für das Ereignis Tod

Innerhalb der ersten 100 Studientage zeigt sich für beide Gruppen eine anfänglich ereignisfreie Zeit. Dies ändert sich gegen Ende der 100 Tage. In beiden Gruppen kam es zu Todesfällen, welche jedoch zeitlich versetzt voneinander stattfanden.

Danach ist ein Auseinanderklaffen der CyPA ≤ Median und CyPA > Median Gruppe zu erkennen, welches im Laufe der 1080 Tage immer größer wird. Eine insgesamt höhere Gesamtmortalität zeigte sich in der CyPA ≤ Median Gruppe. In der Zeit des ca. 400. – 500. und 800. – 1000. Tag stagnierten in dieser Gruppe die Ereignisse, wobei die zweite Zeitspanne doppelt so lange

andauerte, wie die erste Zeitspanne. Am Ende der Studienzeit haben 129 Patienten der $CyPA \leq \text{Median}$ Gruppe überlebt.

Dies bedeutet, dass 15.1% der Studienteilnehmer verstorben sind.

Ein gehäuftes Auftreten der Todesfälle fand in den ersten 600 Studientagen statt. Einen anderen Kurvenverlauf zeigt die Gruppe $CyPA > \text{Median}$.

Am Ende der Studienzeit gab es in dieser Studiengruppe 9 Todesfälle, was 5.9% ausmacht. Auffällig in dieser Gruppe ist das gehäufte Vorkommen von Todesfällen in den ersten 400 Tagen. Im Anschluss an die 400 Tage folgen zwei länger andauernde ereignisfreie Perioden.

Beide Zeiträume nehmen dabei eine Zeitspanne von jeweils ca. 300 Tagen in Anspruch. Zwischen diesen beiden Perioden kommt es zu einem einzigen Ereignis. Das heißt, dass in den ersten 400 Tagen der Studie 7 Menschen verstorben sind und sich in den darauffolgenden 680 Studientagen lediglich zwei Todesfälle ereigneten. Durch den p-Wert von $p=0.010$ sind die Ergebnisse als statistisch signifikant anzusehen.

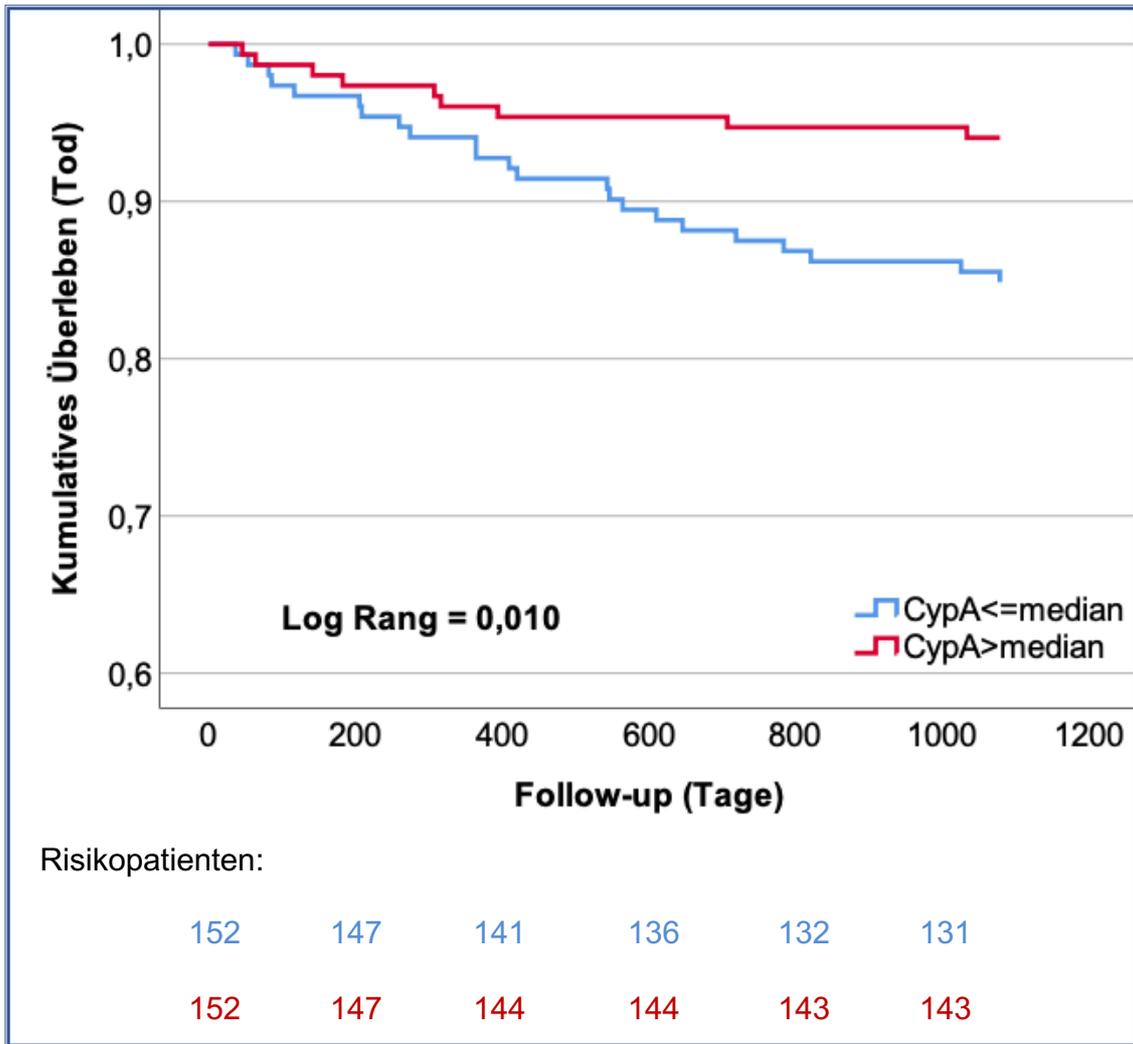


Abbildung 5: Kaplan-Meier-Kurve, Tod

Abbildung 6) Kumulatives Überleben für das Ereignis Myokardinfarkt

Für das Ereignis des Myokardinfarktes zeigt die nachfolgende Kaplan-Meier-Kurve mit $p=0.658$ keine Signifikanz der Beziehung der beiden Variablen zueinander. Jedoch ist auch in diesen beiden Kurvenverläufen ersichtlich, dass mehr Studienpatienten mit $CyPA \leq \text{Median}$ einen Myokardinfarkt innerhalb der 1080 Tage erlitten, als die Studienteilnehmer der Gruppe $CyPA > \text{Median}$.

Von den anfänglich 152 Risikopatienten der Gruppe $CyPA \leq \text{Median}$ erlebten 19 Patienten einen Myokardinfarkt.

Nach 1080 Studientagen berichteten folglich 87.5% der Studienteilnehmer, dass sie keinen Myokardinfarkt erlitten hatten.

In der Gruppe der CyPA > Median macht dies einen Anteil von 88.8% aus, was einer Patientenzahl von 135 entspricht.

Somit erlitten 2 Patienten mehr in der Gruppe der CyPA ≤ Median einen Myokardinfarkt, als in der Gruppe der CyPA > Median.

Auch wenn der Signifikanztest in dieser Kaplan-Meier-Kurve negativ ausfällt, so ist dies trotzdem eine interessante Beobachtung.

Innerhalb der ersten 200 Studientage lag die Verteilung der häufiger aufgetretenen Ereignisse auf der CyPA > Median Seite.

Im Anschluss daran gab es einen stetigen Wechsel an auftretenden Myokardinfarkten zwischen beiden Gruppen. Dieser Wechsel begann mit dem 300sten Studientag und dauerte über 150 Tage.

Die Kurve der Variable CyPA > Median zeigt in den ersten 200 Studientagen eine Ereignisrate von 5 Patienten. In den folgenden Tagen kommt es zwar zu einem kontinuierlichen Auftreten von Ereignissen, diese erstrecken sich jedoch über einen längeren Zeitraum. So dauerte es weitere 600 Studientage, bis es zu 8 weiteren Ereignissen innerhalb der Gruppe CyPA > Median kam.

Auch in der Gruppe CyPA ≤ Median lag einer der ereignisreichsten Zeiträume innerhalb der ersten 200 Tage. Einen weiteren ereignisreichen Zeitraum spiegelt der Streckenverlauf zwischen Tag 400 – Tag 550 wider. Weitere Myokardinfarkte bei den untersuchten Patienten traten in zeitlich größeren Abständen auf.

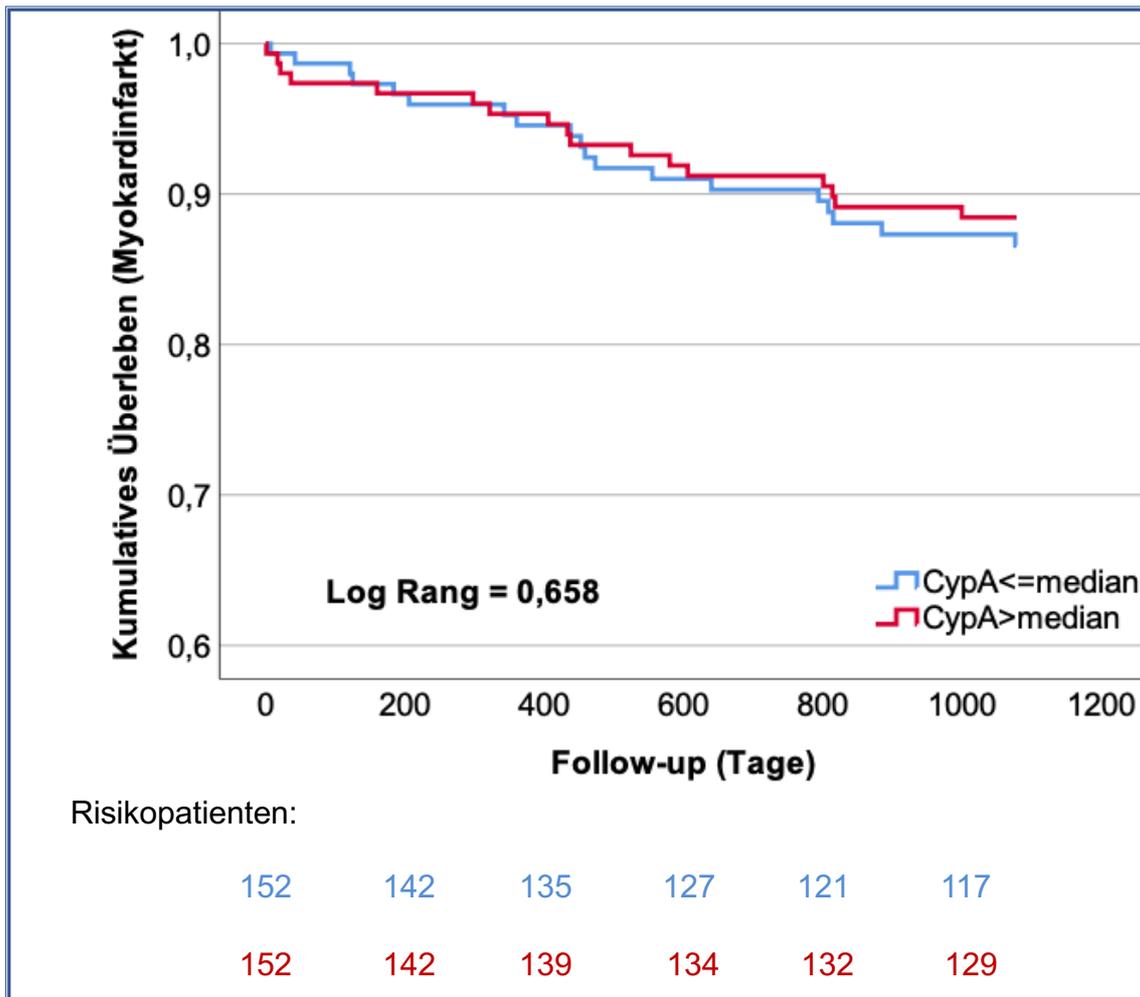


Abbildung 6: Kaplan-Meier-Kurve, Myokardinfarkt

Abbildung 7) Kumulatives Überleben für das Ereignis ischämischer Schlaganfall

Bezogen auf das Ereignis des ischämischen Schlaganfalles konnten wir keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Variablen finden.

Trotz alledem ist auch in dieser Kaplan-Meier-Kurve ersichtlich, dass das gehäufte Auftreten der Ereignisse zum wiederholten Male auf der Seite der CyPA ≤ Median Gruppe liegt. Bis zum Ende der 1080 Studientage traten bei 8 Patienten der Gruppe CyPA ≤ Median und 3 Patienten der Gruppe CyPA > Median das Ereignis des ischämischen Schlaganfalles auf. Somit erlitten 5 Patienten mehr der Gruppe CyPA ≤ Median einen ischämischen Schlaganfall,

als die der Gruppe CyPA > Median, was einen prozentualen Anteil von 3.3% ausmacht. Von Beginn der Studie bis zum Tag 1000 reduzierte sich die Zahl der Risikopatienten um 28 (entspricht 18.4%) von insgesamt 152 auf 124.

Die in den 1080 Tagen aufgetretenen Ereignisse verteilten sich im Vergleich beider Gruppen zueinander gleichmäßig. Innerhalb der Gruppe CyPA > Median kam es lediglich bei einem Patienten zum Auftreten eines ischämischen Schlaganfalls innerhalb der ersten 500 Tage der Studie. In den folgenden Tagen bis zum Ende der Studie traten zwei weitere ischämische Schlaganfälle auf, welche sich jeweils zwischen Tag 800 - 900 ereigneten. Die Zahl der Risikopatienten sank im Verlauf der Studie von anfänglich 152 auf 135 (11.2%).

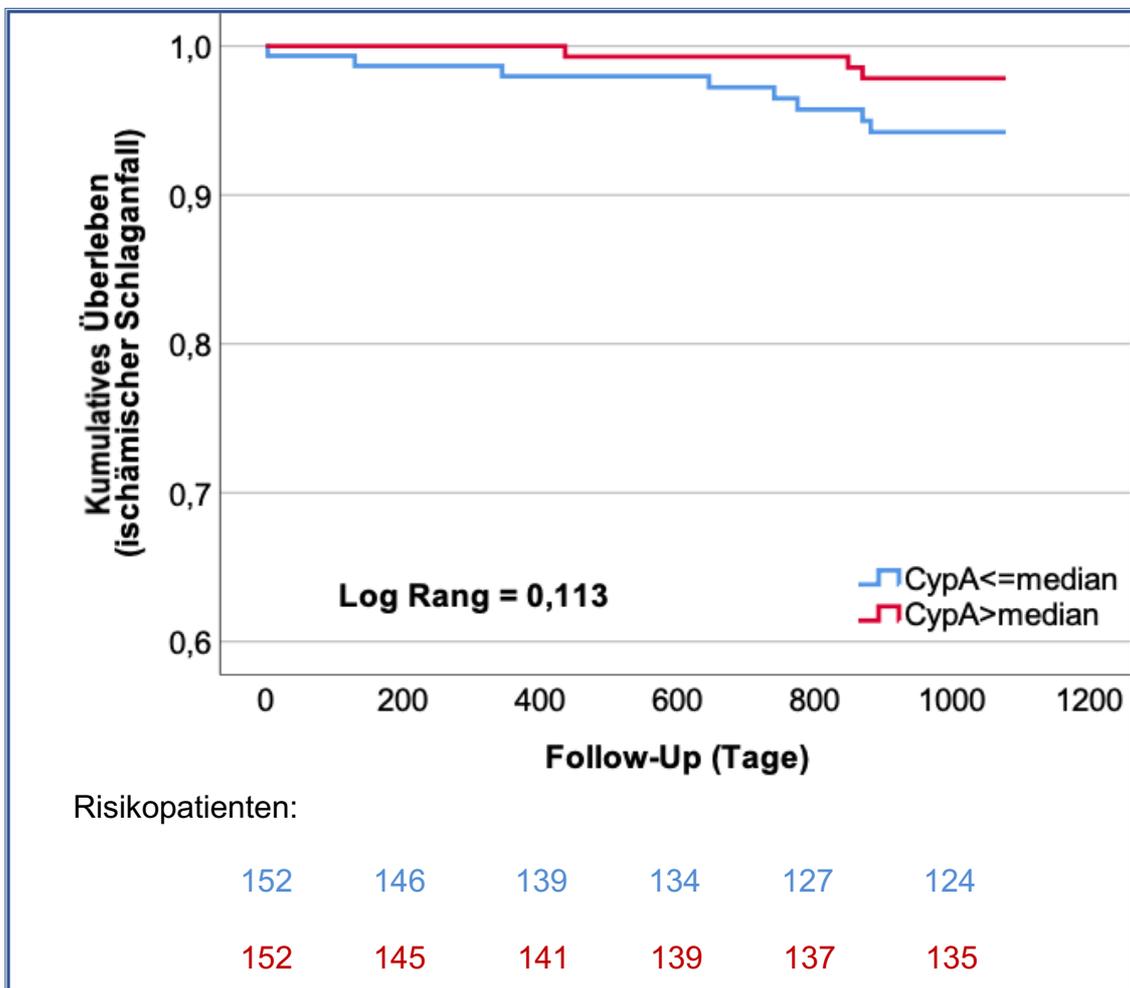


Abbildung 7: Kaplan-Meier-Kurve, ischämischer Schlaganfall

Abbildung 8) Kumulatives Überleben für das Ereignis Blutung

In der letzten Analyse beschäftigten wir uns mit einer möglichen Assoziation zwischen unterschiedlichen thrombozytären CyPA Expressionen und dem Auftreten der klinisch signifikanten Blutung im entsprechenden Nachverfolgungszeitraum. Wir konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen $CyPA \leq \text{Median}$ und $CyPA > \text{Median}$ finden. Auch hier zeigt sich aber ein Trend zu einer erhöhten Ereignisrate in der Gruppe mit niedrigeren CyPA Konzentrationen.

Am Ende der Studiendauer lag die Anzahl der Blutungsereignisse in der Gruppe der $CyPA > \text{Median}$ bei 14 Patienten (9.2%) und in der Gruppe der $CyPA \leq \text{Median}$ bei 18 Patienten (11.8%). Somit traten bei 4 mehr Patienten (2.6%) der Studiengruppe $CyPA \leq \text{Median}$ ein Blutungsereignis auf, als in der Gruppe $CyPA > \text{Median}$. Innerhalb der ersten 100 Studientage lag die Verteilung der häufigeren Ereignisse auf der Seite der $CyPA > \text{Median}$ Gruppe. Danach stagnierten die Ereignisse in der $CyPA > \text{Median}$ Gruppe für 150 Tage, während zur gleichen Zeit in der Gruppe $CyPA \leq \text{Median}$ weitere Blutungsereignisse auftraten. Kurz nach Beginn des 400. Studientages ereignete sich eine längere Pause an Vorkommnissen auf der Seite der $CyPA > \text{Median}$ Seite, welche sich bis kurz vor Studientag 800 erstreckte. In den ersten 200 Studientagen erlitten sieben Patienten eine Blutung und drei weitere Patienten in den darauffolgenden 200 Tagen. Zwei Blutungsereignisse traten in der Zeit zwischen Tag 400 – Tag 800 auf. Bis zum Ende der Studie konnten zwei weitere Blutungsereignisse registriert werden. Dies zeigt, dass ein gehäuftes Blutungsauftreten innerhalb der $CyPA > \text{Median}$ Gruppe zu Beginn der Studienzeit lag. Auch in der Gruppe der $CyPA \leq \text{Median}$ zeigten sich zwei Intervalle ohne Blutungsereignisse. Diese erstreckten sich ab dem Zeitpunkt kurz vor Beginn Studientag 400 bis ca. Studientag 600 und ein weiterer von Studientag 800 bis kurze Zeit vor Studientag 1000. Die meisten Blutungen traten in der Zeit von Tag 0 bis Tag 200 auf. In der Zeitspanne berichteten neun Patienten, dass bei ihnen eine Blutung aufgetreten sei. Dies entspricht 50% aller aufgetretenen Ereignisse in der Gruppe $CyPA \leq \text{Median}$ Gruppe innerhalb

der 1080 Tage. In den letzten Tagen der Studie kam es in der CyPA \leq Median Gruppe zu zwei weiteren Blutungsereignissen.

Die Risikopatientenzahl verringerte sich innerhalb von 1000 Tagen von 152 auf 118 (22.4%).

Mit einem p-Wert von 0.417 ist der Unterschied zwischen den beiden Gruppen statistisch nicht signifikant. Es zeigt sich jedoch der Trend zu einer erhöhten Ereignisrate für CyPA \leq Median.

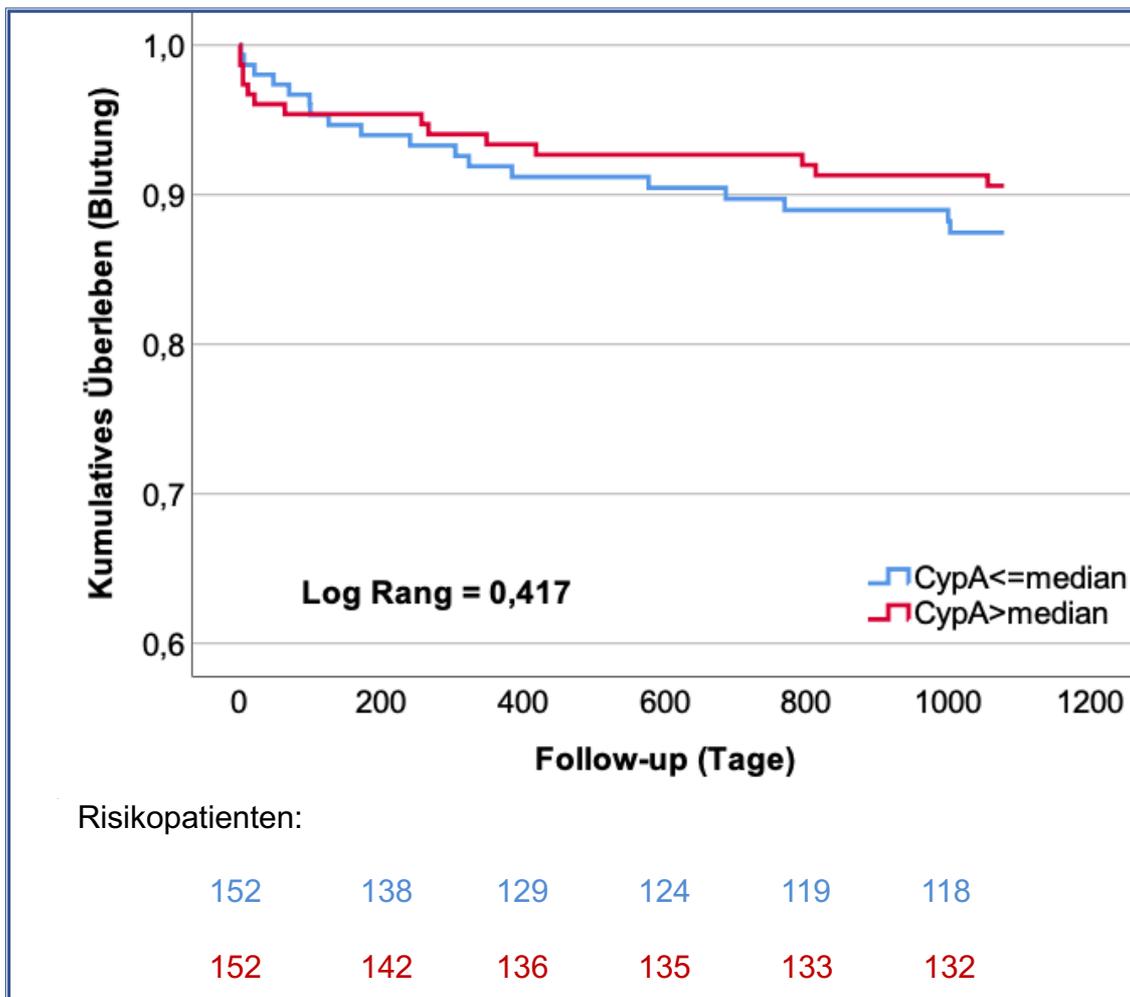


Abbildung 8: Kaplan-Meier-Kurve, Blutung

Cox-Regressionsanalysen

Die folgenden Tabellen 5 – 9 zeigen die Cox–Regressionsanalysen für den kombinierten Endpunkt, den Tod, den Myokardinfarkt, den ischämischen Schlaganfall und das Auftreten einer Blutung. Die statistische Signifikanz ist dabei als p-Wert angegeben. Als Ko-Variablen wurden das Alter, die LVEF, das Geschlecht, arterieller Bluthochdruck, Hyperlipidämie, Diabetes Typ II, Nikotinabusus, ASS, Clopidogrel, ACE-Hemmer, AT-1 Antagonisten, Betablocker, Statine und der Aufnahmegrund (akutes oder chronisches Koronarsyndrom) gewählt.

Tabelle 5) Cox-Regressionsanalyse mit dem Ereignis kombinierter Endpunkt

Tabelle 5 der Cox-Regressionsanalysen zeigt die unabhängigen Variablen für das Ereignis des kombinierten Endpunktes und deren Einflussfaktoren. Die höchste Signifikanz mit <0.001 stellt, wie auch in Tabelle 6 der Cox-Regressionsanalysen, die unabhängige Variable Alter der Studienteilnehmer dar. Mit der Hazard Ratio von 1.07 hatte das voranschreitende Alter der Patienten einen negativen Einflussfaktor, während der Studie einen kombinierten Endpunkt zu erleiden.

Gefolgt wird der Einflussfaktor des Alters von der LVEF% mit einem p-Wert von 0.001. Auch hier zeigt sich, wie in Tabelle 6, dass der kombinierte Endpunkt unabhängig mit der Variable LVEF% in Verbindung steht. Verdeutlicht wird dies durch die HR von 0.97.

Die Einnahme des Thrombozytenaggregationshemmers Acetylsalicylsäure (ASS) erhöhte in den 1080 Tagen der Studie das Risiko des Auftretens des kombinierten Endpunktes um das 2.01fache. Mit einem p-Wert von 0.016 hat diese unabhängige Variable einen signifikanten Einfluss.

Der Aufnahmegrund, welcher durch ein akutes oder chronisches Koronarsyndrom ausgelöst wurde, stellt sich mit dem p-Wert von 0.02 ebenfalls als deutlich signifikant dar. Die Studienteilnehmer, deren Aufnahmegrund im

Uniklinikum Tübingen ein akutes oder chronisches Koronarsyndrom waren, hatten ein 1.81fach höheres Risiko an einem kombinierten Endpunkt während der Studie zu erkranken, als die anderen Studienteilnehmer. Thrombozytäres CyPA stellte für den kombinierten Endpunkt in der COX-Regressionsanalyse keine signifikante unabhängige Variable dar.

Tabelle 5: Cox-Regressionsanalyse mit kombiniertem Endpunkt als abhängige Variable und klinische Faktoren als Kovariablen.

Abkürzungen: KI = Konfidenzintervall ; LVEF = Linksventrikuläre Ejektionsfraktion ; ASS = Acetylsalicylsäure ; CCS = chronisches Koronarsyndrom ; ACS = Akutes Koronarsyndrom

Variablen	Hazard Ratio (kombinierter Endpunkt)(95% KI)	p
Alter	1.07 (1.04 – 1.10)	<0.001
LVEF%	0.97 (0.95 – 0.97)	0.001
ASS	2.01 (1.15 – 3.54)	0.016
Aufnahmegrund (CCS/ACS)	1.81 (1.10 – 2.99)	0.020

Tabelle 6) Cox-Regressionsanalyse mit dem Ereignis Tod

Die nachfolgende Tabelle zeigt unabhängige Assoziationen für die Variablen Alter und die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF%). Die Hazard Ratio (HR) mit 1.13 für Alter zeigt, dass das zunehmende Alter der Studienteilnehmer innerhalb der 1080 Studientage einen unabhängigen Einflussfaktor auf die Gesamtmortalität darstellt.

Eine eingeschränkte LVEF (Hazard Ratio 0.93) ist ebenfalls unabhängig mit

dem Tod assoziiert. Die Einnahme von Betablockern war unabhängig mit der Gesamtmortalität assoziiert. Die Patienten, die unter der Medikation mit Betablockern standen, hatten ein 2.9fach erhöhtes Risiko, während der Studienzeit zu versterben.

Schlussendlich zeigt die Variable von Interesse, nämlich thrombozytäres CyPA, eine signifikante sowie unabhängige Assoziation mit diesem Endpunkt. Dies gilt auch nach der Bonferroni Korrektur für multiples Testen.

Tabelle 6: Cox-Regressionsanalyse mit Tod als abhängige Variable und klinische Faktoren als Kovariablen.

Abkürzungen: KI = Konfidenzintervall ; LVEF = Linkventrikuläre Ejektionsfraktion ;

CyPA = Cyclophilin A

*Bonferroni angepasste p-Werte

Variablen	Hazard Ratio (Tod) (95% KI)	p
Alter	1.13 (1.08-1.19)	<0.001
LVEF%	0.93 (0.90-0.96)	<0.001
Betablocker	2.90 (1.18-7.13)	0.020
CyPA median	0.33 (0.15-0.75)	0.008 (0.040*)

Tabelle 7) Cox-Regressionsanalyse mit dem Ereignis Myokardinfarkt

Die 7. Tabelle stellt lediglich eine signifikante unabhängige Variable für das Ereignis eines Myokardinfarktes in der Studienkohorte dar. Der Alterungsprozess der Studienteilnehmer hatte mit p=0.001 eine signifikante unabhängige Assoziation mit dem Auftreten eines Myokardinfarktes.

Diese Aussage wird ebenfalls durch die Berücksichtigung der HR von 1.06 gestützt.

Tabelle 7: Cox-Regressionsanalyse mit Myokardinfarkt als abhängige Variable und klinische Faktoren als Kovariablen.

Abkürzungen: KI = Konfidenzintervall

Variablen	Hazard-Ratio (Myokardinfarkt)(95% KI)	p
Alter	1.06 (1.03 – 1.10)	0.001

Die multivariablen Analysen für die Ereignisse der klinisch signifikanten Blutung oder eines ischämischen Schlaganfalles ergaben keine unabhängigen Assoziationen.

Einen beinahe signifikanten Wert von 0.075 erreichte für das Auftreten des Ereignisses eines Schlaganfalles die Variable Diabetes Typ II.

Für das Ereignis einer klinisch signifikanten Blutung zeigte sich die therapeutische Einnahme von ACE-Hemmern mit einem p-Wert von 0.065 als annähernd signifikant.

Diskussion

Die wesentlichen Ergebnisse der vorliegenden Dissertationsschrift sind zum einen, dass Thrombozyten-assoziiertes CyPA mit der Prognose bei KHK Patienten assoziiert ist. Zum anderen fanden wir heraus, dass es eine unabhängige Assoziation des Thrombozyten-assoziierten CyPAs mit der Gesamtmortalität gibt.

Weltweit stehen trotz der aktuellen therapeutischen und diagnostischen Maßnahmen die KHK und damit verbundene thromboembolische Ereignisse wie der Myokardinfarkt an erster Stelle der gesundheitlich bedingten Todesursachen (Schmied 2018).

Bereits erforschte Biomarker wie das hochsensitive C-Reaktive Protein, das B-natriuretische Peptid und Fibrinogen können anhand ihrer Plasmakonzentration eine Ereignisvorhersage bezüglich eines aufkommenden kardiovaskulären Ereignisses geben. Problematisch zeigt sich diesbezüglich jedoch, dass diese Werte auch bei anderen entzündlichen Erkrankungen oder Tumorerkrankungen erhöht sind.

Die durch oxidativen Stress (ROS) bedingte Sezernierung des CyPA aus VSCM führt zu einer weiteren Förderung des oxidativen Stresses, wodurch ein starker Zusammenhang zwischen CyPA und dem Progress der KHK gesehen werden kann (Ohtsuki u. a. 2017) (Taguchi u. a. 2013).

In vergangenen Studien wurde deshalb als weiterer Biomarker das CyPA untersucht. Dabei wurde zum einen der Einfluss des extrazellulären CyPA und zum anderen das Thrombozyten-assoziierte CyPA im Zusammenhang mit der KHK und akuten Koronarsyndromen untersucht.

Erhöhte eCyPA Konzentrationen zeigten sich in Verbindung mit auftretenden akuten Koronarsyndromen, erhöhten Blutdruckwerten und ischämischen Schlaganfällen (Yan u. a. 2012) (Chang u. a. 2013) (Chang u. a. 2020).

Erhöhte thrombozytär gebundene CyPA Konzentrationen korrelierten bei CCS Patienten mit Bluthochdruck und Hypercholesterinämie, während das thrombozytär gebundene CyPA bei Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt

deutlich verringert war (Seizer u. a. 2016).

CyPA ist ein multifunktionelles Immunophilin, welches neben seinen intrazellulären Aufgaben, wie der Proteinfaltung, Signalübertragung und Proteinregulierung, als sezerniertes extrazelluläres Protein weitere Funktionen hat. Dabei kann es dort zu physiologischen, aber auch zu pathologischen Ausprägungen kommen (Satoh u. a. 2010). Intrazellulär dient CyPA unter anderem als Bindungsprotein für CsA, wodurch die beiden kommunizierenden Makromoleküle eine immunsupprimierende Wirkung zeigen.

Des Weiteren wurde in Studien gezeigt, dass intrazelluläres CyPA für die Ca^{2+} Regulation in Thrombozyten und damit für die Aktivität der Thrombozyten verantwortlich ist. Die daraus folgende Thrombenbildung, mit möglichen schwerwiegenden pathologischen Konsequenzen, geben CyPA eine forschungsrelevante Bedeutung (Seizer u. a. 2014) (Elvers u. a. 2012).

ROS induzierte CyPA Sezernierung erfolgt nicht nur aus VSCM, sondern auch aus Endothelzellen, Monozyten, aus aktivierten Thrombozyten und durch atherosklerotische Reize (Chang u. a. 2013) (Seizer u. a. 2016).

Durch oxidativen Stress in den Extrazellularraum sezerniertes CyPA wird im Voraus acetyliert. Das acetylierte CyPA führt zu einer Regulierung der VSMCs und Endothelzellen, wodurch im Umkehrschluss eine Verhinderung der Acetylierung eine pathogene Wirkung durch oxidativen Stress auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen verhindert werden könnte (Soe u. a. 2014).

Eine Bindung zwischen CyPA und dem EMMPRIN Rezeptor von VSMCs, Monozyten und Makrophagen führt zu einer Freisetzung von MMPs, welche wiederum zu einem Fortschreiten der Atherosklerose und kardiovaskulären Komplikationen führen (Schmidt u. a. 2006). Eine Verbindung zwischen eCyPA mit den auf Thrombozyten exprimierten EMMPRIN Rezeptoren führt zu Thrombenbildung und verbesserter Adhäsion. Dabei zeigt sich dieses Vorgehen unabhängig von der intrazellulären Cyclophilin A (iCyPA) Konzentration.

Eine Inhibition des eCyPA könnte ein weiterer medikamentöser Ansatz zur Prävention CyPA induzierter kardiovaskulärer Ereignisse bei Patienten mit KHK sein (Seizer u. a. 2015). Einen ausführlichen Überblick über die pathologischen Eigenschaften und kardiovaskulären Auswirkungen von CyPA gaben Xue u. a.

im Jahre 2018. Abschließend gab auch diese Arbeitsgruppe eine gute Prognose für die positiven Erfolgsaussichten bezüglich einer medikamentösen Inhibition des eCyPA ab (Xue u. a. 2018). In einer vorausgegangenen Studie analysierten Seizer und dessen Mitarbeiter im Jahre 2016 thrombozytär gebundenes CyPA bei Patienten mit KHK (Seizer u. a. 2016).

In der aktuellen Studie untersuchten wir den Zusammenhang zwischen thrombozytär gebundenem CyPA und auftretenden kardiovaskulären Ereignissen bei Patienten mit KHK. Eine ähnlich angelegte Studie führten Ohtsuki u. a. im Jahre 2017 durch. Der wesentliche Unterschied zwischen der vorliegenden Studie und der Studie der anderen Forschungsgruppe liegt darin, dass Ohtsuki u. a. die Auswirkungen der Plasmakonzentration von CyPA auf Patienten mit einer KHK untersuchte. In unserer Studienkohorte schlossen wir zusätzlich noch Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom mit ein.

Eine aktuelle Studie aus dem Jahr 2019, welche in Kairo veröffentlicht wurde, untersuchte Patienten, welche an einem akuten Koronarsyndrom litten und verglichen diese mit einer Kontrollgruppe (Maaly u. a. 2019).

Ergebnisdiskussion

Für die vorliegende Studie wurden in der kardiologischen Abteilung der Universitätsklinik Tübingen während einer durchgeführten perkutanen Koronarintervention von 335 Patienten Blutproben entnommen.

Diese wurden unmittelbar mittels Durchflusszytometrie auf Thrombozyten-assoziiertes CyPA untersucht. Aufnahmegrund der Patienten, welche für die Studie ausgewählt wurden, stellte die symptomatische KHK dar.

Die Patienten wurden nach 1080 Tagen mittels eines jeweiligen Telefoninterviews nach möglicherweise aufgetretenen schwerwiegenden kardialen Ereignissen und Blutungen befragt. Zu den schwerwiegenden kardialen Ereignissen zählten der ischämische Schlaganfall, der Myokardinfarkt und der Tod. Der primäre kombinierte Endpunkt wurde als das Erstauftreten von Tod und/oder Myokardinfarkt und/oder ischämischer Schlaganfall und/oder klinisch relevanter Blutung festgelegt. Der sekundäre Endpunkt definiert das individuelle Auftreten dieser Ereignisse. Die Blutungsereignisse wurden anhand der BARC Definition eingeordnet und bewertet.

Die Anzahl der aus der Studie ausgeschiedenen Patienten während der 1080 Tage betrug 31, welches einen prozentualen Anteil von 9.2% ausmacht. Somit konnten abschließend 156 Studienteilnehmer der Gruppe des akuten Koronarsyndroms und 148 Probanden der Gruppe der symptomatischen KHK zugeordnet werden.

Das gesamte Patientenkollektiv dieser Studie wurde anhand ihrer oberflächlichen thrombozytären CyPA Expression kategorisiert. Dabei wurde ein mittlerer Konzentrationsgehalt an thrombozytär gebundenem CyPA festgelegt, durch den eine Gruppeneinteilung in $CyPA \leq \text{Median}$ und $CyPA > \text{Median}$ ermöglicht wurde.

Die Intention dieser Studie lag darin, die pathologische Verknüpfung des Thrombozyten-assoziierten CyPAs und kardiovaskulären Ereignissen bei Patienten mit einer KHK zu beleuchten. Unserem Wissen nach liegen keine Studien dieses Thema betreffend vor.

Die Analyse der Basischarakteristika ergab, dass es sich bei der Studienkohorte (304 Patienten) zu 70.4% um männliche Probanden im Durchschnittsalter von 68,6 Jahren handelte.

Eine Veröffentlichung im Springer-Verlag beschreibt dazu ähnliche Werte, welche ein doppelt so hohes Auftreten an ischämischen KHK Erkrankungen bei Männern und damit verbundenen stationären Aufnahmen aufführt, als bei Frauen. Begründet wurde diese Aussage mit morphologisch- und physiologischen unterschiedlichen Aufbauten der jeweiligen Herzen (Ladwig u. a. 2014). In der aktuellen Studie belegt die multivariable Analyse die bedeutende pathologische Eigenschaft des Alters der Patienten für die Gesamtmortalität, sowie den Myokardinfarkt.

Die arterielle Hypertonie stellt sich als ein Krankheitsbild der KHK auch in den Basischarakteristika mit einer Häufigkeit von 84.5% stark vertreten dar.

Diese Zahl ist nicht verwunderlich, da ein erhöhter Blutdruck zu den Hauptursachen des Auftretens einer KHK zählt (World Health Organization 2017). Die Studien von Ohtsuki u. a. 2017 und Seizer u. a. 2016 zeigen bei der Analyse der Basischarakteristika große Ähnlichkeiten.

Das Alter der überwiegend männlichen Studienteilnehmer lag bei beiden im Bereich der End-60er. Die männlichen Studienteilnehmer machten bei Seizer einen prozentualen Anteil von 73.5% und bei Ohtsuki von 65.3% aus.

Daraus lässt sich ein erhöhtes Risiko für männliche KHK Patienten ab einem Durchschnittsalter von ca. 68 Jahren an einem kardiovaskulären Ereignis zu erkranken, ableiten.

Ein ebenfalls großer Anteil von 189 Patienten litt unter einer Hyperlipidämie, welche nach einer KHK Leitlinie für Patienten zu den Risikofaktoren einer KHK zählt. Seizer u. a. berichteten bereits 2016 von einem Zusammenhang von thrombozytär gebundenem CyPA und Dyslipidämien. Auch Ohtsuki u. a. stellte eine Verbindung zwischen CyPA Werten und Dyslipidämien fest. 51% der dort untersuchten Patienten litten unter einer Fettstoffwechselstörung (Patientenleitlinie zur Nationalen Versorgungsleitlinie 2019) (Seizer u. a. 2016) (Ohtsuki u. a. 2017).

Unter der therapeutischen Medikation von ASS und Betablockern standen jeweils 179 und 181 Patienten. Die multivariable Analyse ergab, dass Patienten mit therapeutischer Einnahme von Betablockern ein höheres Mortalitätsrisiko aufwiesen. Ebenfalls war das Ereignisrisiko der Studienteilnehmer für einen kombinierten Endpunkt unter einer ASS Therapie deutlich erhöht.

Interessant war die Beobachtung, dass die durchschnittlich leicht eingeschränkte LVEF mit 50.4% keine negativen Einflüsse auf die Ereignisse Tod und den kombinierten Endpunkt hatte. Der klinische Aufnahmegrund durch ein chronisches oder akutes Koronarsyndrom stellt ein bedeutend höheres Risiko für das Auftreten des kombinierten Endpunktes dar.

Für das untersuchte Thrombozyten-assoziierte CyPA konnten wir eine unabhängige Assoziation für das Ereignis Tod finden.

In unseren Analysen zeigten sich überraschenderweise keine signifikanten Zusammenhänge zwischen Nikotinabusus und den untersuchten kardiovaskulären Ereignissen. Und dies obgleich in der Literatur schon lange der Nikotinabusus als Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse bekannt ist und Raucher mit doppelt so hoher Wahrscheinlichkeit einen ischämischen Schlaganfall erleiden als Nichtraucher. (Ockene u. a. 1997).

Die Anzahl der mit Clopidogrel behandelten Patienten unterschied sich signifikant zwischen den untersuchten Gruppen.

Dabei nahmen 26 Patienten der Gruppe $CyPA \leq \text{Median Clopidogrel}$ ein, wohingegen nur 14 Patienten der Gruppe $CyPA > \text{Median}$ das Medikament einnahmen. Folglich könnte Clopidogrel eine Auswirkung auf gebundenes und zirkulierendes CyPA haben.

Niedrigere thrombozytäre CyPA Konzentrationen sind in unserer Analyse mit einer erhöhten Gesamtmortalität assoziiert. Dies gilt ebenso für den kombinierten Endpunkt.

Die Analyse der übrigen Ereignisse wie Myokardinfarkt, ischämischer Schlaganfall und klinisch signifikante Blutung zeigten ebenfalls eine höhere Ereignisrate auf Seiten der $CyPA \leq \text{Median}$ Gruppe, auch wenn diese Unterschiede nicht statistisch signifikant waren.

Diese Ergebnisse unterscheiden sich von denjenigen, welche Ohtsuki u. a. lieferten. Dort konnte eine erhöhte Plasmakonzentration von zirkulierendem CyPA mit einer höheren negativen Ereignisrate wie dem Tod in Verbindung gebracht werden (Ohtsuki u. a. 2017). Ohtsuki u.a. bewertete in seiner Studie jedoch keine Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom. Außerdem könnte das bereits von den Thrombozyten sezernierte CyPA zu der erhöhten Plasmakonzentration in der zuvor genannten Studie beitragen.

Im Gegensatz dazu legte die von Maaly u. a. 2019 durchgeführte Studie einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten eines akuten Koronarsyndroms und erhöhten extrazellulären CyPA Werten vor. Das akute Koronarsyndrom stellte dort das Einschlusskriterium dar (Maaly u. a.2019).

Seizer u. a. beschrieben bereits im Jahre 2016 die Möglichkeit, dass Thrombozyten nach ihrer Aktivierung das zuvor oberflächlich exprimierte CyPA erneut in ihrem Zytoplasma verinnerlichen. Des Weiteren berichtete diese Studie, dass erhöhte oberflächlich exprimierte CyPA Werte zu einer chronischen Thrombozytenaktivierung führen und zudem eine vermehrte Stimulation proinflammatorischer Zytokine zur Folge haben (Seizer u. a. 2016).

Dies könnte eine weitere Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse darstellen. Wie bereits bekannt, lassen sich bei Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt hohe Konzentrationen an EMMPRIN, MMP-9 und MT1-MMP nachweisen (Schmidt u. a. 2006). Egawa u.a. zeigten, dass MT1-MMP als Sheddasen von zellulärem EMMPRIN fungieren (Egawa u. a. 2006).

Dies lässt sich auch auf den EMMPRIN-CyPA Komplex übertragen.

Durch das kontinuierliche Abtrennen des EMMPRIN-CyPA Komplexes von der Thrombozytenoberfläche durch die Sheddase, kommt es während eines Myokardinfarkts zu einer verringerten exprimierten CyPA Konzentration auf Thrombozyten. Dies könnte eine weitere Erklärung dafür bieten, dass sich die geringere CyPA Konzentration während eines akuten Myokardinfarktes, sowie die Assoziationen mit thromboischämischen Ereignissen im Verlauf finden.

Mit dieser durchgeführten Studie konnten wir Assoziationen zwischen Thrombozyten-assoziiertem CyPA und auftretenden kardiovaskulären Ereignissen in einem 3-Jahres Follow-up herstellen.

Durch die Einbeziehung des thrombozytären CyPA als potentiellen Biomarker für Patienten mit einer bestehenden KHK, könnten Risikoprognosen bezüglich neu oder erneut auftretender kardiovaskulärer Ereignisse möglicherweise zutreffender abgegeben werden. Weiterführend könnte dies eine gezielte medikamentöse beziehungsweise stringenter Therapie erleichtern.

Weitere forschungsrelevante Ansätze sind die mögliche Inhibierung des Acetylierungsvorganges durch ROS induzierte CyPA Sekretionen in den Extrazellularraum. Inwiefern dynamische Veränderungen des Thrombozyten-assoziierten CyPAs in die Pathogenese der Atherosklerose involviert sind, wird die künftige Forschung zeigen.

Limitationen

Zu den Limitationen unserer Studie gehören eine moderate Studienteilnehmerzahl von 335 Patienten sowie eine moderate Nachverfolgungszeit über 1080 Tage.

Außerdem schlossen wir Patienten mit chronischem sowie akutem Koronarsyndrom ein, was die CyPA Konzentration beeinflussen könnte.

Die thrombozytäre CyPA Konzentration wurde nur am Tag des Studieneinschlusses gemessen. Dadurch bleiben Auswirkungen einer veränderten thrombozytären CyPA Konzentration auf die Inzidenz thromboischämischer Ereignisse spekulativ.

Zusammenfassung

In den Industrienationen steht die KHK an oberster Stelle der Todesursachen. Obwohl in der Vergangenheit viel Forschungsarbeit für Diagnostik und neue Therapieansätze geleistet wurde, sind die Ergebnisse für KHK Patienten nicht ausreichend zufriedenstellend.

In bisherigen Studien wurden Biomarker wie CRP und BNP untersucht. Diese Biomarker konnten keine prognostisch ausreichenden und zielsicheren Risikoabschätzungen ermöglichen. Daher ist eine Erforschung weiterer Biomarker unverzichtbar.

Bereits stattgefundene Studien haben das ubiquitär vorkommende Immunophilin CyPA als weiteren erfolgsversprechenden Biomarker untersucht. CyPA trägt mit seinen intrazellulären, als auch extrazellulären Funktionen zum Aufrechterhalt des Organismus bei. Intrazellulär unterstützt es als Isomerase die Proteinfaltung, den zellulären Transport und Zellsignale. Extrazellulär wirkt CyPA auf Endothelzellen und VSMCs stark entzündungsfördernd und wird selbst beispielsweise durch oxidativen Stress freigesetzt. Auch eine Aktivierung der Thrombozyten bewirkt eine Freisetzung und Expression des CyPA. Vorausgegangene Untersuchungen haben eine hohe CyPA Plasmakonzentration in Korrelation mit auftretenden kardiovaskulären Ereignissen bei KHK Patienten gebracht.

Dabei zeigte eine erhöhte Konzentration an extrazellulärem CyPA eine höhere Ereignisrate.

In unserer Studie untersuchten wir den Zusammenhang zwischen Thrombozyten-assoziiertem CyPA und kardiovaskulären Ereignissen in einem 3-Jahres Follow-up.

Insgesamt wurden 335 Patienten in diese Studie eingeschlossen. Den Aufnahmegrund stellte entweder ein akutes (n=156) oder chronisches Koronarsyndrom (n=148) dar. Während einer perkutanen Koronarintervention wurden von den Studienteilnehmern Blutproben entnommen. Diese wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie auf Thrombozyten-assoziiertes CyPA untersucht. Anhand dieser Konzentrationswerte erfolgte eine Gruppeneinteilung des

thrombozytären CyPA in CyPA \leq Median (n=152) und CyPA $>$ Median (n=152). Nach 1080 Tagen wurde mittels eines jeweiligen Telefoninterviews das Auftreten vergangener kardiovaskulärer Ereignisse (Myokardinfarkt, Tod, ischämischer Schlaganfall) oder einer klinisch relevanten Blutung erfragt.

Durch unsere Analysen fanden wir heraus, dass eine geringere thrombozytäre CyPA Konzentration mit einer höheren Ereignisrate verbunden ist. Deutlich zeigte sich dies bei der Betrachtung des kombinierten Endpunktes und der Gesamtmortalität.

Von den 71 Patienten, welche einen kombinierten Endpunkt erlitten, gehörten 43 Patienten der Gruppe CyPA \leq Median an ($p=0.042$). 23 der insgesamt 32 verstorbenen Patienten hatten zu Studienbeginn eine geringere thrombozytäre CyPA Konzentration ($p=0.009$).

Des Weiteren stellte sich in unserer Studie eine unabhängige Assoziation einer niedrigen thrombozytären CyPA Konzentrationen mit dem Ereignis Tod dar.

Über die Inklusion des thrombozytären CyPA in Biomarker-basierte Risikostratifizierungssysteme könnte die Prognoseeinschätzung für KHK Patienten erleichtert werden. Dies könnte zu einem weiteren Schritt in die Richtung individualisierter Therapiekonzepte führen.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht:

Rath D, von Ungern-Sternberg S, Heinzmann D, Sigle M, Monzien M, Horstmann K, Schaeffeler E, Winter S, Müller K, Grogga-Bada P, Zdanyte M, Borst O, Zerneck A, Gawaz M, Martus P, Schwab M, Geisler T, Seizer P. Platelet surface expression of cyclophilin A is associated with increased mortality in patients with symptomatic coronary artery disease. J Thromb Haemost. 2020;18:234-242

Literaturverzeichnis

- Aumüller**, Gerhard u. a. 2010. *Duale Reihe: Anatomie*. 2. Auflage Stuttgart: Thieme. 137–138.
- Bergheanu**, S. C., Bodde, M. C. & Jukema, J. W. 2017. Pathophysiology and treatment of atherosclerosis. *Netherlands Heart Journal* 25, 4, 231–242.
- Chang**, Chen-Shu u. a. 2013. Cyclophilin-A: a novel biomarker for untreated male essential hypertension. *Biomarkers: Biochemical Indicators of Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals* 18, 8, 716–720.
- Chang**, Chen-Shu u. a. 2020. Association of cyclophilin A level and pulse pressure in predicting recurrence of cerebral infarction. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences* 36, 2, 122–128.
- Chen**, Jian u. a. 2016. Interaction of cyclophilin A with a novel binding protein, SR-25, and characterization of their expression pattern in Chinese hepatocellular carcinoma patients. *Oncology Letters* 12, 6, 5254–5260.
- Coenen**, Daniëlle M., Mastenbroek, Tom G. & Cosemans, Judith M. E. M. 2017. Platelet interaction with activated endothelium: mechanistic insights from microfluidics. *Blood* 130, 26, 2819–2828.
- Crowther**, Mark A. 2005. Pathogenesis of Atherosclerosis. *ASH Education Program Book* 2005, 1, 436–441.
- Davi**, Giovanni & Patrono, Carlo 2007. Platelet Activation and Atherothrombosis. *The new england journal of medicine* 357, 2482–2494.
- Davis**, Tara L. u. a. 2010. Structural and Biochemical Characterization of the Human Cyclophilin Family of Peptidyl-Prolyl Isomerases. *PLoS Biology* 8, 7, .
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2911226/> [Stand 2019-06-28].
- Directive 2001/20/EC** of the European Parliament and of the Council of 4 April 2001 on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the member states relating to the implementation of good clinical practice in the conduct of clinical trials on medicinal products for human use 2002. *Medicinska Etika a Bioetika: Casopis Ustavu Medicinske Etiky a Bioetiky = Medical Ethics & Bioethics: Journal of the Institute of Medical Ethics & Bioethics* 9, 1–2, 12–19.
- Dürschmied**, Daniel, Bode, Christoph & von zur Mühlen, Constantin 2019. *Chronisches Koronarsyndrom: Neudefinition der „stabilen“ koronaren Herzerkrankung*. Deutsches Ärzteblatt. <https://www.aerzteblatt.de/archiv/210100/Chronisches->

Koronarsyndrom-Neudefinition-der-stabilen-koronaren-Herzerkrankung [Stand 2021-05-30].

Egawa, Nagayasu u. a. 2006. Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase (MT1-MMP/MMP-14) Cleaves and Releases a 22-kDa Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN) Fragment from Tumor Cells. *Journal of Biological Chemistry* 281, 49, 37576–37585.

Elvers, Margitta u. a. 2012. Intracellular cyclophilin A is an important Ca²⁺ regulator in platelets and critically involved in arterial thrombus formation. *Blood* 120, 6, 1317–1326.

Frenette, P. S. u. a. 1995. Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 16, 7450–7454.

Gawaz, Meinrad 2001. *Blood Platelets: Physiology, Pathophysiology, Membrane Receptors, Antiplatelet Principles, and T.* 1. Auflage Stuttgart: Thieme. 4-8.

Geraldo, Reinaldo Barros u. a. 2014. Platelets: Still a Therapeutical Target for Haemostatic Disorders. *International Journal of Molecular Sciences* 15, 10, 17901–17919.

Ghoshal, Kakali & Bhattacharyya, Maitree 2014. Overview of Platelet Physiology: Its Hemostatic and Nonhemostatic Role in Disease Pathogenesis. *The Scientific World Journal* 2014, . <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3960550/> [Stand 2019-06-30].

Guo, Huiming u. a. 2000. EMMPRIN (CD147), an Inducer of Matrix Metalloproteinase Synthesis, Also Binds Interstitial Collagenase to the Tumor Cell Surface. *Cancer Research* 60, 4, 888–891.

Iacono, Kathryn T. u. a. 2007. CD147 Immunoglobulin Superfamily Receptor Function and Role in Pathology. *Experimental and molecular pathology* 83, 3, 283–295.

ICH harmonized tripartite guideline: Guideline for Good Clinical Practice 2001. *Journal of Postgraduate Medicine* 47, 1, 45–50.

Kallen, Jörg u. a. 1991. Structure of human cyclophilin and its binding site for cyclosporin A determined by X-ray crystallography and NMR spectroscopy. *Nature* 353, 6341, 276–279.

Klinke, Rainer u. a. 2005. *Physiologie: Ideal für die neue AO.* 5., vollst. überarb. Stuttgart: Thieme. 245-247.

Knuuti, Juhani u. a. 2020. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes: The Task Force for the diagnosis and management of

chronic coronary syndromes of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal* 41, 3, 407–477.

Kumari, Sumita u. a. 2013. Cyclophilins. *Plant Signaling & Behavior* 8, 1, .

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3745578/> [Stand 2019-06-28].

Ladwig, K.-H. & Waller, C. 2014. Geschlechtsspezifische Aspekte bei der koronaren Herzkrankheit. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 57, 9, 1083–1091.

Lindemann, S. u. a. 2007. Platelets, inflammation and atherosclerosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 5, s1, 203–211.

Lüllmann-Rauch, Renate 2009. *Taschenlehrbuch Histologie*. 3. Auflage Stuttgart: Thieme. 268-270.

Lusis, Aldons J. 2000. Atherosclerosis. *Nature* 407, 6801, 233–241.

Maaly, M. Mabrouk, M. D. & Thorya, E. Badawy, M. D. 2019. Study of Serum Cyclophilin A Level in Patients with Acute Coronary Syndrome. *The Medical Journal of Cairo University* 87, June, 2611–2619.

Malakar, Arup Kr. u. a. 2019. A review on coronary artery disease, its risk factors, and therapeutics. *Journal of Cellular Physiology* 234, 10, 16812–16823.

Mehran, Roxana u. a. 2011. Standardized Bleeding Definitions for Cardiovascular Clinical Trials. *Circulation* 123, 23, 2736–2747.

Muramatsu, Takashi 2016. Basigin (CD147), a multifunctional transmembrane glycoprotein with various binding partners. *Journal of Biochemistry* 159, 5, 481–490.

Murata, K., Motayama, T. & Kotake, C. 1986. Collagen types in various layers of the human aorta and their changes with the atherosclerotic process. *Atherosclerosis* 60, 3, 251–262.

Napoli, C u. a. 1997. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *Journal of Clinical Investigation* 100, 11, 2680–2690.

Nawroth, R. u. a. 2008. EMMPRIN (CD147). *Der Urologe* 47, 9, 1152–1156.

Nawroth, R. u. a. 2010. EMMPRIN (CD147). *Der Pathologe* 31, 2, 251–254.

Niemeyer, Charlotte & Eggert, Angelika 2017. *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*. 2. Auflage Springer-Verlag. 115-118.

Nigro, P, Pompilio, G & Capogrossi, M C 2013. Cyclophilin A: a key player for human disease. *Cell Death & Disease* 4, 10, e888.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3920964/> [Stand 2019-06-27].

- Nording**, Henry M., Seizer, Peter & Langer, Harald F. 2015. Platelets in Inflammation and Atherogenesis. *Frontiers in Immunology* 6, .
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4351644/> [Stand 2019-10-13].
- Ockene**, Ira S. & Miller, Nancy Houston 1997. Cigarette Smoking, Cardiovascular Disease, and Stroke. *Circulation* 96, 9, 3243–3247.
- Ohtsuki**, Tomohiro u. a. 2017. Prognostic Impacts of Plasma Levels of Cyclophilin A in Patients With Coronary Artery Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 37, 4, 685–693.
- Pahwa**, Roma & Jialal, Ishwarlal 2019. Atherosclerosis. In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507799/> [Stand 2019-06-26].
- Patientenleitlinie** zur Nationalen Versorgungsleitlinien 2019. Chronische Koronare Herzkrankheit: KHK. Patientenleitlinie zur Nationalen VersorgungsLeitlinie, 3. Auflage. Version 1. 19.
- Pötzsch**, Bernd & Madlener, Katharina 2010. *Hämostaseologie: Grundlagen, Diagnostik und Therapie*. Springer-Verlag. 18-22.
- Rafieian-Kopaei**, Mahmoud u. a. 2014. Atherosclerosis: Process, Indicators, Risk Factors and New Hopes. *International Journal of Preventive Medicine* 5, 8, 927–946.
- Ramachandran**, Surya, Vinitha, Anandan & Kartha, Cheranellore Chandrasekharan 2016. Cyclophilin A enhances macrophage differentiation and lipid uptake in high glucose conditions: a cellular mechanism for accelerated macro vascular disease in diabetes mellitus. *Cardiovascular Diabetology* 15, .
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5094075/> [Stand 2019-06-28].
- Rath**, Dominik u. a. 2014. Expression of stromal cell-derived factor-1 receptors CXCR4 and CXCR7 on circulating platelets of patients with acute coronary syndrome and association with left ventricular functional recovery. *European Heart Journal* 35, 6, 386–394.
- Rath**, Dominik u. a. 2020. Platelet surface expression of cyclophilin A is associated with increased mortality in patients with symptomatic coronary artery disease. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 18, 1, 234–242.
- Roskamm**, Helmut u. a. 2013. *Herzkrankheiten: Pathophysiologie Diagnostik Therapie*. Springer-Verlag. 903.
- Saad**, Jennifer & Schoenberger, Lisa 2019. Physiology, Platelet Activation. In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482478/> [Stand 2019-10-11].

- Sacco**, Ralph u. a. 2013. An Updated Definition of Stroke for the 21st Century. *Stroke* 44, 7, 2064–2089.
- Satoh**, Kimio, Shimokawa, Hiroaki & Berk, Bradford C. 2010. Cyclophilin A. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* 74, 11, 2249–2256.
- Schmidt**, Roland u. a. 2006. Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer Regulates Matrix Metalloproteinase Activity in Cardiovascular Cells. *Circulation* 113, 6, 834–841.
- Schmidt**, Roland u. a. 2008. Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (CD147) Is a Novel Receptor on Platelets, Activates Platelets, and Augments Nuclear Factor κ B–Dependent Inflammation in Monocytes. *Circulation Research* 102, 3, 302–309.
- Schmied**, Christian M. 2018. Bewegung und Sport in der Therapie chronischer Erkrankungen – Koronare Herzkrankheit. *Praxis* 107, 17–18, 959–964.
- Seizer**, Peter u. a. 2015. Extracellular cyclophilin A activates platelets via EMMPRIN (CD147) and PI3K/Akt signaling, which promotes platelet adhesion and thrombus formation in vitro and in vivo. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 35, 3, 655–663.
- Seizer**, Peter u. a. 2016. Platelet-bound cyclophilin A in patients with stable coronary artery disease and acute myocardial infarction. *Platelets* 27, 2, 155–158.
- Seizer**, Peter, Gawaz, Meinrad & May, Andreas E. 2014. Cyclophilin A and EMMPRIN (CD147) in cardiovascular diseases. *Cardiovascular Research* 102, 1, 17–23.
- Singh**, Anumeha, Museedi, Abdulrahman S. & Grossman, Shamai A. 2020. *Acute Coronary Syndrome*. StatPearls Publishing.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459157/> [Stand 2021-05-30].
- Singh**, Raja B u. a. 2002. Pathogenesis of atherosclerosis: A multifactorial process. *Experimental & Clinical Cardiology* 7, 1, 40–53.
- Soe**, Nwe Nwe u. a. 2014. Acetylation of cyclophilin A is required for its secretion and vascular cell activation. *Cardiovascular Research* 101, 3, 444–453.
- Stary**, H. C. u. a. 1994. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 89, 5, 2462–2478.
- Taguchi**, Isao, Abe, Shichiro & Inoue, Teruo 2013. Cyclophilin A Is a Promising Predictor of Coronary Artery Disease. *Circulation Journal* 77, 2, 321–322.
- Wang**, Lian u. a. 2014. Cyclophilin A is an important mediator of platelet function by regulating integrin α IIb β 3 bidirectional signalling. *Thrombosis and Haemostasis* 111, 05, 873–882.
- Wang**, Ping & Heitman, Joseph 2005. The cyclophilins. *Genome Biology* 6, 7, 226.

Watashi, Koichi & Shimotohno, Kunitada 2007. Cyclophilin and Viruses: Cyclophilin as a Cofactor for Viral Infection and Possible Anti-Viral Target. *Drug Target Insights* 2, 9–18.

Weber, Christian & Noels, Heidi 2011. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nature Medicine* 17, 11, 1410–1422.

World Health Organization 2017. *Cardiovascular diseases (CVDs)*.

[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
[Stand 2020-04-2].

World Medical Association Declaration of Helsinki. Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects 1997. *Cardiovascular Research* 35, 1, 2–3.

Xue, Chao, Sowden, Mark P. & Berk, Bradford C. 2018. Extracellular and Intracellular Cyclophilin A, Native and Post-Translationally Modified, Show Diverse and Specific Pathological Roles in Diseases. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 38, 5, 986–993.

Yan, Jinchuan u. a. 2012. The clinical implications of increased cyclophilin A levels in patients with acute coronary syndromes. *Clinica Chimica Acta* 413, 7, 691–695.

Yurchenko, Vyacheslav, Constant, Stephanie & Bukrinsky, Michael 2006. Dealing with the family: CD147 interactions with cyclophilins. *Immunology* 117, 3, 301–309.

Zierfuss, Bernhard 2017. EMMPRIN (CD 147) Werte sind mit fatalen kardialen Ereignissen in einer pAVK Kohorte in einem 5 Jahres Beobachtungsintervall assoziiert. <https://dgk.org/pressemitteilungen/2017-esc-kongress/2017-esc-wissenschaftliche/emmprin-cd-147-werte-sind-mit-fatalen-kardialen-ereignissen-in-einer-pavk-kohorte-in-einem-5-jahres-beobachtungsintervall-assoziert/> [Stand 2019-10-12].

Anlagen

Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde in der Medizinischen Klinik III – Abteilung Innere Medizin-Kardiologie und Angiologie des Universitätsklinikums Tübingen unter der Anleitung von Professor Dr. med. Tobias Geisler und PD Dr. med. Dominik Rath durchgeführt.

Das Studiendesign entstand durch Prof. Dr. med. Tobias Geisler, PD Dr. med. Dominik Rath und mir.

Die Akquise der Daten wurde durch mich und Dr. med. dent. Katja Horstmann durchgeführt.

Die Interpretation und Analyse der vorliegenden Daten erfolgten durch mich und PD Dr. med. Dominik Rath.

Betreut wurde diese Arbeit durch PD Dr. med. Dominik Rath.

Ich versichere, die Doktorarbeit selbständig nach Anleitung durch PD Dr. med. Dominik Rath verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 03.01.2023

Unterschrift

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die mir mein Studium und die vorliegende Dissertationsschrift ermöglicht haben.

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Tobias Geisler für die Überlassung des Themas und die Betreuung.

Bedanken möchte ich mich bei meinem Betreuer PD Dr. med. Dominik Rath, der mit seiner netten und fachlichen Unterstützung mir diese Arbeit ermöglicht hat. Für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens und Beantwortung jeder noch so kleinen Frage, Danke!

Meiner über alles geliebten Familie. Die mir durch ihre Unterstützung und grenzenloser Hilfe das Studium und damit die vorliegende Dissertation ermöglicht haben. Ohne sie wäre all dies nicht möglich gewesen!

Meinem lieben Ehemann Thomas, der mich durch alle Höhen und Tiefen bei der Erstellung meiner Dissertationsschrift begleitet hat und mir mit Rat und Tat zur Seite stand.