

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin III
(Schwerpunkt: Kardiologie und Kreislauferkrankungen)

Der Einfluss von Gremlin-1 in der koronaren Herzkrankheit
und seine funktionelle Bedeutung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Schmid, Martina

2017

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter: Professor Dr. T. Geisler
2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Mahrholdt
Tag der Disputation: 03.11.2017

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Die koronare Herzkrankheit	1
1.2 Die Atherosklerose als pathologische Ursache der koronaren Herzkrankheit	2
1.2.1 Pathogenese der Atherosklerose	2
1.2.2 Komplikationen der Atherosklerose: Die Plaqueruptur	5
1.2.3 Diabetiker als Risikogruppe für die Atherosklerose und KHK	7
1.3 Thrombozyten und thrombozytäre Marker	9
1.3.1 Aufbau und Funktion von Thrombozyten	9
1.3.2 Die Hämostase und thrombembolische Ereignisse	9
1.3.3 Die Rolle der Thrombozyten in der Atherosklerose	10
1.3.4 Thrombozytäre Adhäsionsrezeptoren	11
1.3.5 Der Macrophage migration inhibitory factor (MIF)	14
1.4 Gremlin-1	16
1.4.1 Die Entdeckung von Gremlin-1	16
1.4.2 Aufbau und Struktur von Gremlin-1	16
1.4.3 Wirkung von Gremlin-1	17
1.4.4 Gremlin-1 als Gegenspieler von MIF	18
1.4.5 Die Rolle von Gremlin-1 in der Atherosklerose und in der KHK	19
1.4.6 Gremlin-1 bei Diabetes mellitus	22
1.4.7 Prognostische Bedeutung von Gremlin-1	22
1.5 Fragestellung dieser Arbeit	23

2	Material und Methoden	25
2.1	Materialien	25
2.1.1	Blutentnahme und -aufbereitung	25
2.1.2	Färbung und Durchflusszytometrie	26
2.1.3	Plasmatische Messungen mittels ELISA	27
2.1.4	Statistische Auswertung	27
2.2	Auswahl des Patientenkollektivs	27
2.3	Methoden	28
2.3.1	Gewinnung und Aufbereitung der Blutproben	28
2.3.2	Messung der thrombozytären Konzentrationen mittels Durchflusszytometrie	29
2.3.3	Messung der Plasmakonzentrationen mittels ELISA	32
2.3.4	Erhebung der Patientendaten	32
2.3.5	Statistische Auswertung	34
3	Ergebnisse	35
3.1	Beschreibung der Patientenkohorten	35
3.1.1	Patientencharakteristika der Kohorte 1	35
3.1.2	Patientencharakteristika der Kohorte 2	40
3.2	Einfluss der Patientencharakteristika auf die thrombozytäre Gremlin-1-Konzentration	44
3.3	Verhältnis der thrombozytären Marker zueinander	46
3.4	Thrombozytäre Marker und Ausprägung der koronaren Herzkrankheit	47
3.4.1	Die Thrombozytenaktivierungsmarker	48
3.4.2	Thrombozytäres Gremlin-1	49
3.4.3	Thrombozytäres MIF	50
3.4.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	50
3.5	Prognostische Bedeutung der thrombozytären Gremlin-1-Konzentration	51
3.5.1	Ereignisse während der Nachverfolgungsdauer	51
3.5.2	Prognostische Bedeutung von Gremlin-1	53
3.5.3	Thrombozytäre Gremlin-1-Konzentration bei Patienten mit Auftreten eines Endpunktes	55
3.6	Subgruppenanalyse: Patienten mit Diabetes mellitus	57
3.6.1	Thrombozytäre und plasmatische Konzentrationen bei Diabetikern und Nichtdiabetikern	57
3.6.2	Gremlin-1 und MIF bei Diabetikern und Nichtdiabetikern mit stabiler Angina pectoris und akutem Koronarsyndrom	60

3.7	Zusammenfassung der Ergebnisse	63
4	Diskussion	64
4.1	Betrachtung der Patientenkohorten	64
4.1.1	Patientencharakteristika bei Kohorte 1	64
4.1.2	Patientencharakteristika bei Kohorte 2	65
4.2	Einfluss der Patientencharakteristika auf die thrombozytäre Gremlin-1-Konzentration	65
4.3	Verhältnis der thrombozytären Marker zueinander	66
4.4	Thrombozytäre Aktivierungsmarker und klinisches Erscheinungsbild . . .	67
4.5	Klinische Bedeutung der Gremlin-1-Konzentration	67
4.6	Klinische Bedeutung der MIF-Konzentration	68
4.7	Gremlin-1 im Vergleich mit MIF	69
4.8	Prognostische Bedeutung der thrombozytären Gremlin-1-Konzentration .	69
4.9	Subgruppenanalyse: Patienten mit Diabetes mellitus	70
4.10	Schlussfolgerung dieser Arbeit	72
4.11	Limitationen der Studie	73
5	Zusammenfassung	74
	Literaturverzeichnis	76
	Erklärung zum Eigenanteil	88
	Danksagung	89

Abbildungsverzeichnis

1	Einwanderung monozytärer Zellen in die Intima	3
2	Die Bildung einer fibrös-fettigen Plaque	4
3	Reifung der atherosklerotischen Plaque	5
4	Plaqueruptur und thrombembolische Komplikationen	6
5	Der Einfluss des MIF in der Atherogenese	15
6	Modell der molekularen Interaktion von Gremlin-1 und MIF	19
7	Der Einfluss von Gremlin-1 in der inflammatorischen Reaktion und seine Interaktion mit MIF	20
8	Beispiel einer durchflusszytometrischen Messung zur Bestimmung von Gremlin-1	31
9	Verhältnis der Gremlin-1-Konzentration zu den Konzentrationen von MIF, GPVI, CD62p und PAC-1	47
10	Mittlere thrombozytäre Konzentration von GPVI, CD62p und PAC-1 bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit	48
11	Mittlere thrombozytäre Gremlin-1-Konzentration bei Patienten mit koro- narer Herzkrankheit	49
12	Mittlere thrombozytäre MIF-Konzentration bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit	50
13	Ereignisfreies Überleben in Abhängigkeit der initialen Gremlin-1-Konzen- tration	54
14	Initiale Gremlin-1-Konzentration und Ereignisse bei Patienten nach 6 Mo- naten, einem Jahr und über die Gesamtdauer	56
15	Thrombozytäre und plasmatische Gremlin-1-Konzentration bei Diabeti- kern und Nichtdiabetikern	58
16	Thrombozytäre und plasmatische MIF-Konzentration bei Diabetikern und Nichtdiabetikern	58
17	Thrombozytäres und plasmatisches Verhältnis von Gremlin-1 zu MIF bei Diabetikern und Nichtdiabetikern	59

18	Thrombozytäres und plasmatisches Gremlin-1 bei Diabetikern und Nichtdiabetikern mit SAP und ACS	61
19	Thrombozytäres und plasmatisches MIF bei Diabetikern und Nichtdiabetikern mit SAP und ACS	62
20	Thrombozytäres und plasmatisches Gremlin-1/MIF-Verhältnis bei Diabetikern und Nichtdiabetikern mit SAP und ACS	62

Tabellenverzeichnis

1	Geräte und Materialien zur Blutentnahme und -aufbereitung	25
2	Reagenzien und Antikörper zur Färbung	26
3	Geräte, Materialien und Reagenzien zur Durchflusszytometrie	27
4	Geräte und Materialien für die ELISA-Messungen	27
5	Färbeprotokoll	30
6	Aufnahmegrund der untersuchten Patienten	35
7	Patientencharakteristika aufgegliedert nach Ausprägung der KHK (Kohorte 1)	36
8	Patientencharakteristika bei Diabetikern und Nichtdiabetikern (Kohorte 1)	39
9	Patientencharakteristika aufgegliedert nach Ausprägung der KHK (Kohorte 2)	41
10	Patientencharakteristika bei Diabetikern und Nichtdiabetikern (Kohorte 2)	42
11	Einfluss von demographischen Daten, Vorerkrankungen und Vormedikation auf die thrombozytäre Gremlin-1-Konzentration.	44
12	Zusammenhang der thrombozytären Konzentrationen der Marker	46
13	Konzentration der thrombozytären Marker in der koronaren Herzkrankheit	51
14	Ereignisse während der Nachverfolgungsdauer verglichen mit der Konzentration des thrombozytären Gremlin-1	52
15	Plasmatische Marker bei Patienten mit stabiler Angina pectoris und akutem Koronarsyndrom, Kohorte 2	57
16	Konzentrationen der thrombozytären und plasmatischen Marker bei Diabetikern und Nichtdiabetikern	60

Abkürzungsverzeichnis

ACE-Hemmer	Angiotensin Converting Enzyme-Hemmer
ACS	akutes Koronarsyndrom
ADP	Adenosindiphosphat
ApoE^{-/-}-Maus	Apolipoprotein E-defiziente Maus
ASS	Acetylsalicylsäure
AT II	Angiotensin II
AT1-Antagonist	Angiotensin-1-Rezeptorantagonist
BMI	Body-Mass-Index
BMP	Bone morphogenetic protein
Ca-Antagonist	Calciumkanalblocker
CABG	Koronararterien-Bypass
CAN	Cerberus and Dan
CD	Cluster of differentiation
CD42b	Cluster of Differentiation 42b
CD62p	P-Selektin
CK	Kreatinkinase
CPDA	Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin
CRP	C-reaktives Protein
CXCR	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor
DAN	differential screening-selected gene aberrative in neuroblastoma
drm	down-regulated by v-mos
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Ejektionsfraktion
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht

GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GP2b3a-Rezeptor	Glykoprotein-2b3a-Rezeptor
GPVI	Glykoprotein VI
IAP	instabile Angina pectoris
IDF	International Diabetes Federation
KHK	koronare Herzkrankheit
LDL	low density lipoprotein
LV-Funktion	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MDRD	Modification of Diet Renal Disease
MFI	mean fluorescence intensity
MI	Myokardinfarkt
MIF	Macrophage migration inhibitory factor
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NSTEMI	Nicht-ST-Streckenhebungs-Myokardinfarkt
oxLDL	oxidiertes low density lipoprotein
P2Y12-Inhibitor	P2Y12-Rezeptor-Antagonist
PAC-1	Procaspase-activating compound 1
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCI	perkutane Koronarintervention
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PPI	Protonenpumpeninhibitor
RAAS-System	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SAP	stabile Angina pectoris
SSC	Seitwärtsstreulicht
STEMI	ST-Streckenhebungs-Myokardinfarkt
TGF-β	Transforming growth factor β
TIA	transitorische ischämische Attacke
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
TuePIC	Tuebingen Platelet Investigative Consortium
v-mos	Moloney Sarcoma Virus
VEGFR-2	vascular endothelial growth factor 2

Kapitel 1 Einleitung

1.1 Die koronare Herzkrankheit

Die koronare Herzkrankheit (KHK) ist eine chronische Erkrankung des Herzens, bei welcher ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf der Herzmuskelzellen besteht. Die pathologische Grundlage der KHK ist die Atherosklerose. Diese stellt eine chronisch-entzündliche Erkrankung der großen und mittelgroßen Koronararterien dar, welche zu Verengungen und Verlegungen der Gefäße führt und somit die Sauerstoffversorgung des Herzmuskelgewebes beeinträchtigt. Zu den Manifestationen der KHK zählt, als chronische Ausprägung, die stabile Angina pectoris (SAP). Akute Ausprägungen sind die instabile Angina pectoris (IAP) und der akute Myokardinfarkt.

Die KHK ist weltweit verbreitet und insbesondere in den Industriestaaten Ursache vieler Krankheits- und Todesfälle. Dem Statistischen Amt der Bundesrepublik Deutschland zufolge sind in Deutschland 20,7% der Todesfälle (69 890 Personen) im Jahr 2014 auf eine KHK zurückzuführen. 14,3% (48 181 Personen) starben an den Auswirkungen eines akuten Myokardinfarktes [1]. Damit belegt die KHK in der Statistik der Todesursachen in Deutschland seit vielen Jahren den ersten Rang. Insgesamt sind deutschlandweit 6,7% der Frauen und 9,9% der Männer von einer KHK betroffen. Bei den über 65-Jährigen steigt der Anteil der Erkrankten auf 28,2% der Männer und 18,4% der Frauen [2].

Die Pathogenese der KHK und ihr Verlauf sind noch nicht vollständig verstanden. In dieser Arbeit werden anhand von klinischen Untersuchungen Zusammenhänge zwischen mehreren thrombozytären Markern und dem Verlauf einer KHK hergestellt. Es wird untersucht, ob und wie sich die Konzentrationen der thrombozytären Marker bei einem stabilen Verlauf der KHK und bei einer akuten Manifestation unterscheiden. Die Untersuchungen werden weiter anhand der Risikofaktoren der KHK aufgeschlüsselt. Das Ziel ist, anhand dieser Zusammenhänge, einen weiteren Baustein für ein tieferes Verständnis der KHK zu erlangen. Im Weiteren wird zunächst die theoretische Basis für diese Untersuchungen gelegt.

Hierzu zählt die Beschreibung der Atherosklerose als pathologische Grundlage der KHK. Anschließend werden die Funktion der Thrombozyten und die untersuchten thrombozytären Marker näher beschrieben.

1.2 Die Atherosklerose als pathologische Ursache der koronaren Herzkrankheit

Als Hauptursache der KHK gilt die Atherosklerose. Ein grundlegendes Verständnis der Atherosklerose ist somit ein notwendiger Baustein zum Verständnis der KHK. Die Atherosklerose ist eine chronisch-entzündliche Veränderung der Arterien. Sie ist nicht auf die Herzkranzgefäße beschränkt, sondern zeigt neben der KHK auch extrakardiale Manifestationen wie die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) und den ischämischen Schlaganfall.

Als Hauptrisikofaktoren für die Entstehung einer Atherosklerose wurden ein erhöhtes Lebensalter, das männliche Geschlecht, erbliche Faktoren, Bluthochdruck, Nikotingenuss, Adipositas sowie Störungen des Fett- und Zuckerstoffwechsels gefunden [3–5]. Weitere Risikofaktoren sind eine erhöhte Aktivität des Immunsystems (z.B. bei rheumatischen Erkrankungen [6, 7]) und psychische Erkrankungen wie beispielsweise die Depression [8–10]. Der Einfluss einer eingeschränkten Nierenfunktion auf die Entwicklung einer Atherosklerose ist umstritten [11–15].

1.2.1 Pathogenese der Atherosklerose

Die Pathogenese der Artherosklerose ist noch nicht vollständig geklärt. Im Verlauf der Atherosklerose bildet sich an den Gefäßwänden eine atherosklerotische Plaque aus. Diese kann das Gefäßlumen einengen, dadurch die Gewebedurchblutung vermindern und somit zu einer Ischämie des betroffenen Gewebes führen. Über den detaillierten Verlauf der Atheroskleroseentstehung entwickelten sich in den letzten Jahrzehnten einige unterschiedliche, sich teils ergänzende, Theorien. Die aktuell am besten gefestigte Theorie ist die Response-to-injury-Hypothese nach Ross und Glomset, welche nachfolgend näher erläutert wird. Die Pathogenese der Atherosklerose wird hierbei in fünf Phasen unterteilt [16–19]. Diese werden weiter in den Abbildungen 1, 2 und 3 veranschaulicht.

Phase I (Initiale Phase): Die initiale Phase ist durch eine endotheliale Dysfunktion gekennzeichnet. Durch bekannte Risikofaktoren wie eine arterielle Hypertonie, Nikotina-

busus, eine hohe Plasmalipidkonzentration [20] und eine gestörte Hämodynamik des Blutflusses entsteht eine lokale Entzündungsreaktion an den Gefäßwänden, welche eine gestörte Funktion des Gefäßendothels bedingt. Aufgrund dieser endothelialen Dysfunktion [20] wird low density lipoprotein (LDL) in die Intima der Gefäße eingelagert. Das eingelagerte LDL ist empfindlich für enzymatische Reaktionen und Oxidationsprozesse [21, 22]. In oxidierter Form hat LDL pro-inflammatorische und immunstimulierende Eigenschaften.

Phase II (Inflammatorische Phase): Während der inflammatorischen Phase exprimieren die Endothelzellen aufgrund der Stimulation mit oxidiertem low density lipoprotein (oxLDL) Adhäsionsmoleküle und produzieren Chemokine. Dies ermöglicht es Monozyten und T-Lymphozyten in die Intima einzuwandern.

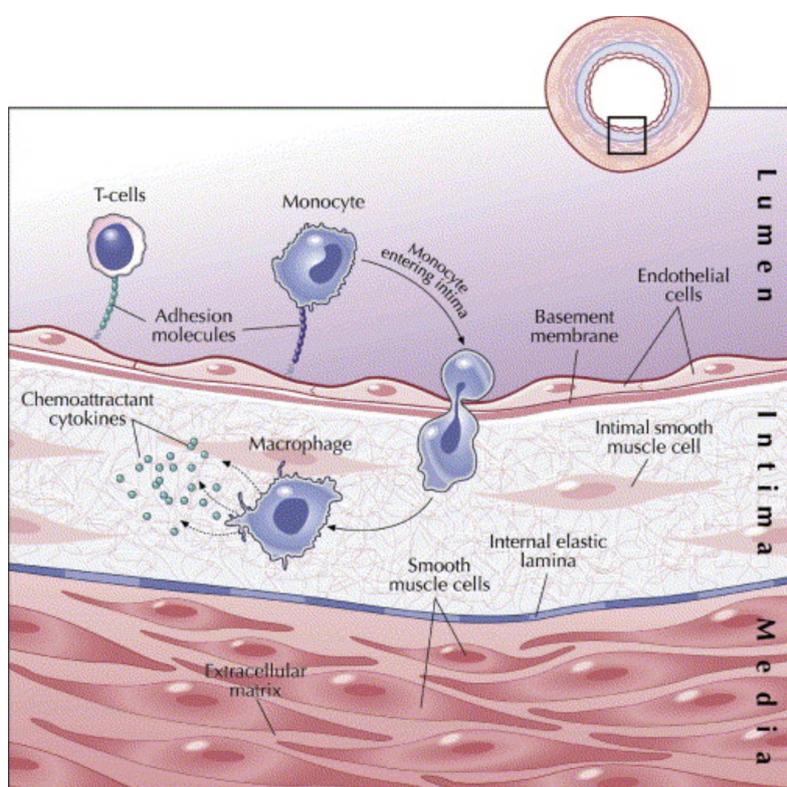


Abbildung 1: Einwanderung monozytärer Zellen in die Intima (Quelle: Libby und Ridker [18]). Die Gefäßwand einer normalen muskulären Arterie besteht aus drei Schichten. Die innerste Schicht stellt die Lamina interna dar. Auf dieser liegt eine dünne Endothelzellschicht, welche eine Barriere zu den Blutbestandteilen im Gefäßlumen bildet. In der zweiten Schicht, der Tunica media, befinden sich glatte Muskelzellen und eine Elastin-reiche Matrix. Die äußerste Schicht stellt die Lamina adventitia dar, diese ist in dieser Abbildung nicht dargestellt. Durch den Kontakt mit bekannten Risikofaktoren wie beispielsweise low density lipoprotein (LDL), durch oxidativen oder inflammatorischen Stress exprimieren die Endothelzellen Adhäsionsmoleküle und Chemokine. Diese ermöglichen es monozytären Zellen wie Monozyten und T-Zellen in die Gefäßwand einzuwandern.

Phase III (Bildung von Schaumzellen und fatty streaks): Die eingewanderten Monozyten wandeln sich zu Makrophagen um und nehmen über Scavenger-Rezeptoren oxLDL auf [21]. Die lipidbeladenen Makrophagen werden als Schaumzellen bezeichnet und bilden Fettstreifen (fatty streaks). Diese stellen eine frühe Form der atherosklerotischen Plaque dar.

Phase IV (Bildung fibröser Plaques): In dieser Phase wird die extrazelluläre Matrix verändert und eine fibröse Plaque ausgebildet. Durch die eingewanderten Lymphozyten und Makrophagen wird eine entzündliche Reaktion in der Lipidplaque geschaffen und verstärkt. Diese entzündliche Reaktion fördert die Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, welche die Proliferation und Migration glatter Muskelzellen aus der Media in die Intima bewirken. Die extrazelluläre Matrix bildet nun eine fibröse Schutzschicht über der Plaque aus, welche den Kontakt des teilweise nekrotischen Materials mit dem Blut verhindert. Wächst die extrazelluläre Matrix, wird die Plaque dicker und kann das Gefäßlumen immer weiter einengen.

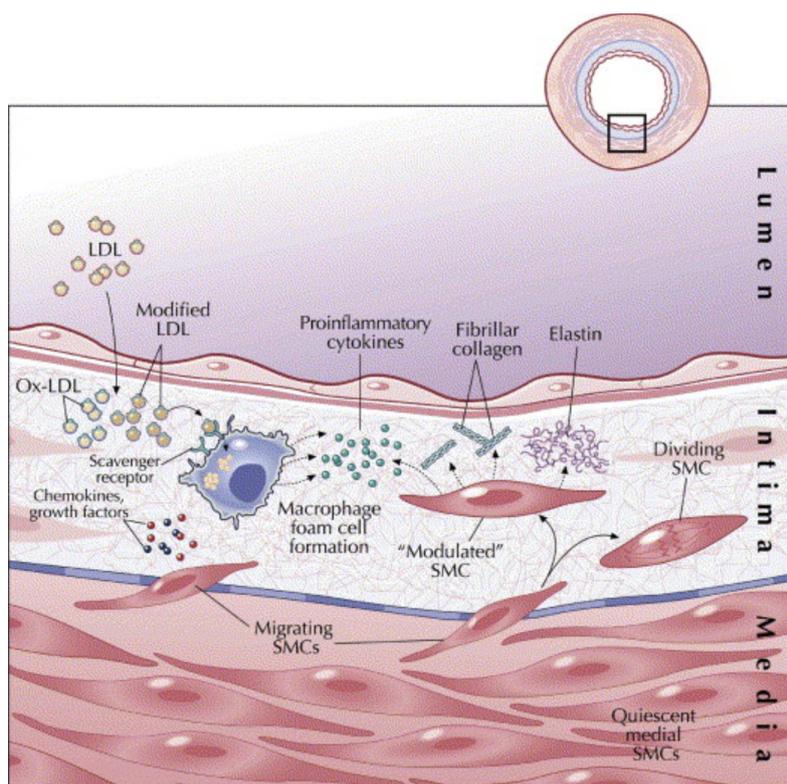


Abbildung 2: Die Bildung einer fibrös-fettigen Plaque (Quelle: Libby und Ridker [18]). Beim Übergang von den fatty streaks zu einer fibrösen Plaque wandern glatte Muskelzellen (SMCs) aus der Tunica media in die Intima ein. Dort können die glatten Muskelzellen Kollagen und Elastin sezernieren. Eine Vermehrung der Muskelzellen wird durch mitogene Stimuli gefördert. Die eingewanderten Monozyten nehmen die oxidierten Lipoproteine (oxLDL) über Scavenger-Rezeptoren auf und wandeln sich zu Schaumzellen um. Sie setzen Zytokine, proinflammatorische Mediatoren, Leukotriene und Prostaglandine sowie reaktive Sauerstoffspezies (ROS) frei.

Phase V (Entstehung einer komplexen Läsion und Thrombosierung): In dieser letzten Phase entstehen komplexe Läsionen sowie eine Thrombose. Durch proinflammatorische Zytokine und von Makrophagen ausgeschüttete Proteinase wird die atherosklerotische Matrix zunehmend instabiler und die Gefahr einer Ulzeration steigt. Vor allem der Schulterbereich der atherosklerotischen Plaque ist ulzerationsgefährdet [23]. Hierdurch wächst die Gefahr für die Entstehung einer Plaqueruptur.

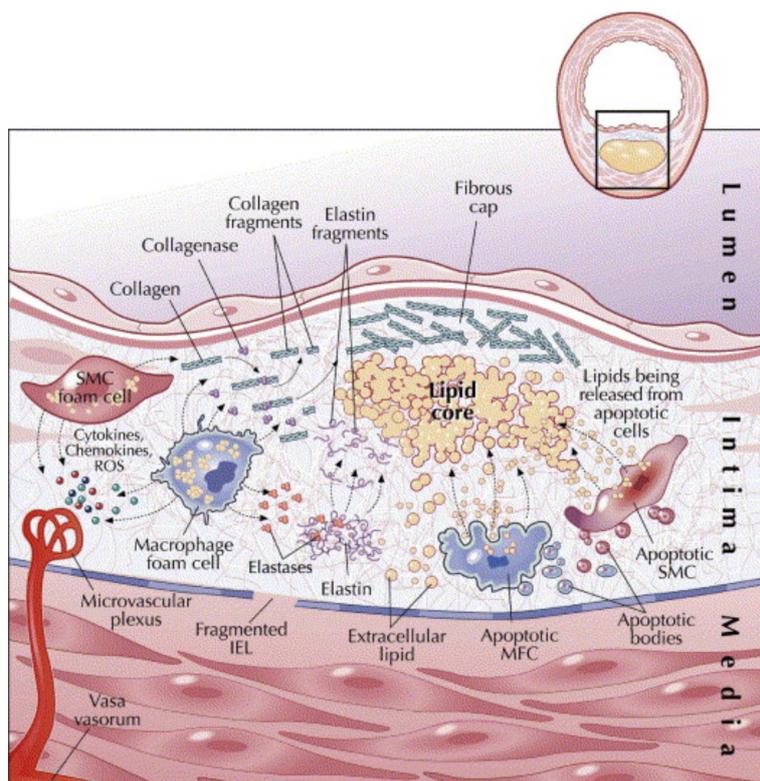


Abbildung 3: Reifung der atherosklerotischen Plaque (Quelle: Libby und Ridker [18]). Im Verlauf bilden atherosklerotische Plaques eine fibröse Kappe aus. Der darunter liegende Lipidkern enthält eine Vielzahl an Makrophagen sowie apoptotischen Zellen. Die fibröse Kappe schirmt diesen Lipidkern mit teilweise nekrotischem Material von der Blutbahn ab. Jedoch kann diese Kappe von durch Makrophagen freigesetzte Proteinase geschwächt werden. Abkürzungen: reaktive Sauerstoffspezies (ROS), glatte Muskelzelle (SMC), Lamina elastica interna (IEL), Schaumzelle (MFC)

1.2.2 Komplikationen der Atherosklerose: Die Plaqueruptur

Neben der chronischen Gefäßverengung kann es zu einer Plaqueruptur, dem Einreißen der atherosklerotischen Plaque, kommen (siehe Abbildung 4). Reißt die fibröse Schutzschicht auf, so kommen Plaquebestandteile als Fremdmaterial mit dem Blut in Berührung. Hierbei wird zum einen die Thrombozytenaggregation und zum anderen die Gerinnungskaskade in Gang gesetzt. Die Ausbildung eines Thrombus kann das Gefäßlumen vollständig ver-

gen und somit zu einer akuten Ischämie und dem klinischen Bild eines Myokardinfarktes oder eines Schlaganfalles führen. Die Plaqueruptur stellt den häufigsten Grund für einen Myokardinfarkt dar [23].

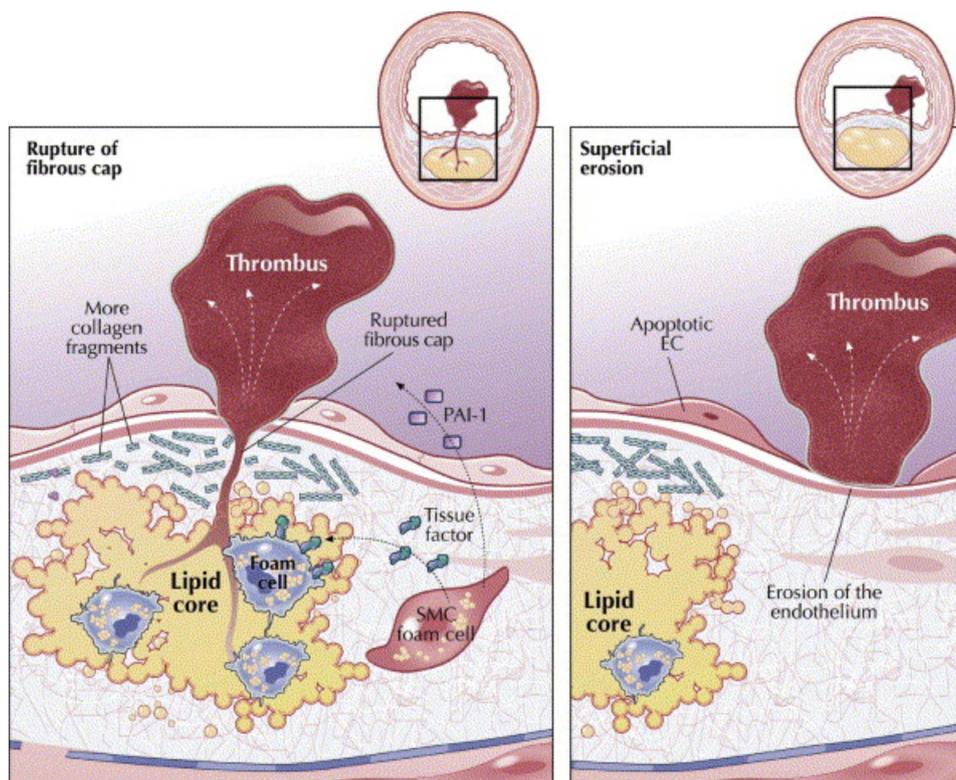


Abbildung 4: Plaqueruptur und thrombembolische Komplikationen (Quelle: Libby und Ridker [18]). Thrombembolische Komplikationen der Atherosklerose können durch zwei Hauptmechanismen entstehen. Der erste Mechanismus stellt ein Einreißen der fibrösen Kappe der Plaque dar. Hierdurch kommen die Plaqueinhalte mit Blutbestandteilen in Kontakt und lösen eine Gerinnungsreaktion aus. Beim zweiten Mechanismus wird durch eine oberflächliche Erosion der Endothelzellen der Plaquekappe (beispielsweise durch eine Desquamation oder durch eine Apoptose der Endothelzellen (EC)) eine Gerinnungsreaktion ermöglicht. Abkürzungen: glatte Muskelzelle (SMC), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)

Die Vulnerabilität der atherosklerotischen Plaque für eine Plaqueruptur ist durch die Beschaffenheit ihrer fibrösen Schutzschicht bestimmt. Begünstigend für ein Einreißen der Plaque wirken [17,24]:

- eine dünne fibröse Kappe
- ein hoher Lipidgehalt des Plaqueinhalts
- ein hoher Anteil nekrotischen Materials
- eine geringe Anzahl glatter Muskelzellen
- eine ausgeprägte Neovaskularisation
- ein hoher Gehalt an Tissue-Faktor
- eine hohe inflammatorische Aktivität

Eine immer größer werdende Evidenz deutet darauf hin, dass eine hohe inflammatorische Aktivität in diesem Verlauf eine Schlüsselfunktion einnimmt [25, 26].

1.2.3 Diabetiker als Risikogruppe für die Atherosklerose und KHK

Diabetes mellitus

Diabetes mellitus ist eine Stoffwechselkrankheit, deren Inzidenz stetig ansteigt. Während 1985 noch 30 Millionen Menschen weltweit an einem Diabetes mellitus litten, waren es im Jahr 2005 bereits 217 Millionen Menschen und die Tendenz ist weiter steigend [27]. Die International Diabetes Federation (IDF) berichtet von einer Belastung von 415 Millionen Menschen weltweit im Jahr 2015. Dies bedeutet, dass 9 % aller Erwachsenen betroffen sind. Es zeigt sich außerdem eine große Dunkelziffer, da nahezu die Hälfte aller Patienten undiagnostiziert ist [28]. Der Anstieg erfolgt nicht nur in Wohlstandsländern, sondern auch in Entwicklungsländern. Betroffen ist hiervon sowohl der Typ 1 Diabetes mellitus als auch der Diabetes mellitus Typ 2 – jedoch stellt der Typ 2 Diabetes mit ca 90 % den weitaus größeren Anteil [28].

Während der Diabetes mellitus Typ 1 in erster Linie durch eine Zerstörung der Langerhans-Zellen des Pankreas entsteht, zählt der Diabetes mellitus Typ 2 zu den klassischen Wohlstandskrankheiten. Hierbei wird lange Zeit genügend Insulin gebildet, welches jedoch aufgrund einer Insulinresistenz der Zellen nicht ausreichend wirken kann. Im Verlauf kann der Diabetes mellitus Typ 2 aufgrund der Zerstörung der insulinbildenden Zellen in einen Diabetes mellitus Typ 1 mit einem absoluten Insulinmangel übergehen.

Risikofaktor Nummer eins für die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 ist Übergewicht. Jedoch spielen ebenfalls das Alter, die Ethnie, die familiäre Belastung, das Vorliegen eines Gestationsdiabetes in der Krankengeschichte sowie eine niedrige körperliche Aktivität, Nikotingenuss und die tägliche Schlafdauer eine Rolle [29]. Die Liste der Einflussfaktoren für die Entstehung eines Diabetes wächst ständig. Darin zeigt sich immer mehr die Komplexität hinter der Entstehung eines Diabetes mellitus Typ 2.

Diabetes mellitus Typ 2 und die koronare Herzkrankheit

Die koronare Herzkrankheit zählt zu den Hauptmorbiditäts- und Mortalitätsfaktoren bei Patienten mit einem Diabetes mellitus Typ 2. So ist die Gefahr an einem kardiovaskulären Ereignis zu sterben bei Diabetikern im Vergleich zu Nichtdiabetikern deutlich erhöht.

Die Komplikationen Myokardinfarkt und Schlaganfall stellen häufige Todesursachen bei Diabetikern dar [30–32]. Als mögliche Ursachen für diesen ausgeprägten Zusammenhang der Krankheiten Diabetes mellitus und KHK sind mehrere Faktoren denkbar [33]:

- Diabetiker leiden häufig an weiteren kardiovaskulären Risikofaktoren wie Übergewicht oder arterieller Hypertonie
- Diabetiker entwickeln häufig eine Mikro- und Makroangiopathie
- Diabetiker weisen ein erhöhtes Maß an Inflammation auf
- Diabetiker weisen ein erhöhtes Maß an oxidativem Stress mit freien Sauerstoffradikalen auf

Bei der Betrachtung des ersten Punktes fällt auf, dass einige Faktoren (wie beispielsweise Übergewicht) sowohl Risikofaktoren für einen Diabetes mellitus als auch für eine koronare Herzkrankheit sind. Des Weiteren können kardiovaskuläre Risikofaktoren durch eine Hyperglykämie entstehen oder verstärkt werden. So kommt es bei Diabetikern durch eine Glomerulosklerose und durch einen veränderten Filtrationsdruck, mit darauf folgender gesteigerter Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS-System), zu einer zunehmenden Nierenschädigung. Dies bedingt oder verstärkt eine arterielle Hypertonie. Die Verbindung zwischen Übergewicht und einer koronaren Herzkrankheit wird in einer niedriggradigen Inflammationsreaktion gesehen [34]. Bei Patienten mit einer Insulinresistenz oder einem Diabetes mellitus wurde eine Überexpression von Zytokinen, wie beispielweise Tumornekrosefaktor α (TNF- α), Interleukin-1, Interleukin-6, Fibrinogen und Angiotensin, durch das Fettgewebe beobachtet [33, 35]. Die Überexprimierung dieser Zytokine kann zu einer Inflammationsreaktion und zu einer Lipidakkumulation mit einem schädigenden Einfluss auf die Gefäße und mit der Ausbildung einer endothelialen Dysfunktion führen [33, 36].

Des Weiteren ist bei Diabetikern die Konzentration von C-reaktivem Protein (CRP) erhöht. Dies kann über eine verringerte Produktion von Stickstoffmonoxid und Prostazyklinen, sowie durch eine vermehrte Aufnahme von oxLDL in die Gefäßwände, zur Ausbildung einer endothelialen Dysfunktion und zu einer Progression der Atherosklerosebildung beitragen [34]. Somit erhöhen sowohl viele Risikofaktoren für die Entstehung eines Diabetes mellitus, als auch die Diabetes-Erkrankung selbst, das Risiko für die Entstehung einer koronaren Herzkrankheit.

Im Widerspruch zu all diesen Studien steht die These, dass es keinen Zusammenhang zwischen der Atherosklerosebildung und einem Diabetes mellitus gibt. Hierbei soll die erhöhte Gefahr für kardiovaskuläre Ereignisse tatsächlich durch eine gestörte Thrombozytenfunktion und eine erhöhte Koagulabilität zustande kommen [37, 38].

1.3 Thrombozyten und thrombozytäre Marker

Im Folgenden werden Thrombozyten (Blutplättchen) näher beschrieben. Diese sind wichtige Akteure im Rahmen der Blutgerinnung und der Thrombusbildung. Des Weiteren gibt es zunehmende Hinweise auf ihre Beteiligung an der inflammatorischen Reaktion. Damit sind sie eine wichtige Komponente in der Entstehung und Progression einer Atherosklerose, sowie bei der Thrombosierung, und beeinflussen somit den Verlauf einer KHK.

1.3.1 Aufbau und Funktion von Thrombozyten

Thrombozyten sind die kleinsten zellulären Bestandteile des Blutes. Sie haben einen Durchmesser von 2 – 4 μm und eine scheibenartige Form. Sie entstehen im Knochenmark durch Abschnürung aus Megakaryozyten und spielen eine große Rolle bei der Blutgerinnung, Immunreaktion und inflammatorischen Reaktion [39].

Thrombozyten sind anukleäre Zellen. Dennoch besitzen sie messenger Ribonukleinsäure (mRNA) und sind daher in begrenztem Umfang zur Neusynthese von Proteinen fähig [40]. Thrombozyten beinhalten drei Arten an Granula: α -Granula, elektronendichte Granula und Lysosomen [39]. In den Granula sind eine Vielzahl an aggregations- und wachstumsfördernden sowie proinflammatorischen Substanzen enthalten.

1.3.2 Die Hämostase und thrombembolische Ereignisse

Im inaktiven Zustand besitzen Blutplättchen eine typische scheibenartige Form. Durch eine Aktivierung der Thrombozyten im Rahmen der Adhäsion oder durch im Blut gelöste Agonisten wie beispielsweise Adenosindiphosphat (ADP) oder Thrombin erfahren sie eine Formveränderung mit einer Ausbildung von Pseudopodien. Des Weiteren werden Oberflächenrezeptoren aktiviert und metabolische und biochemische Prozesse im Thrombozyten verändert [39]. Durch diese Aktivierung der Blutplättchen wird die Ausbildung eines vollständigen hämostatischen Pfropfes ermöglicht, wie beispielsweise bei der Ausbildung eines Thrombus nach einer Plaqueruptur.

Ablauf der Hämostase

Die Hämostase dient dem Verschluss eines Gefäßwanddefektes zum Ziel der Blutstillung. Hierbei bilden Thrombozyten und lösliche Plasmakomponenten einen hämostati-

schen Propf um den Gefäßwanddefekt zu decken und den Blutaustritt zu stoppen. Die Hämostase durchläuft hierbei drei Stadien [39]:

I) Das erste Stadium stellt der primär hämostatische Thrombus dar. Hierbei interagieren Thrombozyten mit freigelegten Strukturen der Gefäßwand, wie Kollagen, und lagern sich an der Läsion an (Adhäsion). Durch die Aktivierung der Thrombozyten setzen diese ihre Granulainhaltsstoffe frei, welche eine Interaktion mit weiteren Thrombozyten und deren Anlagerung (Aggregation) fördern. Es bildet sich ein plättchenreicher Thrombus, welcher die Gefäßwandläsion abdichtet und die Blutung stillt. Dieser primäre Thrombus ist jedoch sehr instabil und löst sich durch die Scherkräfte des Blutstroms noch leicht von der Gefäßwand ab.

II) Die sekundäre Hämostase bildet das zweite Stadium. Die aktivierten Thrombozyten haben eine große prokoagulatorische Aktivität und sind maßgeblich an der Aktivierung der Gerinnungskaskade beteiligt. Durch die Bildung und Anlagerung von Fibrin wird der Plättchenthrombus verfestigt. Dieser fibrinreiche, sekundär hämostatische Thrombus dichtet die Gefäßwandläsion stabil ab und ermöglicht den Heilungsprozess.

III) Als drittes Stadium zählt die Fibrinolyse, welche die Spaltung des Fibrins und somit den Abbau des Thrombus beinhaltet.

Die physiologische Hämostase benötigt ein empfindliches Gleichgewicht zwischen prothrombotischen und antithrombotischen Faktoren und Mechanismen. Sowohl ein Überwiegen der antithrombotischen und fibrinolytischen Faktoren und eine daraus entstehende Blutungsneigung als auch ein Überwiegen der prothrombotischen Faktoren mit einer unkontrollierten Thrombusbildung und -vergrößerung haben ernsthafte klinische Konsequenzen.

1.3.3 Die Rolle der Thrombozyten in der Atherosklerose

Neben der Thrombusbildung bei einer Plaqueruptur spielen Thrombozyten bei der Atherosklerosebildung selbst eine wichtige Rolle. So verdichten sich die Hinweise, dass die Blutplättchen an der frühen Initiierung von atherosklerotischen Plaques beteiligt sind.

Lange Zeit galt die Meinung, dass sich Plättchen im Gefäßlumen nur im Rahmen einer Verletzung, aufgrund der damit verbundenen Freisetzung von subendothelialen Strukturen wie Kollagen, anhaften können. Von Endothelzellen gebildete Substanzen wie Stickstoffmonoxid und Prostazykline wirken einer Thrombozytenaktivierung und Anhaftung an das unverletzte Endothel im Regelfall entgegen. Ein Versuch von Massberg et al. zeigte

jedoch, dass sich Thrombozyten auch an eine intakte Endothelzellschicht anlagern können [41]. Dies ist in Tierversuchen an der Apolipoprotein E-defizienten Maus (ApoE^{-/-}-Maus) beobachtbar. Bei diesen Mäusen liegt ein genetischer Defekt vor, welcher sie besonders anfällig für das Auftreten einer Atherosklerose macht [42]. Insbesondere an den klassischen Prädilektionsstellen für eine Atherosklerosebildung, wie beispielsweise der Karotisbifurkation, gibt es diese Thrombozytenanlagerungen noch bevor eine atherosklerotische Läsion vorhanden ist. Im Rahmen der Thrombozytenadhäsion kann ebenfalls eine gesteigerte Gen-Expression von inflammatorischen Markern sowie eine vermehrte Leukozyteninvasion beobachtet werden. Wird die Thrombozytenadhäsion gehemmt, zeigt sich eine verminderte Leukozytenakkumulation und eine verringerte Plaueformation [41].

Im Verlauf der Adhäsion der Thrombozyten an das Endothel der Gefäßwand werden die Thrombozyten und Endothelzellen aktiviert. Hierdurch exprimieren und sezernieren diese proinflammatorische Zytokine. Dies führt zu einem Kreislauf, in dessen Verlauf eine Entzündungsreaktion in Gang gesetzt und unterhalten wird. Dadurch werden weitere Endothelzellen und Thrombozyten aktiviert. Ebenso werden Monozyten aktiviert und rekrutiert und ihre Differenzierung zu Makrophagen und Schaumzellen unterstützt. Dieser Kreislauf führt zu einer zunehmenden Entzündungssituation und kann zu einer Progression einer Atherosklerose führen [43].

1.3.4 Thrombozytäre Adhäsionsrezeptoren

Thrombozyten interagieren auf vielfältige Weise untereinander und mit anderen Zellen und Strukturen. Das Verhalten der Thrombozyten ist dabei maßgeblich durch ihre Aktivierung bestimmt. Adhäsionsvorgänge werden z.B. durch ihre Oberflächenrezeptoren ermöglicht und reguliert. Diese Vorgänge unterscheiden sich im aktivierten und im inaktiven Zustand, da sich einige Oberflächenrezeptoren im Rahmen der Aktivierung verändern. Wie in den Kapiteln 1.2.2 und 1.3.3 beschrieben, wird ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung der Thrombozyten und der Entstehung einer Atherosklerose sowie ihrer Komplikationen vermutet.

In dieser Arbeit werden daher thrombozytäre Adhäsionsrezeptoren, welche mit der Aktivierung von Thrombozyten in Zusammenhang stehen, als Marker verwendet. Die Adhäsionsrezeptoren werden in vier Gruppen eingeteilt: Integrine, Selektine, Rezeptoren vom Immunglobulin-Typ und leuzinreiche Glykoproteine [39].

Integrine sind sehr weit verbreitet und befinden sich auf nahezu allen Zellen des Körpers. Sie ermöglichen eine Verbindung zwischen dem Zytoskelett und der extrazellulären

Matrix. Sie sind an der Gewebeentwicklung und -differenzierung sowie an der Entwicklung und Metastasierung von Tumoren beteiligt. Weitere Effekte zeigen sich in der Leukozytenadhäsion, der Migration und der Thrombozytenaggregation/-adhäsion [39]. Integrine können durch verschiedene Liganden gebunden werden und bewirken dann eine rezeptorvermittelte Zellaktivierung mit einer Konformitätsänderung des Integrinrezeptors. Ein für diese Arbeit wichtiges Beispiel eines thrombozytären Integrin-Rezeptors ist der Glykoprotein-2b3a-Rezeptor (GP2b3a-Rezeptor). Die Gruppe der Selektine besteht aus drei bisher bekannten Rezeptoren. E-Selektin wird von aktivierten Endothelzellen exprimiert und bewirkt eine Adhäsion von Granulozyten. L-Selektin wird von Leukozyten ausgebildet und vermittelt eine leukozytäre Adhäsion an Endothelzellen. P-Selektin wurde sowohl in Endothelzellen als auch in Thrombozyten gespeichert gefunden und wird bei einer Aktivierung der Zellen ausgeschüttet oder auf der Oberfläche exprimiert. Ein Beispiel für einen thrombozytären Rezeptor vom Immunglobulin-Typ stellt das Glykoprotein VI (GPVI) dar. [39]

In dieser Arbeit werden drei Adhäsionsrezeptoren als Marker verwendet. Alle drei stehen im Zusammenhang mit der Aktivierung der Thrombozyten. Es handelt sich um den GP2b3a-Rezeptor, P-Selektin und das Immunglobulin Glykoprotein VI. Sie werden in den folgenden Abschnitten näher beschrieben. Als zusätzliche Marker werden der Macrophage migration inhibitory factor (MIF) und Gremlin-1 betrachtet.

Der GP2b3a-Rezeptor und Procaspase-activating compound 1 (PAC-1)

Der GP2b3a-Rezeptor zählt zu den Integrinen und ist ein Rezeptor für Fibrinogen. Er ist das häufigste Membranglykoprotein von Thrombozyten und stellt 1-2 % des gesamten thrombozytären Proteingehaltes. Ein Thrombozyt besitzt 60 000-100 000 dieser Rezeptoren. Der Großteil davon (ca 70 %) liegen dauerhaft auf der Oberfläche vor, wohingegen 30 % erst nach einer Aktivierung des Thrombozyten exprimiert werden [39]. Der GP2b3a-Rezeptor bindet lösliches Fibrinogen und leitet dadurch den Beginn der Thrombozytenaggregation (und somit einer möglichen Thrombosierung) ein. Durch eine Aktivierung der Thrombozyten geht der GP2b3a-Rezeptor von einem niedrigaffinen in einen hochaffinen Funktionszustand über [39].

Bei einer durchflusszytometrischen Messung können unterschiedliche Antikörper zur Detektion des GP2b3a-Rezeptors genutzt werden. Ein Teil dieser Antikörper binden nur an Rezeptoren in einem bestimmten Aktivierungszustand. In dieser Arbeit wird der Antikörper Procaspase-activating compound 1 (PAC-1) genutzt. Dieser bindet lediglich an den aktivierten GP2b3a-Rezeptor und weist diesen somit nach [39].

P-Selektin (CD62p)

P-Selektin (auch CD62p genannt) zählt zur Familie der Selektine. Selektine sind an der Interaktion zwischen unterschiedlichen Zellen beteiligt. P-Selektin wurde sowohl in den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen als auch in den alpha-Granula von Thrombozyten gespeichert gefunden. Bei einer Aktivierung der Thrombozyten oder Endothelzellen erfolgt eine Freisetzung und Expression auf der Oberfläche. Hierbei fördert P-Selektin die Anlagerung von Leukozyten an Endothelläsionen und Thrombozyten und induziert inflammatorische Prozesse in Leukozyten [39].

Bei der durchflusszytometrischen Messung in dieser Arbeit wird durch einen Antikörper gegen P-Selektin, und die dadurch erfolgende Detektion von P-Selektin-Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche, die Degranulation der alpha-Granula nachgewiesen [39].

Glykoprotein VI

Das thrombozytenspezifische [44] Glykoprotein VI (GPVI) zählt zur Familie der Immunglobuline [45]. Es ist ein Kollagenrezeptor, welcher auf der Oberfläche von Thrombozyten exprimiert wird. Bei einer Gefäßverletzung oder Plaqueruptur resultiert eine Freisetzung von Kollagenstrukturen der extrazellulären Matrix. Es erfolgt eine Aktivierung von Thrombozyten und des plasmatischen Gerinnungssystems [18]. Als Vermittler der Thrombozytenaktivierung fungieren thrombozytäre Kollagenrezeptoren wie das GPVI. Dies führt zu einer Adhäsion der Thrombozyten sowie zu einer Sezernierung von proinflammatorischen und prokoagulativen Inhaltsstoffen [39,46]. Die Wichtigkeit von GPVI für die Hämostase wurde durch ein Experiment von Massberg et al. bestätigt [47]. In diesem wurde in einem in-vivo Versuch an Mäusen gezeigt, dass durch ein Fehlen oder eine Hemmung von GPVI die Adhäsion von Thrombozyten an die Gefäßwand nach einer Endothelverletzung nahezu vollständig ausbleibt. Des Weiteren zeigten GPVI-defiziente Mäuse keine Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten bei einer Denudation des Gefäßwand-Endothels [47]. Bei einer Messung der thrombozytären GPVI-Konzentration im Menschen wurden erhöhte Konzentrationen bei Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom im Gegensatz zu Patienten mit einer stabilen Angina pectoris gemessen [46]. In dieser Arbeit wird der durchflusszytometrische Nachweis von Glykoprotein 6 zur Detektion von aktivierten Thrombozyten verwendet.

1.3.5 Der Macrophage migration inhibitory factor (MIF)

Das proinflammatorische und proatherogene Zytokin MIF wurde bereits in unterschiedlichen Zellen und Geweben, darunter in Monozyten, Makrophagen und Schaumzellen sowie in Endothelzellen und glatten Muskelzellen nachgewiesen [48–52]. MIF zeigt einen Einfluss in verschiedenen chronisch oder akut inflammatorisch bedingten Krankheiten, wie beispielsweise der Sepsis, der rheumatoiden Arthritis und dem systemischen Lupus erythematoses [53–56]. Da auch die Entstehung der Atherosklerose und somit der KHK eng verbunden mit entzündlichen Reaktionen ist, stellt sich die Frage nach dem Einfluss von MIF auf den Verlauf der KHK.

MIF in der Atherosklerose

MIF zeigt einen Einfluss auf die Entstehung und Progression einer Atherosklerose. In instabilen atherosklerotischen Plaques wurden deutlich erhöhte MIF-Konzentrationen gemessen [49]. Das Ausmaß der MIF-Expression korreliert mit dem Ausmaß der lokalen zellulären Inflammation und der Neovaskularisation [57]. Außerdem zeigt die Intima-Media-Dicke der Gefäßwand einen direkten Zusammenhang zur Höhe der MIF-Konzentration – vermutlich aufgrund der Zunahme an inflammatorischen Zellen durch eine Stimulation der Inflammation und Proliferation [58]. Die Expression von MIF in Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen wird durch unterschiedliche proatherogene Stimuli, wie z.B. oxLDL, Angiotensin II (AT II), TNF- α oder Lipopolysaccharid, gesteigert [48, 49, 51, 52, 57]. Hierbei führt eine Stimulation sowohl zu einer Ausschüttung von bereits gespeichertem MIF als auch zu einer Neusynthese innerhalb der Zelle [48, 53].

Durch MIF werden mononukleäre Zellen wie Monozyten und T-Zellen rekrutiert und die Konversion von Makrophagen zu Schaumzellen gefördert [50, 59, 60]. Des Weiteren schützen Makrophagen, welche mit MIF stimuliert werden, eine Vielzahl an proinflammatorischen Zytokinen wie beispielsweise TNF- α , Interleukin-1 β , Interleukin-6 und Interleukin-8 aus [48, 61]. Diese Interaktion von MIF mit den Zellen des monozytären Systems und sein Einfluss in der Atherogenese werden in Abbildung 5 dargestellt.

Es wurde außerdem gezeigt, dass die Blockierung von MIF mit einem Rückgang und einer Stabilisierung von atherosklerotischen Plaques einhergeht. In einem Tierversuch an der ApoE^{-/-}-Maus von Bernhagen et al. wurde MIF als Agonist der Chemokinrezeptoren CXC-Motiv-Chemokinrezeptor (CXCR)2/CXCR4 geblockt. Die weiteren Liganden von CXCR2 wurden nicht geblockt. Daraufhin erfolgte eine Rückbildung von bereits existierenden atherosklerotischen Plaques. Des Weiteren wurde eine reduzierte Makrophagen-

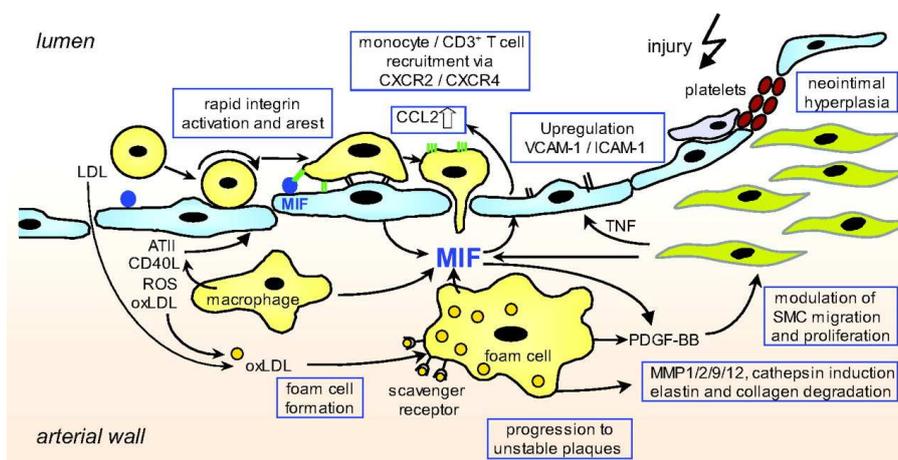


Abbildung 5: Der Einfluss des Macrophage migration inhibitory factor (MIF) in der Atherogenese (Quelle: Zerneck et al. [63]). Durch proatherogene Stimuli (z.B. oxidiertes low density lipoprotein (oxLDL), Angiotensin II (AT II), reaktive Sauerstoffspezies (ROS), CD40L) werden Makrophagen und vaskuläre Endothelzellen zur Expressierung von Macrophage migration inhibitory factor (MIF) angeregt. Das freigesetzte MIF bewirkt in den Endothelzellen eine Hochregulierung von vaskulären (VCAM) und interzellulären Adhäsionsmolekülen (ICAM) sowie von Chemokinen (CCL2). Des Weiteren aktiviert es Integrinrezeptoren wie CXCR2 und CXCR4. Diese Mechanismen fördern die Rekrutierung von mononukleären Zellen, die Konversion von Makrophagen zu Schaumzellen, die Proliferation glatter Muskelzellen (SMC) und hemmen die Apoptose verschiedener Zellen. Durch die Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und Kathepsinen bewirkt MIF einen Abbau von Kollagen und Elastin und damit eine Instabilisierung der Plaque-Matrix. Abkürzungen: low density lipoprotein (LDL), Cluster of differentiation (CD), CXC-Motiv-Chemokinrezeptor (CXCR), platelet-derived growth factor BB (PDFG-BB), CC-Chemokinligand 2 (CCL2)

und T-Zell-Dichte gemessen [62]. Dies weist auf eine stabilere Zusammensetzung der Plaque und somit auf ein geringeres Risiko für eine Plaqueruptur hin. Burger-Kentischer et al. konnten bei einer Hemmung von MIF durch einen Antikörper eine reduzierte Makrophageninfiltration in atherosklerotischen Plaques sowie eine verminderte Zytokin-konzentration von Interleukin-6 und Fibrinogen bei der ApoE^{-/-}-Maus nachweisen [60].

In Betracht der bisherigen Erkenntnisse wird vermutet, dass MIF eine entscheidende Rolle bei der Leukozytenrekrutierung, der Monozytenmigration in atherosklerotische Plaques und bei der Umwandlung von Makrophagen in Schaumzellen besitzt. Dies weist auf einen Einfluss auf die Plaqueentstehung sowie auf die Instabilisierung einer atherosklerotischen Plaque und somit auf die Erhöhung des Risikos für eine Plaqueruptur in den Koronargefäßen hin [57]. MIF wird daher als unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung eines akuten Koronarsyndroms diskutiert. So wurden erhöhte MIF-Plasmakonzentrationen bei Patienten mit koronarischämischen Komplikationen gemessen [64,65]. Die prognostische Relevanz der MIF-Plasmakonzentration auf die Entstehung kardiovaskulärer Ereignisse ist jedoch umstritten. In der Epic-Norfolk-Studie [66] konnte ein Zusammenhang zwi-

schen der MIF-Plasmakonzentration und der Prognose hergestellt werden. Dieser konnte in der MONICA/KORA-Studie [67] jedoch nicht bestätigt werden.

1.4 Gremlin-1

Gremlin-1 ist ebenfalls ein thrombozytärer Marker und stellt den Hauptmarker dieser Dissertation dar. Es wird untersucht welchen Einfluss Gremlin-1 auf den Verlauf der koronaren Herzkrankheit ausübt. Im Folgenden wird Gremlin-1 näher charakterisiert.

1.4.1 Die Entdeckung von Gremlin-1

Gremlin-1, bzw. sein Gen *down-regulated by v-mos (drm)*, wurde erstmals 1997 von Topol et al. beschrieben [68]. Ihnen fiel auf, dass die Expressierung des Gens *drm* in Zellen, welche mit Onkogenen wie Moloney Sarcoma Virus (*v-mos*) behandelt wurden, stark supprimiert war. Eine hohe *drm*-Expression wurde in Geweben wie dem Gehirn, der Milz, den Nieren und den Hoden nachgewiesen. Diese hohe *drm*-mRNA-Konzentration war vor allem in hochdifferenzierten und nichtteilenden Zellen wie Neuronen, Gliazellen, Alveolarzellen Typ 1, Becherzellen und Megakaryozyten zu finden. Eine niedrige oder keine Expression zeigten das Herz, die Leber und die Skelettmuskulatur. Topol et al. zeigten des Weiteren, dass durch eine Überexpressierung von *drm* eine Blockade der Zellproliferation sowie die Einleitung der Apoptose bei Zellschädigungen eintritt. Als Genprodukt des *drm* wurde das Glykoprotein Gremlin-1 mit einer Masse von 20,7 Kilodalton identifiziert [68].

1.4.2 Aufbau und Struktur von Gremlin-1

Das Glykoprotein Gremlin-1 ist ein Mitglied der Cerberus and Dan (CAN)-Familie, einer Untergruppe der Cystine-knot-Superfamilie. Die Cystine-knot-Superfamilie ist eine sehr weitreichende Gruppe, zu der die Bone morphogenetic proteins (BMPs) als auch BMP-Antagonisten wie Cerberus, Coco und Caronte zählen. Ebenso gehören einige Entzündungs- und Aktivierungsfaktoren, wie der Platelet Derived Growth Factor (PDGF), TNF- α oder die Transforming growth factor β (TGF- β)-Familie, der Superfamilie an.

Das Hauptmerkmal dieser Superfamilie ist eine Ringstruktur aus Cysteinen, Gremlin selbst besitzt acht Cysteine. Diese Ringstruktur wird als wesentliche Voraussetzung für die Wirkung und Funktion der Faktoren angesehen. Der Aufbau der differential screening-selected

gene aberrative in neuroblastoma (DAN)-Proteine ist hochkonserviert und in ihrer dreidimensionalen Struktur den BMPs sehr ähnlich. Gremlin-1 liegt sowohl in einer sezernierten Form als auch auf der Oberfläche von Zellen sowie im Endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat vor [69].

1.4.3 Wirkung von Gremlin-1

Gremlin-1 hat im Organismus eine Vielzahl an Funktionen und Effekten. Es ist ein endogener Antagonist der BMPs. Insbesondere BMP-2 und BMP-4, sowie in schwächerer Form BMP-7, werden von Gremlin-1 gebunden und dadurch gehemmt [69–72]. Als Mechanismus der Hemmung wird eine Heterodimer- bzw. Heteromultimerbildung, und dadurch eine Verhinderung der Bindung der BMPs an ihre Rezeptoren, vermutet [73, 74]. Zusätzlich ist auch ein intrazellulärer Mechanismus zur Hemmung von BMPs für BMP-4 bekannt. Hierbei konnte eine intrazelluläre Bindung an das BMP-Vorläuferprotein nachgewiesen werden, wodurch die Produktion und Sekretion von BMP-4 unterbunden wird [75]. Die Inhibition von BMPs spielt eine lebensnotwendige Rolle in der Embryogenese und Organentwicklung [71, 76, 77]. Des Weiteren zeigt Gremlin-1 über eine Bindung an die Slit-Proteine 1 und 2 eine Hemmung der Monozytenchemotaxis [78]. Neben der hemmenden Wirkung von Gremlin-1 auf verschiedene BMPs wurde jedoch auch ein synergistischer Effekt entdeckt. Dieser wurde bei der Angiogenese im Hühnerembryo nachgewiesen [79].

Im ausgewachsenen Organismus wirkt Gremlin-1 an der Zellproliferation und Stammzellendifferenzierung sowie an der Gefäßentwicklung mit. Hierbei zeigt sich Gremlin-1 als proangiogener Faktor, welcher über eine Bindung und Aktivierung des vascular endothelial growth factor 2 (VEGFR-2) die Angiogenese fördert [80]. Als weiteren proangiogenen Mechanismus bewirkt Gremlin-1 eine Steigerung der Angiopoetin-1-Produktion [81].

Zusätzlich ist Gremlin-1 auch an der Entstehung chronisch-fibrotischer Krankheiten beteiligt. So wurden erhöhte Gremlin-1-Konzentrationen bei der Entwicklung der Leberfibrose, der diabetischen Nephropathie und der diabetischen Retinopathie gefunden [73, 82, 83]. Im kardialen Remodellingprozess wird eine Beteiligung von Gremlin-1 bei einer nicht-ischämischen Kardiomyopathie vermutet [84]. Der genaue Einfluss von Gremlin-1 in der Entwicklung einer idiopathischen Lungenfibrose ist hingegen umstritten [85, 86].

Gremlin-1 steht des Weiteren in Zusammenhang mit der Tumorgenese. Es werden sowohl protektive als auch tumorfördernde Effekte von Gremlin-1 beschrieben. Gremlin-1 ist beispielsweise an der Apoptose von Zellen beteiligt und wird durch Onkogene wie *v-mos* supprimiert [68]. Auf der anderen Seite wurde in einer Vielzahl an verschiedenen Tumor-

geweben, wie dem Adenocarcinom der Lunge [87], dem Basalzellkarzinom der Haut, in Ösophagus- und Pankreaskarzinomen [88], als auch in Ovarial-, Brust- und Nierentumoren [89], eine erhöhte Gremlin-1 Expression beobachtet. Als Mechanismus wird die proangiogene Wirkung von Gremlin-1 [79] mit einer Förderung der Neovaskularisation sowie eine Beeinflussung des Mikromilieu des Tumorgewebes [88] vermutet. Die Zusammenschau dieser Studien lässt vermuten, dass Gremlin-1 eine gewebespezifische Rolle und Funktion besitzt.

1.4.4 Gremlin-1 als Gegenspieler von MIF

In einer Studie von Müller et al. wurde erstmals eine direkte Interaktion von Gremlin-1 mit dem Zytokin MIF nachgewiesen (siehe Abbildung 6) [90]. Gremlin-1 bindet mit einer hohen Affinität an MIF, inhibiert dieses und unterdrückt dadurch dessen proinflammatorische Effekte. In-vitro wird dabei die durch MIF induzierte Sekretion von Inflammationszytokinen wie TNF- α aus Makrophagen unterbunden. MIF besitzt durch seine Unterstützung der Monozyten- und Makrophagenaktivierung eine Rolle in der Inflammation und der Entstehung einer Atherosklerose und ist in atherosklerotischem Gewebe vermehrt vorhanden. Daher wurde von Müller et al. ebenfalls der Effekt von Gremlin-1 auf die Monozyten- und Makrophagenfunktion, sowie auf deren Vorkommen in atherosklerotischen Plaques, in-vivo untersucht. Hierzu wurde ein rekombinantes Gremlin-1-Fusionsprotein entwickelt und ApoE^{-/-}-Mäusen verabreicht. Dabei zeigte sich eine deutlich verringerte Ausdehnung von atherosklerotischen Plaques gegenüber der Kontrollgruppe. Es zeigte sich ebenfalls eine Reduktion der TNF- α - und MIF-Expression sowie eine verminderte Monozyten- und Makrophagenanzahl in den atherosklerotischen Plaques [90]. Diese verminderte Zellulartät in atherosklerotischen Plaques gilt als ein Zeichen für eine geringere Vulnerabilität im Gegensatz zu Plaques mit einer hohen inflammatorischen Aktivität. Eine hohe Konzentration von Gremlin-1 könnte daher nicht nur eine Verringerung der Plaquebildung und des Plaquewachstums, sondern auch eine höhere Stabilität der vorhandenen Plaques, bewirken. Dies wäre für den Verlauf einer koronaren Herzkrankheit günstig und könnte das Risiko für Komplikationen verringern.

Bei einer Untersuchung an Patienten zeigte sich, dass weniger die absoluten Konzentrationen von Gremlin-1 und MIF im Blutplasma, als vielmehr das Verhältnis beider Marker zueinander, mit dem Schweregrad der koronaren Herzkrankheit korreliert [91]. Hierbei zeigten Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom ein deutlich geringeres Gremlin-1/MIF-Verhältnis als Patienten mit einer stabilen Angina pectoris. Beide Gruppen hatten ein deutlich niedrigeres Gremlin-1/MIF-Verhältnis als gesunde Vergleichsprobanden. Bei einer

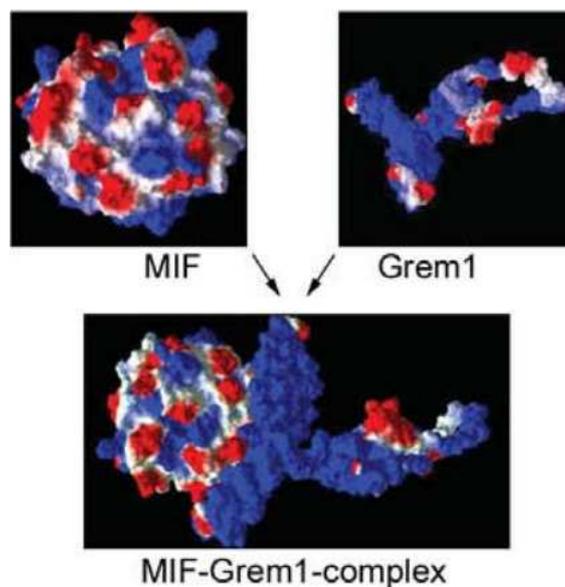


Abbildung 6: Modell der molekularen Interaktion von Gremlin-1 und MIF (Quelle: Müller et al. [90]). Diese Abbildung stellt ein Modell der Proteinstrukturen von MIF und Gremlin-1 sowie ihre mutmaßliche Interaktion dar. Es wurde eine Bindungsaffinität mit einer Dissoziationskonstante von 65 nM zugrunde gelegt, negative Oberflächenladungen werden in rot, positive Ladungen in blau dargestellt. Abkürzungen: Macrophage migration inhibitory factor (MIF), Gremlin-1 (Grem-1)

weiteren Untergliederung des akuten Koronarsyndroms in die Gruppen instabile Angina pectoris, Nicht-ST-Streckenhebungs-Myokardinfarkt (NSTEMI) und ST-Streckenhebungs-Myokardinfarkt (STEMI) blieb der Zusammenhang zwischen zunehmender Akuität der KHK und einem abfallenden Gremlin-1/MIF-Verhältnis bestehen. Des Weiteren konnte in dieser Studie ein Zusammenhang zwischen dem Gremlin-1/MIF-Verhältnis und der angiographisch nachgewiesenen, intrakoronaren Thrombuslast gezogen werden. Hierbei war die Thrombuslast umgekehrt proportional zum Gremlin-1/MIF-Verhältnis. Bei Patienten mit niedrigem Gremlin-1/MIF-Verhältnis lag die Thrombuslast deutlich höher als bei Patienten mit einem hohen Verhältnis von Gremlin-1 zu MIF [91].

1.4.5 Die Rolle von Gremlin-1 in der Atherosklerose und in der KHK

Im Rahmen der bisherigen Erkenntnisse über Gremlin-1 stellt sich die Frage nach dem Einfluss von Gremlin-1 auf die Entstehung und Progression einer Atherosklerose, sowie auf den Verlauf einer KHK. Hierbei sind sowohl die Effekte von Gremlin-1 selbst, als auch Effekte welche über die Inhibition anderer Inflammationsmarker (wie z.B. MIF) zustande kommen, interessant. Einige dieser Effekte werden in Abbildung 7 dargestellt.

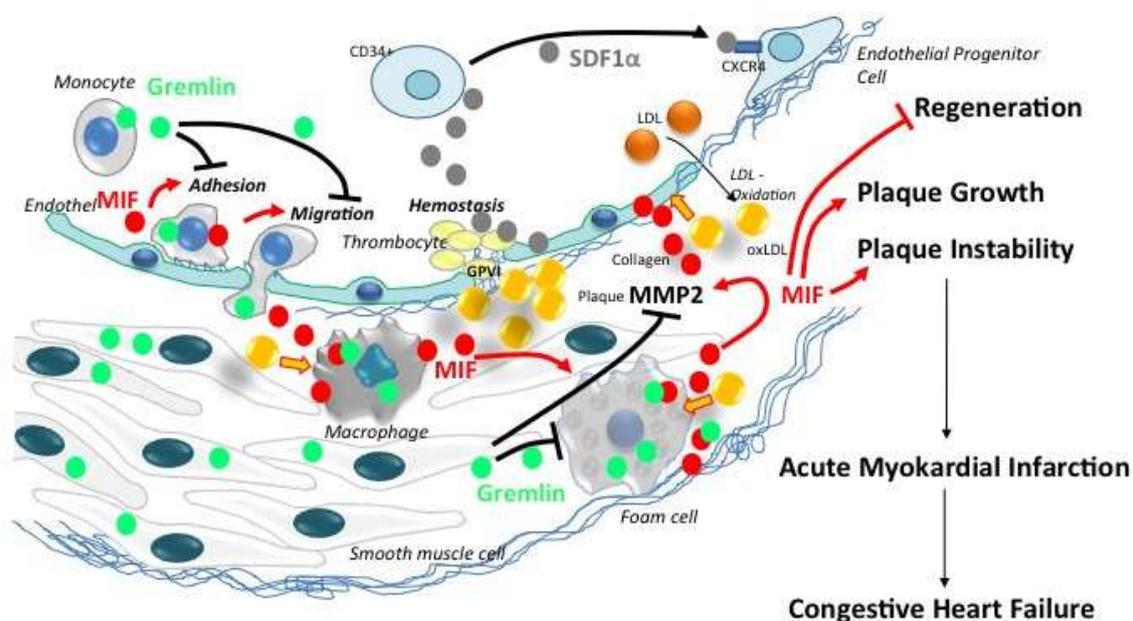


Abbildung 7: Der Einfluss von Gremlin-1 in der inflammatorischen Reaktion und seine Interaktion mit MIF (Abbildung nach Mueller et al [74, 90]). Der Inflammationsmarker Macrophage migration inhibitory factor (MIF) wird von Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Zellen des monozytären Systems sezerniert. MIF wirkt auf die monozytären Zellen und bewirkt eine Adhäsion, Migration und Aktivierung derselbigen. Des Weiteren fördert es die Aktivität von Matrixmetalloproteinasen (MMPs). Durch diese Effekte fördert MIF das Wachstum und die Instabilisierung atherosklerotischer Plaques. Kommt es zu einer Plaqueruptur, so erfolgt eine Aktivierung des Gerinnungssystems mit Ausbildung eines Thrombus. Dieser Thrombus kann das Gefäßlumen verschließen und somit einen akuten Myokardinfarkt auslösen. MIF regt die Kardiomyozyten im ischämischen Gewebe vermehrt zur Apoptose an und erhöht somit den Gewebeschaden. Gremlin-1 stellt einen Gegenspieler von MIF dar. Es wird ebenfalls von monozytären Zellen und glatten Muskelzellen sezerniert und bindet direkt an MIF. Dadurch hemmt es sowohl dessen Freisetzung als auch dessen direkte Wirkung und wirkt somit der inflammatorischen Wirkung von MIF entgegen. Abkürzungen: low density lipoprotein (LDL), oxidiertes low density lipoprotein (oxLDL), CXC-Motiv-Chemokinrezeptor (CXCR), Stromal-cell-derived factor 1 (SDF1), Cluster of Differentiation 34+ (CD34+), Glykoprotein VI (GPVI)

Ein wesentlicher Aspekt im Verlauf der Atherosklerose ist die Einwanderung von Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems in die Gefäßintima und deren Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen. Hierdurch wird die Plaquestabilität vermindert und das Risiko für eine Plaqueruptur steigt. In [90] konnte gezeigt werden, dass Gremlin-1 in atherosklerotischen Läsionen bei der ApoE^{-/-}-Maus überexprimiert wird. Dabei ist vor al-

lem die Konzentration in Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems erhöht. Bei einer Stimulierung von Monozyten mit TNF-alpha oder oxLDL steigt die Ausschüttung von Gremlin-1 auf das bis zu 6-fache an, wohingegen die intrazelluläre Konzentration von Gremlin-1 nicht erhöht wird [90]. Zuvor waren inflammatorische Zellen wie Monozyten, Makrophagen und Schaumzellen nicht als Quelle für Gremlin-1 bekannt.

Durch Verabreichen von rekombinantem Gremlin-1 konnte bei einem in-vivo-Versuch an der ApoE^{-/-}-Maus eine Rückbildung von atherosklerotischen Plaques sowie eine verminderte Zellularität innerhalb der Plaques beobachtet werden. Die Größe der in der Plaque vorhandenen CD68-positiven Zellen (Monozyten und Makrophagen) war dabei verringert und die Konzentration von inflammatorischen Zytokinen wie TNF-alpha und MIF reduziert [90].

Wie bereits beschrieben, induziert und unterstützt MIF die Differenzierung von Monozyten in Makrophagen und Schaumzellen [50, 59, 60] und ist somit aktiv am Entzündungsgeschehen beteiligt. Durch die Bindung an MIF und eine dadurch bedingte Hemmung des bereits sezernierten MIF sowie durch die Hemmung eines weiteren MIF-Ausstoßes könnte Gremlin-1 den inflammatorischen Kreislauf unterbrechen. Da die Inflammation zu einer Progression der Atherosklerose und zu einer zunehmenden Instabilisierung der atherosklerotischen Plaques führt, könnte dies vor einem Fortschreiten der Atherosklerose und dem Vorkommen einer Plaqueruptur schützen.

Es wurde außerdem beobachtet, dass in Anwesenheit von Gremlin-1 die Differenzierung von Monozyten in Makrophagen und Schaumzellen in vitro um 50-70 % verringert ist [90]. Dabei ist sowohl die Aufnahme als auch die Ausscheidung von Cholesterin durch Makrophagen in Anwesenheit von Gremlin-1 reduziert. Ebenso die von Monozyten durch MIF induzierte Sekretion von TNF-alpha [90]. Ein weiterer Effekt von Gremlin-1 auf die Hemmung der Monozytenmigration wurde durch eine Interaktion von Gremlin-1 mit den Proteinen Slit-1 und -2 beschrieben [78].

Eine weitere Beobachtung ist, dass Endothelzellen, welche erhöhten Scherkräften durch einen gestörten Blutfluss ausgesetzt sind, sowohl vermehrt BMPs als auch deren Antagonisten wie Gremlin-1 ausschütten [92].

Die Zusammenschau aller bisherigen Erkenntnisse und beschriebenen Effekte von Gremlin-1 stärkt die These, dass Gremlin-1 als Schutzfaktor der Progression einer Atherosklerose und der Instabilisierung von atherosklerotischen Plaques entgegensteht.

1.4.6 Gremlin-1 bei Diabetes mellitus

Diabetiker besitzen ein hohes Risiko für die Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit. Bisher ist über den Einfluss von Gremlin-1 auf die Entwicklung und Progression der Atherosklerose speziell bei Diabetikern nur wenig bekannt. Es wurde jedoch gezeigt, dass die Expression von Gremlin-1-mRNA durch hohe Glukoselevel stimuliert wird [93, 94]. Außerdem ist Gremlin-1 durch seine fibrotisierenden Eigenschaften an den schwerwiegenden Folgeerkrankungen einer Hyperglykämie, wie beispielsweise einer diabetischen Nephropathie oder einer diabetischen Retinopathie, beteiligt.

Mehr Informationen gibt es hingegen über den Einfluss des Zytokins MIF bei Diabetes mellitus. So gibt es Hinweise, dass MIF in einem direkten Zusammenhang mit dem Glukose-Stoffwechsel steht. In [95] wurde nachgewiesen, dass MIF mit steigender Glukosekonzentration stärker in speziellen β -Zellen des Pankreas exprimiert wird und die Ausschüttung von Insulin moderiert [96]. Makino et al. demonstrierten, dass Patienten mit erhöhten MIF-Plasmaleveln und einer stabilen KHK in Verbindung mit einer verminderten Glukosetoleranz oder Diabetes mellitus Typ 2 im Verlauf häufiger kardiovaskuläre Ereignisse aufwiesen [97].

Da Gremlin-1 als direkter Gegenspieler von MIF identifiziert wurde [90], stellt sich die Frage nach dem Einfluss von Gremlin-1 und dem Verhältnis von Gremlin-1 zu MIF bei Diabetikern, insbesondere in Verbindung mit der Fragestellung nach der Entwicklung und Progression einer KHK.

1.4.7 Prognostische Bedeutung von Gremlin-1

Es gibt bereits einige Hinweise auf die Funktion von Gremlin-1 und seine Wirkung in der Entstehung und Progression der Atherosklerose. Bisher wurden jedoch noch keine Studien veröffentlicht, welche die Wirkung von Gremlin-1 als prognostischen Marker für zukünftige Ereignisse betrachten.

Für den bereits gut untersuchten Marker MIF liegen widersprüchliche Studien zur prognostischen Relevanz vor. Während in der Epic-Norfolk-Studie [66] eine Verbindung zwischen der plasmatischen MIF-Konzentration und der Gefahr für zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse gefunden wurde, ließ sich dieser Effekt in der MONICA/KORA-Studie [67] nicht bestätigen.

1.5 Fragestellung dieser Arbeit

Gremlin-1 ist ein Glykoprotein aus der Cystine-knot-Superfamilie, welchem bereits vielfältige Funktionen nachgewiesen wurden. So sind unter anderem Effekte im Bereich der Embryogenese und Organentwicklung [71, 76, 77], der Tumorgenese [68, 88], der Inflammation [78, 90] und der Angiogenese [80, 81] beschrieben. Hierbei wurden auch gegenläufige Einflüsse, beispielsweise im Bereich der Inflammation oder im Bereich der Tumorgenese, gefunden. Es gibt bereits Untersuchungen über die Wirkung des im Blutplasma vorhandenen Gremlin-1. Diese zeigen Hinweise auf eine schützende Eigenschaft von Gremlin-1 im Verlauf einer koronaren Herzkrankheit [90, 91].

Thrombozyten weisen Gremlin-1 sowohl intrazellulär als auch auf der Membran exprimiert auf. Des Weiteren sind sie durch ihre Fähigkeit zur Sezernierung eine direkte Quelle für das plasmatisch auftretende Gremlin-1 [98] und somit aller Wahrscheinlichkeit nach an den Effekten des frei zirkulierenden Gremlin-1 aktiv beteiligt. Dennoch wurde der Thrombozyt als Quelle für Gremlin-1 bisher kaum beachtet und es ist nur wenig über die klinische Bedeutung des thrombozytären Gremlins bekannt.

Die Risikofaktoren für die Entwicklung einer Atherosklerose sind bereits seit Jahren bekannt. Hingegen sind die Risikofaktoren für den Übergang einer stabilen atherosklerotischen Plaque in eine instabile Plaque mit dem Risiko einer Plaqueruptur noch immer Gegenstand einer aktiven Forschung. Hierbei wird ein immer größerer Anteil der Entwicklung in der Inflammation gesehen. Bei der Fragestellung über die Entstehung und Beeinflussung inflammatorischer Zustände gerät die Rolle der Thrombozyten immer weiter in den Fokus der Forschungsgemeinschaft.

In dieser Arbeit wird erstmalig der Effekt von thrombozytären Gremlin-1 bei Patienten mit einer koronaren Herzkrankheit untersucht. Es wird ein Vergleich zu etablierten Markern gezogen. Als Vergleichsmarker wurden die Adhäsionsrezeptoren Glykoprotein VI, P-Selektin (CD62p) und der GP2b3a-Rezeptor (gemessen über den Antikörper PAC-1) ausgewählt. Diese beschreiben den Aktivierungszustand der Thrombozyten. Des Weiteren wird das Zytokin MIF, welches von Gremlin-1 gebunden und gehemmt wird [90], sowie das Zusammenspiel beider Marker betrachtet.

Es wird untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen den genannten Markern und der klinischen Krankheitsausprägung besteht. Hierbei werden die Konzentrationen der Marker bei einer stabilen Form der KHK (stabile Angina pectoris) mit dem Vorliegen bei einer akuten Ausprägung im Rahmen eines akuten Koronarsyndroms (instabile Angina pecto-

ris, NSTEMI oder STEMI) verglichen. Dabei wird die Hypothese überprüft, dass sich die thrombozytäre Konzentration von Gremlin-1 bei einer stabilen Ausprägung von der Konzentration bei einem akuten Koronarsyndrom unterscheidet. Es wird ebenfalls untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen den demographischen Daten, den kardiovaskulären Risikofaktoren, den Vor- und Begleiterkrankungen oder der Vormedikation der Patienten und der thrombozytären Gremlin-1-Konzentration besteht.

Ein großes Augenmerk liegt des Weiteren auf der prognostischen Bedeutung der Gremlin-1-Konzentration. Hierbei wird untersucht, ob sich anhand der initialen thrombozytären Konzentration (zum Zeitpunkt der Studienaufnahme) Hinweise auf zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse erschließen lassen. Die Hypothese ist, dass ein Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von kardiovaskulären Ereignissen und der initialen Gremlin-1-Konzentration besteht. Hierbei wird vermutet, dass eine hohe Gremlin-1-Konzentration eine schützende Funktion aufweist.

Als eine spezielle Untergruppe werden Patienten mit einem Diabetes mellitus Typ 2 näher betrachtet. Es ist bekannt, dass Patienten mit einem Diabetes mellitus nicht nur häufig eine leicht erhöhte inflammatorische Stoffwechsellage aufweisen, sondern auch ein besonders gefährdetes Kollektiv für kardiovaskuläre Komplikationen darstellen [30–32]. Des Weiteren sind die Zytokine Gremlin-1 und MIF direkt mit einer hyperglykämischen Stoffwechsellage verbunden. Beide Marker werden bei Diabetikern verstärkt exprimiert [93–95]. MIF ist beteiligt an der Insulinausschüttung und moderiert diese. Gremlin-1 ist ein Faktor, welcher an der Entwicklung der häufig fatalen Folgeerkrankungen und Komplikationen eines Diabetes mellitus beteiligt ist. Diese Erkenntnisse weisen Patienten mit einem Diabetes mellitus als besonders geeignete Gruppe für eine weitere Untersuchung der Gremlin-1- und MIF-Funktionen im Rahmen der koronaren Herzkrankheit aus. Hierzu werden vergleichend auch die plasmatischen Gremlin-1- und MIF-Konzentrationen betrachtet.

Kapitel 2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Blutentnahme und -aufbereitung

Tabelle 1: Geräte und Materialien zur Blutentnahme und -aufbereitung

Bezeichnung	Hersteller
Safety-Multifly-Set	Sarstedt Aktiengesellschaft & Co, Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette 8,5 ml CPDA	
S-Monovette 9 ml EDTA	
Pipettenspitzen 200 µl	
Universal 32R V3.01 Zentrifuge	Hettich AG, Bäch, Schweiz
eppendorf Reference 100-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
eppendorf Research 100-1000 µl	
eppendorf Research 10-100 µl	
eppendorf 20 µl	
eppendorf Research 0,5-10 µl	
Safe-Lock Tubes 1,5 ml	
Safe-Lock Tubes 0,5 ml	
Pipettenspitzen Blau 100-1000 µl	ratiolab GmBH, Dreieich, Deutschland
Spitzen 10 µl farblos	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Round-Bottom Tube 5 ml Polystyrene	BD Falcon TM , Franklin Lakes, USA

2.1.2 Färbung und Durchflusszytometrie

Tabelle 2: Reagenzien und Antikörper zur Färbung

Reagenzien zur Färbung		
Bezeichnung	Hersteller	
Dulbecco's PBS 500 ml	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich	
TritonX	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	
Paraformaldehyd	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland	
Sodium Hydroxide (NaOH) 10 mol/l	AppliChem, Darmstadt, Deutschland	
Salzsäure Maßlösung 6 M	AppliChem, Darmstadt, Deutschland	
Antikörper zur Färbung		
Antikörper	Bezeichnung	Hersteller
Gremlin-1	Gremlin-1 (N-20) sc-18274	santa cruz biotechnology, inc., Santa Cruz, Kalifornien
CD62p	IOTest®CD62p- FITC	Beckman Coulter, Inc., Krefeld, Deutschland
PAC-1	PAC-1	Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, Kalifornien
MIF	MIF antibody conju- gated to FITC	biorbyt Limited, Cambridge, England
CD42b-PE	BD Pharmingen™ PE-Mouse Anti- Human CD42b	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Glykoprotein 6	HGP4C9-FITC	zur Verfügung gestellt von der Technischen Universität (TU) München, Deutschland

Herstellung der verwendeten Reagenzien:

Triton X: Triton X wird mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) zu einer 0,1 % Lösung verdünnt.

Paraformaldehyd (PFA) 0,5 %: 5g PFA werden in 400 ml PBS gelöst. Nach Zugabe von 40 ml NaOH wird die Mischung bei 65°C unter ständigem Rühren aufgelöst bis sie klar ist. Nach dem Abkühlen wird mit Salzsäure 1mol/l auf einen pH von 7,4 titriert. Sie wird durch einen 0,2µ-Filter sterilfiltriert. Es folgt die Aliquotierung und Lagerung bei -20°C. Vor der Nutzung für die Färbung wird die Lösung mit PBS im Verhältnis 1:1 verdünnt.

Tabelle 3: Geräte, Materialien und Reagenzien zur Durchflusszytometrie

Bezeichnung	Hersteller
BD FACS Calibur TM Flow Cytometer	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Messsoftware: Cell Quest Pro	
FACS Rinse	
FACS Clean	
destilliertes Wasser	TKA Wasseraufbereitungssystem, TKA-Gen Pure, Berlin, Deutschland

2.1.3 Plasmatische Messungen mittels ELISA

Tabelle 4: Geräte und Materialien für die ELISA-Messungen

Bezeichnung	Hersteller
Bio-Rad Modell 550 Microplate reader	BioRad, Hercules, Kalifornien
Messsoftware: BioRad Elisa Reader Version 4.0 (Microplate Manager®4.0)	
RayBio®Human MIF Elisa Kit	RayBiotech, Norcross, USA
Human Gremlin-1 Elisa	USCN life Science Inc, Houston, USA

2.1.4 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm SPSS Version 23 für Windows in der Studentenversion der Firma IBM (International Business Machines Corporation, Armonk, USA) verwendet.

2.2 Auswahl des Patientenkollektivs

Das Patientenkollektiv dieser prospektiven Studie setzt sich aus 235 Patienten zusammen. Diese erhielten zwischen Juni 2011 und März 2013 in der Medizinischen Klinik des Universitätsklinikum Tübingen eine perkutane Koronarintervention (PCI). Als Aufnahmegrund lag eine stabile Angina pectoris, eine instabile Angina pectoris oder ein Myokardinfarkt vor. Dieses Patientenkollektiv ist eine Teilmenge der im Rahmen der Tuebingen Platelet Investigative Consortium (TuePIC)-Studie rekrutierten Patienten und enthält die

Patienten, bei welchen die Konzentration des thrombozytären Gremlin-1 bestimmt wurde. Einschlusskriterien sind ein Alter ≥ 18 Jahre, eine Aufklärung über die TuePIC-Studie und eine schriftliche Einverständniserklärung. Ausschlusskriterium für diese Arbeit ist eine nicht-ischämische Kardiomyopathie. Das Studienkonzept der TuePIC-Studie ist durch die Ethikkommission der Universität genehmigt, die Nummer ist 270/2011B01.

Als spezielle Risikogruppe für das Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen wurden Patienten mit einem Diabetes mellitus näher betrachtet. Für diese Subgruppenanalyse konnte zum Vergleich eine zusätzliche Kohorte mit Bestimmung der plasmatischen Konzentrationen von MIF und Gremlin-1 gewonnen werden. Diese Kohorte wurde ebenfalls aus der TuePIC-Studie rekrutiert und umfasst 286 Patienten. Einschlusskriterien waren auch hier ein Alter ≥ 18 Jahre sowie eine schriftliche Einverständniserklärung.

2.3 Methoden

Im Folgenden werden die verwendeten Methoden und Messtechniken näher erläutert. Bei allen Patienten wurden Blutuntersuchungen zur Bestimmung der Konzentrationen der untersuchten Marker durchgeführt. In Kapitel 2.3.1 wird die Gewinnung und weitere Verarbeitung der Blutproben beschrieben. Zur Bestimmung der Konzentrationen auf und in den Thrombozyten (siehe Kapitel 2.3.2) wurde eine durchflusszytometrische Messung durchgeführt. Hierzu werden die Blutproben mit fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern gefärbt. Mit dieser Methode wurden die Marker Gremlin-1, MIF, GPVI, PAC-1 und P-Selektin (CD62p) bestimmt. Zur Bestimmung der Blutplasma-Konzentrationen von Gremlin-1 und MIF wurde die Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)-Technologie verwendet (Kapitel 2.3.3). Kapitel 2.3.4 beschreibt die Erstellung der Patientendatenbank.

2.3.1 Gewinnung und Aufbereitung der Blutproben

Die Blutentnahme erfolgt im Herzkatheterlabor zu Beginn der Koronarangiographie über die arterielle Schleuse mithilfe einer Spritze. Das entnommene Blut wird unverzüglich in Monovetten mit antikoagulativem Zusatz umgefüllt. Als Antikoagulanzen werden verwendet:

- Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin (CPDA) für die Durchflusszytometrie
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) für die ELISA-Messung

2.3.2 Messung der thrombozytären Konzentrationen mittels Durchflusszytometrie

Funktionsweise der Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie werden suspendierte Einzelzellen an einem fokussierten Lichtstrahl (Laser) vorbeigeführt und analysiert. Aufgrund von Größe, Form und Struktur der Zellen werden diese durch die unterschiedliche Lichtstreuung differenziert. Die Streuung des Lichts wird in Vorwärtstreulicht (FSC) und Seitwärtstreulicht (SSC) unterteilt. Das FSC beschreibt das Maß der Lichtbeugung im flachen Winkel und korreliert mit dem Volumen der Zelle. Das SSC beschreibt die Beugung des Lichts im rechten Winkel und wird von der Granularität der Zelle, Größe und Struktur des Zellkerns und der Vesikeldichte beeinflusst. Durch FSC und SSC lassen sich Blutbestandteile bereits gut unterscheiden.

Zusätzlich gibt es die Möglichkeit über fluoreszenzfarbstoffgekoppelte Antikörper spezifische Strukturen der Zellen, wie z.B. Rezeptoren, zu markieren und zu detektieren. Bei unseren Messungen werden zwei Fluorochrome als Marker genutzt. Fluoresceinisothiocyanat (FITC) zeigt eine Absorption bei einer Wellenlänge von 488 nm und eine grüne Emmission bei 530 nm. Phycoerythrin (PE) besitzt eine Absorption bei 492 nm und eine rote Emmission bei 580 nm. Der PE-markierte Antikörper wird zur Detektion des thrombozytenspezifischen Markers Cluster of Differentiation 42b (CD42b) verwendet. Dadurch können Thrombozyten aus allen gemessenen Zellen identifiziert werden. FITC-markierte Antikörper werden zur Detektion der von uns untersuchten Marker, wie beispielsweise Gremlin-1 und MIF, eingesetzt. Das von uns genutzte BD FACS Calibur™ Flow Cytometer besitzt einen 480 nm Argon-Laser und vier Kanäle zur Detektion. Es können somit bis zu vier Fluoreszenzfarbstoffe simultan gemessen werden. Durch die hohe Analyserate des Durchflusszytometers (bis zu 4000 Zellen/Sekunde) kann innerhalb einer kurzen Messzeit eine repräsentative Information über die Zusammensetzung der Blutprobe gewonnen werden. [39]

Färbeprotokoll

Das Färbeprotokoll wird nach der Zweifarben-Vollblutmethode [99] durchgeführt. Es wird Vollblut mit Zusatz von CPDA als Antikoagulanzen verwendet. Das Vollblut wird zunächst im Verhältnis von 1:50 mit PBS verdünnt:

980 µl PBS + 20 µl CPDA-Blut

Anschließend erfolgt eine Markierung der zu messenden Struktur mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper. Das Färbeprotokoll ist in Tabelle 5 dargestellt. Für unsere Untersuchungen wird bei allen Messungen eine Färbung mit einem PE-gekoppelten Antikörper gegen das Oberflächenantigen CD42b durchgeführt. Hierdurch können Thrombozyten aus den gemessenen Zellen identifiziert werden. Die zu bestimmenden Marker (Gremlin-1, MIF, GPVI, CD62p und PAC-1) werden mit jeweils spezifischen, mit FITC-gekoppelten Antikörpern, gebunden und dadurch markiert. Nach der Färbung werden die Proben lichtgeschützt im Kühlschrank bei 4°C bis zur Messung aufbewahrt.

Tabelle 5: Färbeprotokoll

Röhrchen	Probe	Zugabe		Zugabe		Zugabe
Gremlin-1	40 µl	2,5 µl PFA (10%)	Inkubation ¹	5 µl Triton X	Inkubation ¹	300 µl PFA 0,5 %
				2 µl Gremlin-FITC		
MIF		5 µl CD42b-PE		5 µl Triton X		
GPVI		5 µl GPVI-FITC		2 µl MIF-FITC		
		5 µl CD42b-PE		5 µl CD42b-PE		
CD62p				300 µl PFA 0,5 %		
PAC-1		5 µl PAC-1-FITC				
		5 µl CD42b-PE				

¹ Inkubation über 30 Minuten bei Raumtemperatur und in Dunkelheit

Messprotokoll

Die Messung erfolgt mit dem BD FACS Calibur™ Flow Cytometer von BD Biosciences. Ein Messprotokoll wurde zu Beginn der Studie angelegt. Hierbei wurden im Messprotokoll eine technische Kontrolle, eine Isotyp- und eine FMO-Kontrolle eingefügt. Die Messanzahl wurde auf 10 000 Zellen festgelegt.

Auswertung der Messungen

Für die Untersuchungen dieser Arbeit werden lediglich die Thrombozyten genutzt. Diese werden anhand des plättchenspezifischen Markers CD42b identifiziert. Die Thrombozy-

tenpopulation wird ausgewählt indem ein sogenanntes Gate um diese gelegt wird. Die anderen Blutzellen, wie beispielsweise Erythrozyten oder Leukozyten, werden nicht betrachtet. Dieses Gate kann etwas schwanken und wird während der Auswertung manuell überprüft und gegebenenfalls angepasst. Ein Beispiel einer Messung bzw. Auswertung ist in Abbildung 8 dargestellt.

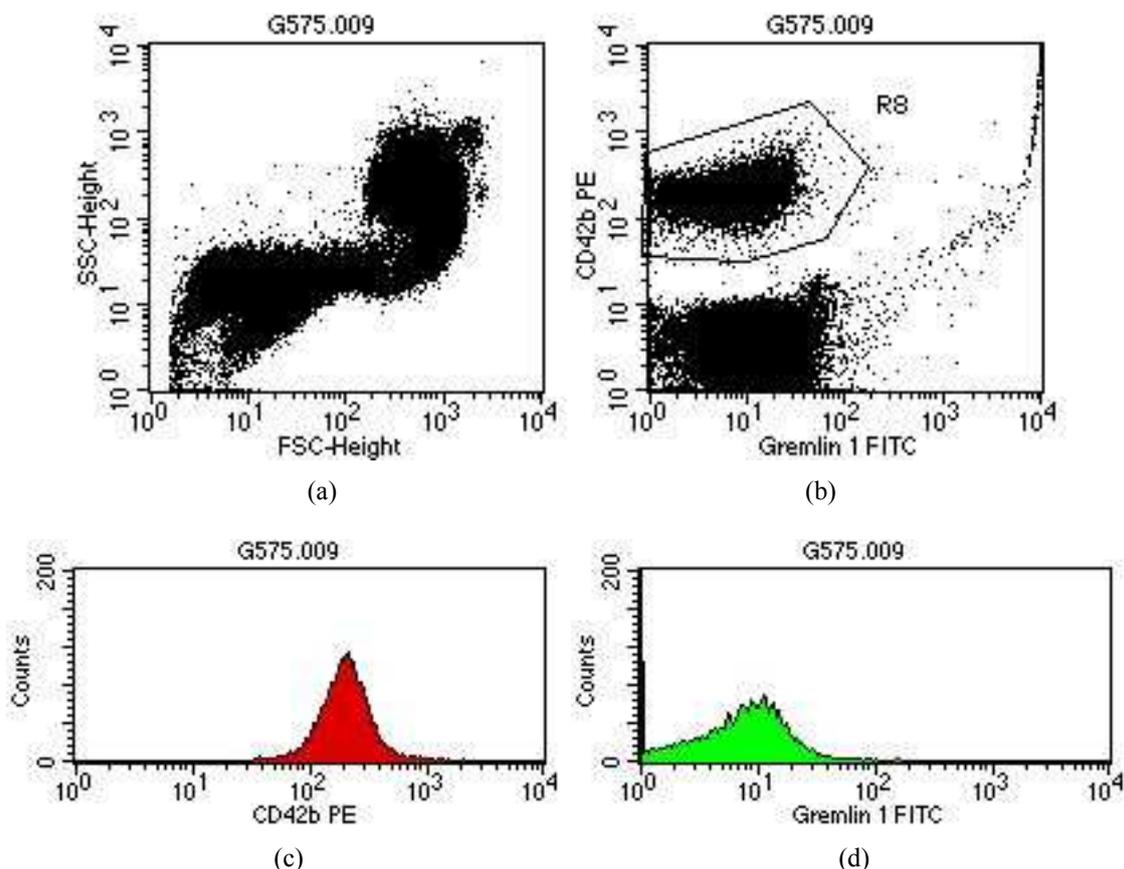


Abbildung 8: Beispiel einer durchflusszytometrischen Messung zur Bestimmung von Gremlin-1. a) Darstellung aller gemessener Zellen nach Vorwärtsstreulicht und Seitwärtsstreulicht. Hierdurch ist bereits eine erste Differenzierung der Zellen nach Größe, Form und Zellinhalt möglich. b) Detektion der Thrombozyten: Auf der Ordinatenachse wird das thrombozytenspezifische CD42b dargestellt. Hierdurch können die Thrombozyten detektiert werden. Um sie wird nun ein sogenanntes Gate gelegt, d.h. nur diese werden für die weiteren Untersuchungen betrachtet. Auf der Abszisse ist bereits der zu bestimmende Marker Gremlin-1 dargestellt. c) Darstellung der Bestimmung von CD42b: Es wird dargestellt, wieviele positive Counts die untersuchten (=gegateten) Zellen für den Marker CD42p haben. Auf der Abszisse ist die Intensität des Signals dargestellt. Diese wird durch die Fluoreszenz des anti-CD42b-PE-Antikörpers gebildet und korreliert mit dem Vorhandensein des CD42b-Antigens auf den untersuchten Zellen. Die Ordinate zeigt die Anzahl der Zellen an. d) Darstellung der Bestimmung von Gremlin-1: Darstellung des gemessenen Gremlin-1 auf und in den untersuchten Zellen. Abkürzungen: Seitwärtsstreulicht (SSC), Vorwärtsstreulicht (FSC), mit Phycoerythrin-fluoreszentgekoppeltem Antikörper markiertes CD42b-Antigen (CD42b PE), mit Fluoresceinisothiocyanat-Antikörper markiertes Gremlin-1 (Gremlin-1 FITC)

2.3.3 Messung der Plasmakonzentrationen mittels ELISA

Funktionsweise der ELISA-Technik

Die Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)-Methode ist ein immunologisches Nachweisverfahren, welches auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Hierbei können Antigene, wie beispielsweise Proteine, Viren oder Hormone, in einer Probe nachgewiesen werden. Das Verfahren basiert auf spezifischen Antikörpern, welche an das zu bestimmende Antigen binden. Die gebundenen Antikörper werden dann mit enzymgekoppelten Antikörpern markiert. Durch eine enzymatische Reaktion wird ein Farbstoff aus einem zugegebenen Substrat gebildet. Die Farbreaktion wird gemessen und über Vergleichsreihen kann eine quantitative Bestimmung erfolgen. Somit kann auf die Menge des zu bestimmenden Antigens zurückgeschlossen werden.

Durchführung der ELISA-Messung

Für die ELISA-Messung wird das Patientenblut mit EDTA als antikoagulativen Zusatz versehen (EDTA-Blutmonovette). Die Monovette wird für 30 Minuten bei Raumtemperatur gelagert um die antikoagulative Wirkung zu gewährleisten. Anschließend wird die Monovette mit 3000 rpm für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das überstehende Plasma wird abpipettiert und in Eppendorf-Gefäßchen bei -20°C bis zur Messung eingefroren. Bei einer längeren Dauer werden die Eppendorf-Gefäßchen nach 6 Wochen bei -80°C gelagert. Die weitere Aufarbeitung der Proben sowie die Durchführung der Messung erfolgt nach den Vorgaben der Kit-Hersteller.

2.3.4 Erhebung der Patientendaten

Erhebung der Basisdaten

Von jedem Patienten werden die klinischen Basisdaten zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses erhoben. Diese Basisdaten werden aus der Patientenakte entnommen.

Es werden folgende Daten erfasst:

- der Aufnahmegrund (SAP, IAP, NSTEMI oder STEMI)
- persönliche Daten: Alter, Geschlecht, Größe, Gewicht, Body-Mass-Index (BMI)

- vorhandene kardiovaskuläre Risikofaktoren: arterielle Hypertonie, Nikotin, familiäre Belastung, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie
- Vorerkrankungen und vorherige medizinische Behandlungen
- Messwerte aus der echokardiographischen Untersuchung
- Aufnahmemedikation
- Labordaten (beispielsweise Hämoglobin, Erythrozytenanzahl, Troponin, CRP)

Die Einteilung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LV-Funktion) erfolgt in folgende Gruppen:

- keine Einschränkung der LV-Funktion: Ejektionsfraktion (EF) $\geq 55\%$
- leichtgradige Einschränkung der LV-Funktion: EF von 45 % - 54 %
- mittelgradige Einschränkung der LV-Funktion: EF von 35 % - 44 %
- hochgradige Einschränkung der LV-Funktion: EF $< 35\%$

Die Berechnung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) erfolgt nach der Modification of Diet Renal Disease (MDRD)-Formel:

$$\text{GFR} = 186 \times \text{Serumkreatinin (mg/dl)}^{-1,154} \times \text{Alter (in Jahren)}^{-0,203} \times 0,742 \text{ (falls weiblich)}$$

Nachverfolgung der Patienten

Um eine Aussage über das klinische Ergebnis und die Prognose der Patienten treffen zu können, werden alle Patienten über mindestens zwölf Monate nach Studieneinschluss nachverfolgt. Hierzu werden bei erneuter dokumentierter medizinischer Behandlung die Patientenakten auf Events und Endpunkte untersucht. Bei fehlenden Daten werden der Patient, die Angehörigen oder der Hausarzt telefonisch befragt.

Als kombinierter klinischer Endpunkt sind folgende Ereignisse definiert:

- Schlaganfall
- Stentthrombose
- Myokardinfarkt
- Tod

2.3.5 Statistische Auswertung

Kategorische (nominal- und ordinalskalierte) Größen, wie beispielsweise das Geschlecht, das Vorliegen kardiovaskulärer Risikofaktoren und die Aufnahmemedikation, werden als Häufigkeiten und in Prozentwerten angegeben.

Für metrische Daten, wie beispielsweise das Alter, die Größe, das Gewicht und die erhobenen Messwerte, wird der Median mit dem 25 %- und 75 %-Quartil angegeben. Zur Berechnung der Quartile wird das gewichtete Mittel verwendet. Die Signifikanz wird bei dichotomen Berechnungen mittels Mann-Whitney-U-Test untersucht, bei mehr als zwei Gruppen wird der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Korrelationsanalysen werden mittels Spearman-Rang-Korrelationskoeffizient durchgeführt.

Zur graphischen Darstellung wird das Boxplot-Diagramm verwendet. Die Box zeigt hierbei den Median, das 25 %- und das 75 %-Quartil an. Die Whisker werden nach Tukey dargestellt und zeigen den höchsten bzw. niedrigsten Wert an, welcher noch nicht als Ausreißer definiert ist. Ausreißer (1,5- bis 3-facher Interquartilsabstand zum 25 %- bzw. 75 %-Quartil) werden als Punkte dargestellt. Extreme Werte werden als Sterne dargestellt und umfassen alle Werte mit einem mehr als 3-fachen Interquartilsabstand zum 25 %- bzw. 75 %-Quartil.

Die Überprüfung der Prognose erfolgt mittels Kaplan-Meier-Kurven. Hierbei wird der Log-Rank-Test zur Überprüfung der Signifikanz verwendet.

Da nicht für alle Patienten alle Informationen und Messwerte vorhanden sind, wird zur Berechnung ein paarweiser Ausschluss durchgeführt.

Das Signifikanzniveau wird mit $p \leq 0,05$ festgelegt.

In dieser Studie werden zwei Hypothesen überprüft:

- Hypothese 1: Die thrombozytäre Konzentration von Gremlin-1 unterscheidet sich bei Patienten mit einer stabilen Angina pectoris von Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom.
- Hypothese 2: Die initiale thrombozytäre Gremlin-1-Konzentration zeigt einen Einfluss auf das Auftreten eines kombinierten Endpunktes.

Alle weiteren Untersuchungen erfolgen rein deskriptiv und damit lediglich hypothesengenerierend.

Kapitel 3 Ergebnisse

3.1 Beschreibung der Patientenkohorten

3.1.1 Patientencharakteristika der Kohorte 1

In diese Studie wurden konsekutiv 235 Patienten eingeschlossen, welche eine Herzkatheteruntersuchung in der Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Tübingen erhielten. Die 235 Patienten unterteilen sich in 93 Patienten mit stabiler Angina pectoris und 142 Patienten, welche aufgrund eines akuten Koronarsyndroms eine perkutane Koronarintervention erhielten (siehe Tabelle 6). Die Patienten mit akutem Koronarsyndrom untergliedern sich weiter in 49 Patienten mit instabiler Angina pectoris, 62 Patienten mit NSTEMI und 31 Patienten mit STEMI.

Tabelle 6: Aufnahmegrund der untersuchten Patienten

Aufnahmegrund	absolute Häufigkeit	relative Häufigkeit [%]
stabile Angina pectoris	93	39,6
akutes Koronarsyndrom	142	60,4
instabile Angina pectoris	49	20,9
NSTEMI	62	26,4
STEMI	31	13,2

Darstellung der absoluten Häufigkeit an Patienten mit der jeweiligen Krankheitsausprägung der koronaren Herzkrankheit und der relativen Häufigkeit in Prozent. Das Krankheitsbild des akuten Koronarsyndroms wird weiter untergliedert in die instabile Angina pectoris, den Nicht-ST-Streckenhebungs-Myokardinfarkt (NSTEMI) und den ST-Streckenhebungs-Myokardinfarkt (STEMI).

Die demographischen Daten der Patientenkohorte sind in Tabelle 7 aufgeführt. Es werden das Alter und Geschlecht, der BMI, das Vorliegen kardiovaskulärer Risikofaktoren, echokardiographische Daten, Begleiterkrankungen, eine vorherige Behandlung einer KHK sowie eine bestehende Medikation zum Zeitpunkt der Aufnahme und ausgewählte laborchemische Parameter beschrieben.

Tabelle 7: Patientencharakteristika aufgliedert nach Ausprägung der KHK (Kohorte 1)

Charakteristikum	SAP (n= 93)	ACS (n= 142)
Alter [Jahre] ¹	71,0 (60,5; 76,0)	69,0 (58,0; 77,0)
Geschlecht:		
männlich	69 (74,2)	108 (76,1)
weiblich	24 (25,8)	34 (23,9)
Body-Mass-Index ¹	28,0 (25,2; 30,9)	27,0 (25,0; 29,1)
Kardiovaskuläre Risikofaktoren:		
arterielle Hypertonie	82 (88,2)	121 (85,2)
Hyperlipidämie	66 (71,0)	82 (58,2)
Nikotin	40 (43,0)	63 (44,7)
familiäre Belastung	32 (34,4)	32 (24,8)
Diabetes mellitus	34 (36,6)	43 (30,3)
Begleiterkrankungen:		
Vorhofflimmern:	14 (15,9)	23 (18,7)
paroxysmal	6 (6,8)	19 (15,4)
persistierend	8 (9,1)	4 (3,3)
vorheriger MI	30 (32,3)	49 (34,5)
vorherige PCI	49 (52,7)	43 (30,5)
vorheriger CABG	5 (5,4)	10 (7,0)
Echokardiographische Daten:		
normale LV-Funktion	23 (43,4)	51 (45,1)
leichtgradig eingeschränkt	14 (26,4)	32 (28,3)
mittelgradig eingeschränkt	13 (24,5)	26 (23,0)
hochgradig eingeschränkt	3 (5,7)	4 (3,5)
Aufnahmemedikation:		
ASS	70 (75,3)	67 (47,2)
orale Antikoagulanzen ²	9 (9,7)	9 (6,3)
Statine	64 (68,8)	58 (40,8)
Betablocker	68 (73,1)	63 (44,4)

Charakteristikum	SAP (n= 93)	ACS (n= 142)
AT1-Antagonisten	22 (23,7)	21 (14,8)
ACE-Hemmer	43 (46,2)	48 (33,8)
Ca-Antagonisten	18 (20,5)	25 (20,3)
Diuretika	41 (44,1)	45 (31,7)
Aldosteron-Antagonisten	16 (17,2)	4 (2,8)
Nitrate	4 (4,5)	7 (5,7)
Insulin	16 (17,2)	16 (11,3)
Digitalis	5 (5,7)	2 (1,6)
PPI	32 (36,4)	31 (25,2)
P2Y12-Inhibitoren:	32 (34,4)	16 (11,3)
Clopidogrel	20 (21,5)	13 (9,2)
Prasugrel	6 (6,5)	0 (0,0)
Ticagrelor	6 (6,5)	3 (2,1)
Laborchemische Parameter: ¹		
GFR [ml/min]	84,4 (63,1; 103,2)	78,0 (63,8; 96,8)
Kreatinin [mg/dl]	0,9 (0,8; 1,1)	1,0 (0,8; 1,2)
CRP [mg/dl]	0,3 (0,1; 0,9)	0,4 (0,1; 1,8)
Leukozytenanzahl [$10^3/\mu\text{l}$]	7,3 (6,1; 9,0)	9,2 (7,1; 12,3)
Thrombozytenanzahl [$10^3/\mu\text{l}$]	230,0 (189,0; 290,0)	239,5 (203,0; 279,8)
Hämoglobin [g/dl]	14,1 (12,9; 14,9)	14,2 (12,9; 15,2)
CK maximal [U/l]	103,0 (67,0; 127,0)	226,0 (110,0; 684,5)
Troponin maximal [$\mu\text{g/l}$]	0,0 (0,0; 0,0)	1,5 (0,0; 18,4)
Cholesterin gesamt [mg/dl]	165,0 (137,0; 197,0)	168,0 (150,8; 192,0)

Metrisch-skalierte Daten¹ werden als Median (25 %-Quartil; 75 %-Quartil) dargestellt. Nominal- und ordinalskalierten Daten werden als absolute Häufigkeit (prozentuale Häufigkeit) angegeben. Orale Antikoagulanzen² sind Marcumar und Dabigatran. Abkürzungen: Myokardinfarkt (MI), perkutane Koronarintervention (PCI), Koronararterien-Bypass (CABG), linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LV-Funktion), Acetylsalicylsäure (ASS), Protonenpumpeninhibitor (PPI), P2Y12-Rezeptor-Antagonist (P2Y12-Inhibitor), Angiotensin-1-Rezeptorantagonist (AT1-Antagonist), Angiotensin Converting Enzyme-Hemmer (ACE-Hemmer), Calciumkanalblocker (Ca-Antagonist), Glomeruläre Filtrationsrate (GFR), C-reaktives Protein (CRP), Kreatinkinase (CK). Diese Daten wurden in [98] veröffentlicht.

Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Aufnahme lag zwischen 30 und 95 Jahren, der Median beträgt 69 Jahre. Es wurden deutlich mehr Männer als Frauen in die Studie eingeschlossen (177 Männer und 58 Frauen). Es zeigt sich, dass viele Patienten einen oder mehrere Risikofaktoren für eine KHK aufweisen. 86,4 % der Patienten leiden an einer arte-

riellen Hypertonie, 63,2 % an einer Hyperlipidämie, 44 % weisen einen Nikotingebrauch auf, etwa 30 % leiden an einer familiären Vorbelastung für ein kardiovaskuläres Ereignis oder an einem Diabetes mellitus. Hierbei weisen Patienten, welche aufgrund einer vorbekannten stabilen Angina pectoris aufgenommen wurden, häufiger eine bekannte Hyperlipidämie, eine familiäre Belastung für kardiovaskuläre Erkrankungen und einen Diabetes mellitus auf. Bei den Begleiterkrankungen zeigt sich ein erhöhtes Vorkommen eines paroxysmalen Vorhofflimmerns bei Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom. Im Gegensatz dazu weisen Patienten mit einer stabilen Angina pectoris häufiger ein persistierendes Vorhofflimmern auf. Beide Werte besitzen jedoch nur eine geringe Fallzahl. Des Weiteren erhielten Patienten mit einer SAP zu einem höheren Anteil bereits in der Vorgeschichte eine PCI. Patienten, welche aufgrund einer stabilen Angina pectoris eine perkutane Koronarintervention erhielten, wurden zum Aufnahmezeitpunkt häufiger mit antithrombozytären Substanzen wie Acetylsalicylsäure oder einem P2Y12-Rezeptor-Antagonist (P2Y12-Inhibitor), mit Statinen und Betablockern sowie mit Aldosteron-Antagonisten vorbehandelt. Die laborchemischen Messwerte von Patienten mit einer stabilen Angina pectoris zeigen eine höhere Leukozytenanzahl, jedoch – wie zu erwarten – deutlich niedrigere Messwerte für die Kreatinkinase und für Troponin, als Patienten mit akutem Koronarsyndrom.

In Tabelle 8 sind die Basischarakteristika der Hauptkohorte bei einer Unterteilung in Diabetiker und Nichtdiabetiker zusammengefasst. Hierbei zeigen sich Unterschiede im Alter der Patienten, im Vorliegen von Vorerkrankungen und vorangegangenen kardialen Ereignissen sowie Operationen, bei der Aufnahmemedikation als auch bei den laborchemischen Messwerten. In die Studie eingeschlossene Patienten mit einem Diabetes mellitus sind im Mittel älter als Nichtdiabetiker und leiden häufiger an einer arteriellen Hypertonie oder einer Hyperlipidämie. Sie sind jedoch seltener Raucher oder familiär für eine koronare Herzkrankheit vorbelastet. Diabetiker leiden häufiger an einem Vorhofflimmern und haben deutlich häufiger bereits einen Myokardinfarkt in der Vorgeschichte erlebt (45,5 % der Diabetiker gegenüber 27,8 % der Nichtdiabetiker) oder wurden aufgrund der KHK operativ behandelt. Des Weiteren leiden die Diabetiker vermehrt unter einer eingeschränkten Herzleistung. Die Diabetiker weisen eine höhere Vormedikation auf als die Gruppe der Nichtdiabetiker. So ist die Einnahme aller untersuchten Medikamentengruppen bei Diabetikern deutlich höher als bei Nichtdiabetikern. Eine Betrachtung der gemessenen Laborwerte zeigt eine niedrigere glomeruläre Filtrationsrate bei Diabetikern als bei Nichtdiabetikern. Sie haben ein etwas höheres Kreatinin sowie eine erhöhte Konzentration von C-reaktivem Protein. Die durchschnittliche Leukozytenanzahl im Blut ist höher, der Hämoglobingehalt hingegen niedriger, als bei Nichtdiabetikern.

Tabelle 8: Patientencharakteristika bei Diabetikern und Nichtdiabetikern (Kohorte 1)

Charakteristikum	Nichtdiabetiker (n= 158)	Diabetiker (n= 77)
Alter [Jahre] ¹	68,5 (58,0; 76,0)	73,0 (61,0; 78,0)
Geschlecht:		
männlich	122 (72,0)	55 (71,4)
weiblich	36 (22,8)	22 (28,6)
Body-Mass-Index ¹	28,7 (25,5; 32,0)	27,2 (24,8; 29,7)
Kardiovaskuläre Risikofaktoren:		
arterielle Hypertonie	129 (81,6)	74 (96,1)
Hyperlipidämie	96 (61,1)	52 (67,5)
Nikotin	76 (48,1)	27 (35,5)
familiäre Belastung	49 (32,7)	15 (20,5)
Begleiterkrankungen:		
Vorhofflimmern:		
paroxysmal	16 (11,3)	21 (30,0)
persistierend	11 (7,8)	14 (20,0)
persistierend	5 (3,5)	7 (10,0)
vorheriger MI	44 (27,8)	35 (45,5)
vorherige PCI	55 (35,0)	37 (48,1)
vorheriger CABG	5 (3,2)	10 (13,0)
Echokardiographische Daten:		
normale LV-Funktion	57 (51,4)	17 (30,9)
leichtgradig eingeschränkt	27 (24,3)	19 (34,5)
mittelgradig eingeschränkt	23 (20,7)	16 (29,1)
hochgradig eingeschränkt	4 (3,6)	3 (5,5)
Aufnahmemedikation:		
ASS	82 (51,9)	55 (71,4)
orale Antikoagulanzen ²	9 (5,7)	9 (11,7)
Statine	69 (43,7)	53 (68,8)
Betablocker	74 (46,8)	57 (74,0)
AT1-Antagonisten	25 (15,8)	18 (23,4)
ACE-Hemmer	51 (32,3)	40 (51,9)
Ca-Antagonisten	24 (17,0)	19 (27,1)
Diuretika	45 (28,5)	41 (53,2)
Aldosteron-Antagonisten	11 (7,0)	9 (11,7)
Nitrate	5 (3,5)	6 (8,6)

Charakteristikum	Nichtdiabetiker (n= 158)	Diabetiker (n= 77)
Insulin	1 (0,6)	31 (40,3)
Digitalis	4 (2,8)	3 (4,3)
PPI	29 (20,6)	34 (48,6)
P2Y12-Inhibitoren:	27 (17,1)	21 (27,3)
Clopidogrel	19 (12,0)	14 (18,2)
Prasugrel	4 (2,5)	2 (2,6)
Ticagrelor	4 (2,5)	5 (6,5)
Laborchemische Parameter: ¹		
GFR [ml/min]	81,0 (70,6; 99,6)	74,9 (53,9; 103,2)
Kreatinin [mg/dl]	0,9 (0,8; 1,1)	1,0 (0,8; 1,4)
CRP [mg/dl]	0,3 (0,1; 1,4)	0,5 (0,2; 1,0)
Leukozytenanzahl [$10^3/\mu\text{l}$]	8,2 (6,6; 10,3)	8,7 (6,8; 11,1)
Thrombozytenanzahl [$10^3/\mu\text{l}$]	236,0 (201,0; 279,0)	230,0 (197,0; 292,0)
Hämoglobin [g/dl]	14,4 (13,3; 15,1)	13,6 (11,9; 14,8)
CK maximal [U/l]	141,0 (86,0; 386,0)	125,0 (76,0; 288,5)
Troponin maximal [$\mu\text{g/l}$]	0,0 (0,0; 10,7)	0,1 (0,0; 3,7)
Cholesterin gesamt [mg/dl]	167,5 (150,3; 197,0)	168,0 (134,0; 192,5)

Metrisch-skalierte Daten¹ werden als Median (25 %-Quartil; 75 %-Quartil) dargestellt. Nominal- und ordinalskalierten Daten werden als absolute Häufigkeit (prozentuale Häufigkeit) angegeben. Orale Antikoagulantien² sind Marcumar und Dabigatran. Abkürzungen: Myokardinfarkt (MI), perkutane Koronarintervention (PCI), Koronararterien-Bypass (CABG), linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LV-Funktion), Acetylsalicylsäure (ASS), Angiotensin-1-Rezeptorantagonist (AT1-Antagonist), Angiotensin Converting Enzyme-Hemmer (ACE-Hemmer), Calciumkanalblocker (Ca-Antagonist), Protonenpumpeninhibitor (PPI), P2Y12-Rezeptor-Antagonist (P2Y12-Inhibitor), Glomeruläre Filtrationsrate (GFR), C-reaktives Protein (CRP), Kreatinkinase (CK)

3.1.2 Patientencharakteristika der Kohorte 2

Die Patientenkohorte 2 besteht aus 286 Patienten. Hiervon leiden 88 Patienten an einem Diabetes mellitus Typ 2, 198 Patienten haben keinen Diabetes mellitus. Als Aufnahmegrund lag bei 166 Patienten eine stabile Angina pectoris vor, 120 Patienten litten unter einem akuten Koronarsyndrom.

Tabelle 9 beschreibt die Basischarakteristika von Kohorte 2. Hierbei wird eine Aufteilung in zwei Gruppen nach der Ausprägung der koronaren Herzkrankheit (stabile Angina pecto-

ris oder akutes Koronarsyndrom) vorgenommen. Es werden das Alter, das Geschlecht, kardiovaskuläre Risikofaktoren, Begleiterkrankungen, die linksventrikuläre Ejektionsfraktion, die Medikation zum Aufnahmezeitpunkt und laborchemische Parameter aufgeführt.

Hierbei zeigt sich, dass Patienten, welche aufgrund eines akuten Koronarsyndroms in die Klinik aufgenommen wurden, im Durchschnitt älter waren als Patienten, welche geplant aufgrund einer stabilen Angina pectoris eine PCI erhielten (72 vs. 69 Jahre). Patienten mit einem ACS sind ebenfalls häufiger männlich (75,8 % der Patienten mit ACS vs. 66,9 % der Patienten mit SAP). ACS-Patienten litten häufiger unter einer arteriellen Hypertonie (86,7 % vs. 70,5 %), sowie einer Hyperlipidämie (65,8 % vs. 53,6 %) und waren vermehrt Raucher (43,3 % vs. 31,9 %).

Tabelle 9: Patientencharakteristika aufgliedert nach Ausprägung der KHK (Kohorte 2)

Charakteristikum	SAP (n= 166)	ACS (n= 120)
Alter [Jahre] ¹	69,0 (58,8; 77,0)	72,0 (61,0; 79,0)
Geschlecht:		
männlich	111 (66,9)	91 (75,8)
weiblich	55 (33,1)	29 (24,2)
Kardiovaskuläre Risikofaktoren:		
arterielle Hypertonie	117 (70,5)	104 (86,7)
Hyperlipidämie	89 (53,6)	79 (65,8)
Nikotin	53 (31,9)	52 (43,3)
familiäre Belastung	34 (20,5)	21 (17,5)
Diabetes mellitus	53 (31,9)	35 (29,2)
Begleiterkrankungen:		
Niereninsuffizienz	49 (29,5)	26 (21,7)
vorheriger MI	47 (28,3)	40 (33,3)
vorheriger CABG	10 (6,0)	14 (11,7)
Echokardiographische Daten:		
normale LV-Funktion	61 (36,7)	49 (41,5)
leichtgradig eingeschränkt	38 (22,9)	32 (27,1)
mittelgradig eingeschränkt	29 (17,5)	26 (22,0)
hochgradig eingeschränkt	38 (22,9)	11 (9,3)
Aufnahmemedikation:		
ASS	103 (62,0)	86 (71,7)
orale Antikoagulanzen ²	13 (7,8)	7 (5,8)
Statine	76 (45,8)	64 (53,3)

Charakteristikum	SAP (n= 166)	ACS (n= 120)
Betablocker	130 (78,3)	84 (70,0)
AT1-Antagonisten	24 (14,5)	12 (10,0)
ACE-Hemmer	116 (69,9)	61 (50,8)
Ca-Antagonisten	24 (14,5)	24 (20,0)
Diuretika	102 (61,4)	51 (42,5)
Aldosteron-Antagonisten	43 (25,9)	5 (4,2)
Nitrate	14 (8,4)	8 (6,7)
Digitalis	14 (8,4)	3 (2,5)
Clopidogrel	44 (26,5)	43 (35,8)
Laborchemische Parameter:		
Kreatinin [mg/dl]	1,0 (0,9; 1,3)	1,0 (0,9; 1,4)
CRP [mg/dl]	0,4 (0,1; 1,3)	1,8 (0,6; 4,5)
CK maximal [U/l]	100,0 (66,0; 158,0)	202,0 (104,0; 398,5)
Troponin maximal [μ g/l]	0,0 (0,0; 0,1)	1,9 (0,5; 10,3)
Cholesterin gesamt [mg/dl]	192,0 (168,0; 228,0)	167,0 (133,5; 208,0)

Metrisch-skalierte Daten¹ werden als Median (25 %-Quartil; 75 %-Quartil) dargestellt. Nominal- und ordinalskalierten Daten werden als absolute Häufigkeit (prozentuale Häufigkeit) angegeben. Orale Antikoagulanzen² sind Marcumar und Dabigatran. Abkürzungen: Myokardinfarkt (MI), Koronararterien-Bypass (CABG), linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LV-Funktion), Acetylsalicylsäure (ASS), Angiotensin-1-Rezeptorantagonist (AT1-Antagonist), Angiotensin Converting Enzyme-Hemmer (ACE-Hemmer), Calciumkanalblocker (Ca-Antagonist), C-reaktives Protein (CRP), Kreatinkinase (CK)

Tabelle 10 zeigt eine Aufschlüsselung der Basischarakteristika der Patienten aus Kohorte 2, aufgeteilt in die Gruppen Diabetiker und Nichtdiabetiker. In dieser Kohorte sind Patienten mit Diabetes mellitus im Durchschnitt älter (Median 72,5 Jahre) als Nichtdiabetiker (69,0 Jahre). Diabetiker dieser Kohorte leiden häufiger an einer arteriellen Hypertonie (92,0 % vs. 70,7 %), einer Hyperlipidämie (72,7 % vs. 52,5 %) und einer Niereninsuffizienz (38,6 % vs. 20,7 %) als Nichtdiabetiker.

Tabelle 10: Patientencharakteristika bei Diabetikern und Nichtdiabetikern (Kohorte 2)

Charakteristikum	Nichtdiabetiker (n= 198)	Diabetiker (n= 88)
Alter [Jahre] ¹	69,0 (56,8; 77,3)	72,5 (65,3; 79,0)
Geschlecht:		
männlich	138 (69,7)	64 (72,7)

Charakteristikum	Nichtdiabetiker (n= 198)	Diabetiker (n= 88)
weiblich	60 (30,3)	24 (27,3)
Kardiovaskuläre Risikofaktoren:		
arterielle Hypertonie	140 (70,7)	81 (92,0)
Hyperlipidämie	104 (52,5)	64 (72,7)
Nikotin	71 (35,9)	34 (38,6)
familiäre Belastung	44 (22,2)	11 (12,5)
Begleiterkrankungen:		
vorheriger MI	57 (28,8)	30 (34,1)
vorheriger CABG	17 (8,6)	7 (8,0)
Niereninsuffizienz	41 (20,7)	34 (38,6)
Echokardiographische Daten:		
normale LV-Funktion	73 (37,2)	37 (42,0)
leichtgradig eingeschränkt	54 (27,6)	16 (18,2)
mittelgradig eingeschränkt	34 (17,3)	21 (23,9)
hochgradig eingeschränkt	35 (17,9)	14 (15,9)
Aufnahmemedikation:		
ASS	126 (63,6)	63 (71,6)
orale Antikoagulanzen ²	13 (6,6)	7 (8,0)
Statine	93 (47,0)	47 (53,4)
Betablocker	145 (73,2)	69 (78,4)
AT1-Antagonisten	21 (10,6)	15 (17,0)
ACE-Hemmer	121 (61,1)	56 (63,6)
Ca-Antagonisten	25 (12,6)	23 (26,1)
Diuretika	101 (51,0)	52 (59,1)
Aldosteron-Antagonisten	37 (18,7)	11 (12,5)
Nitrate	12 (6,1)	10 (11,4)
Digitalis	10 (5,1)	7 (8,0)
Clopidogrel	59 (29,8)	28 (31,8)
Laborchemische Parameter:		
Kreatinin [mg/dl]	1,0 (0,9; 1,2)	1,1 (0,9; 1,5)
CRP [mg/dl]	0,9 (0,2; 2,2)	1,0 (0,2; 4,5)
CK maximal [U/l]	117,5 (72,3; 240,3)	136,0 (92,0; 238,0)
Troponin maximal [µg/l]	0,1 (0,0; 2,0)	0,1 (0,0; 0,6)
Cholesterin gesamt [mg/dl]	191,5 (158,0; 224,8)	187,0 (156,5; 214,0)

Metrisch-skalierte Daten¹ werden als Median (25 %-Quartil; 75 %-Quartil) dargestellt. Nominal- und ordinalskalierten Daten werden als absolute Häufigkeit (prozentuale Häufigkeit) angegeben. Orale Antikoagulanzen² sind Marcumar und Dabigatran. Abkürzungen: Myokardinfarkt (MI), Koronararterien-Bypass (CABG), linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LV-Funktion), Acetylsalicylsäure (ASS), Angiotensin-1-Rezeptorantagonist (AT1-Antagonist), Angiotensin Converting Enzyme-Hemmer (ACE-Hemmer), Calciumkanalblocker (Ca-Antagonist), C-reaktives Protein (CRP), Kreatinkinase (CK). Diese Daten wurden in [100] veröffentlicht.

3.2 Einfluss der Patientencharakteristika auf die thrombozytäre Gremlin-1-Konzentration

Tabelle 11 zeigt eine Gegenüberstellung der durchschnittlichen thrombozytären Gremlin-1-Konzentration anhand der demographischen Daten, kardiovaskulären Risikofaktoren, Vorerkrankungen, Medikation und der laborchemischen Parameter.

Tabelle 11: Einfluss von demographischen Daten, Vorerkrankungen und Vormedikation auf die thrombozytäre Gremlin-1-Konzentration.

Charakteristikum	Gremlin-1-Konzentration [MFI]	
	Merkmal vorhanden	Merkmal nicht vorhanden
Geschlecht:		
männlich	12,8 (10,2; 16,7)	-
weiblich	13,8 (10,8; 18,1)	-
Kardiovaskuläre Risikofaktoren:		
arterielle Hypertonie	12,8 (10,4; 16,9)	13,8 (10,0; 17,7)
Hyperlipidämie	12,7 (10,4; 16,8)	13,4 (10,6; 18,1)
Nikotin	12,7 (10,2; 16,8)	13,5 (10,7; 17,8)
familiäre Belastung	13,8 (10,7; 17,1)	12,6 (10,2; 16,8)
Diabetes mellitus	12,5 (10,3; 18,2)	13,3 (10,4; 16,7)
Begleiterkrankungen:		
Vorhofflimmern	12,2 (9,7; 23,5)	13,4 (10,7; 17,0)
vorheriger MI	12,7 (10,0; 17,1)	13,3 (10,4; 16,9)
vorherige PCI	13,5 (11,1; 17,1)	12,8 (10,0; 17,0)
vorheriger CABG	11,0 (9,3; 15,7)	13,3 (10,4; 17,1)
eingeschränkte LV-Funktion	11,8 (9,7; 16,1)	13,9 (10,8; 17,9)
Aufnahmemedikation:		
ASS	13,4 (10,4; 17,1)	12,7 (10,3; 16,8)
orale Antikoagulanzen ²	13,2 (11,3; 24,9)	13,0 (10,3; 17,0)

Charakteristikum	Gremlin-1-Konzentration [MFI]	
	Merkmal vorhanden	Merkmal nicht vorhanden
Statine	13,6 (10,7; 17,2)	12,7 (10,0; 16,7)
Betablocker	13,4 (10,4; 17,7)	12,8 (10,3; 16,7)
AT1-Antagonisten	13,5 (9,1; 17,8)	12,9 (10,4; 16,8)
ACE-Hemmer	13,8 (10,4; 17,1)	12,8 (10,3; 16,8)
Ca-Antagonisten	13,5 (10,5; 16,7)	13,2 (10,4; 17,8)
Diuretika	12,9 (10,0; 16,7)	13,2 (10,7; 17,2)
Aldosteron-Antagonisten	14,1 (11,6; 17,9)	12,9 (10,2; 17,1)
Nitrate	17,8 (13,9; 20,7)	12,9 (10,4; 17,0)
Insulin	14,6 (10,9; 20,6)	12,8 (10,2; 16,7)
Digitalis	12,8 (11,2; 26,7)	13,3 (10,4; 17,1)
PPI	13,7 (10,4; 17,8)	12,8 (10,4; 16,9)
P2Y12-Inhibitoren	13,3 (11,1; 17,0)	12,9 (10,2; 17,3)
metrische Merkmale [Spearman-Rang-Korrelationskoeffizient]		
Alter [Jahre]		-0,041
Body-Mass-Index		0,124
Laborchemische Parameter:		
GFR [ml/min]		0,028
Kreatinin [mg/dl]		-0,081
CRP [mg/dl]		-0,032
Leukozytenanzahl [$10^3/\mu\text{l}$]		-0,105
Thrombozytenanzahl [$10^3/\mu\text{l}$]		0,016
Hämoglobin [g/dl]		0,034
CK maximal [U/l]		-0,082
Troponin maximal [$\mu\text{g/l}$]		-0,183
Cholesterin gesamt [mg/dl]		-0,081

Im oberen Teil dieser Tabelle werden nominal-skalierte Merkmale betrachtet. Es wird die durchschnittliche Gremlin-1-Konzentration der Gruppen als Median (25 %-; 75 %-Quartil) angegeben. Die Spalten untergliedern die Patientenkohorte nach dem Vorliegen oder Fehlen eines Merkmals (z.B. arterielle Hypertonie) in zwei Gruppen. Im unteren Teil der Tabelle werden die Merkmale mit metrischer Skalierung aufgeführt. Für diese wird die Korrelation mit der Gremlin-1-Konzentration durch den Spearman-Rang-Korrelationskoeffizienten beschrieben. Abkürzungen: mean fluorescence intensity (MFI) Myokardinfarkt (MI), perkutane Koronarintervention (PCI), Koronararterien-Bypass (CABG), linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LV-Funktion), Acetylsalicylsäure (ASS), Protonenpumpeninhibitor (PPI), P2Y12-Rezeptor-Antagonist (P2Y12-Inhibitor), Angiotensin-1-Rezeptorantagonist (AT1-Antagonist), Angiotensin Converting Enzyme-Hemmer (ACE-Hemmer), Calciumkanalblocker (Ca-Antagonist), Glomeruläre Filtrationsrate (GFR), C-reaktives Protein (CRP), Kreatinkinase (CK)

Hierbei zeigen sich niedrigere thrombozytäre Gremlin-1-Konzentrationen bei Patienten mit den kardiovaskulären Risikofaktoren arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie, Nikotingebrauch oder Diabetes mellitus. Patienten mit einer familiären Vorbelastung haben hingegen etwas höhere Gremlin-1-Werte. Frauen haben einen höheren Gremlin-1-Wert als Männer. Bei der Untersuchung der Begleiterkrankungen weisen Patienten mit einem Vorhofflimmern, einem vorangegangenen Myokardinfarkt, einer Koronarintervention (perkutane Koronarintervention oder Koronararterien-Bypass) in der Krankengeschichte oder einer eingeschränkten linksventrikulären Ejektionsfraktion niedrigere durchschnittliche Gremlin-1-Konzentrationen auf als Patienten ohne diese Faktoren. Bei einer Betrachtung der Aufnahmemedikation zeigen Patienten bei Einnahme fast aller Medikamente eine erhöhte Gremlin-1-Konzentration. Ausnahmen sind lediglich bei der Einnahme von Diuretika und des Herzglykosids Digitalis zu sehen. Bei einer Korrelationsuntersuchung von Alter, BMI und der Labordaten zur Konzentration von Gremlin-1 zeigen sich nur niedrige Korrelationskoeffizienten.

3.3 Verhältnis der thrombozytären Marker zueinander

Tabelle 12 beschreibt den Zusammenhang zwischen den Konzentrationen der thrombozytären Marker CD62p, PAC-1, GPVI, MIF und Gremlin-1. Alle untersuchten Marker korrelieren mit niedriger bis mittelgroßer Stärke untereinander. Die Thrombozytenaktivierungsmarker CD62p, PAC-1 und GPVI zeigen untereinander einen Zusammenhang niedriger bis mittlerer Stärke. Auch die Korrelation der Aktivierungsmarker zu Gremlin-1 und MIF ist mittelstark ausgeprägt. Einen deutlich höheren Zusammenhang zeigen die thrombozytären Konzentrationen von MIF und Gremlin-1 mit einem Spearman-Rang-Korrelationskoeffizienten von 0,667. Abbildung 9 stellt das Verhältnis zwischen dem Hauptmarker dieser Arbeit Gremlin-1 und den Markern MIF, CD62p, PAC-1 und GPVI grafisch dar.

Tabelle 12: Zusammenhang der thrombozytären Konzentrationen der Marker

	Gremlin-1	MIF	CD62p	PAC-1
MIF	0,667			
CD62p	0,318	0,393		
PAC-1	0,397	0,518	0,573	
GPVI	0,324	0,239	0,292	0,336

Angabe der Korrelation durch den Spearman-Rang-Korrelationskoeffizient. Abkürzungen: stabile Angina pectoris (SAP), akutes Koronarsyndrom (ACS), Macrophage migration inhibitory factor (MIF), P-Selektin (CD62p), Glykoprotein VI (GPVI), Procaspase-activating compound 1 (PAC-1)

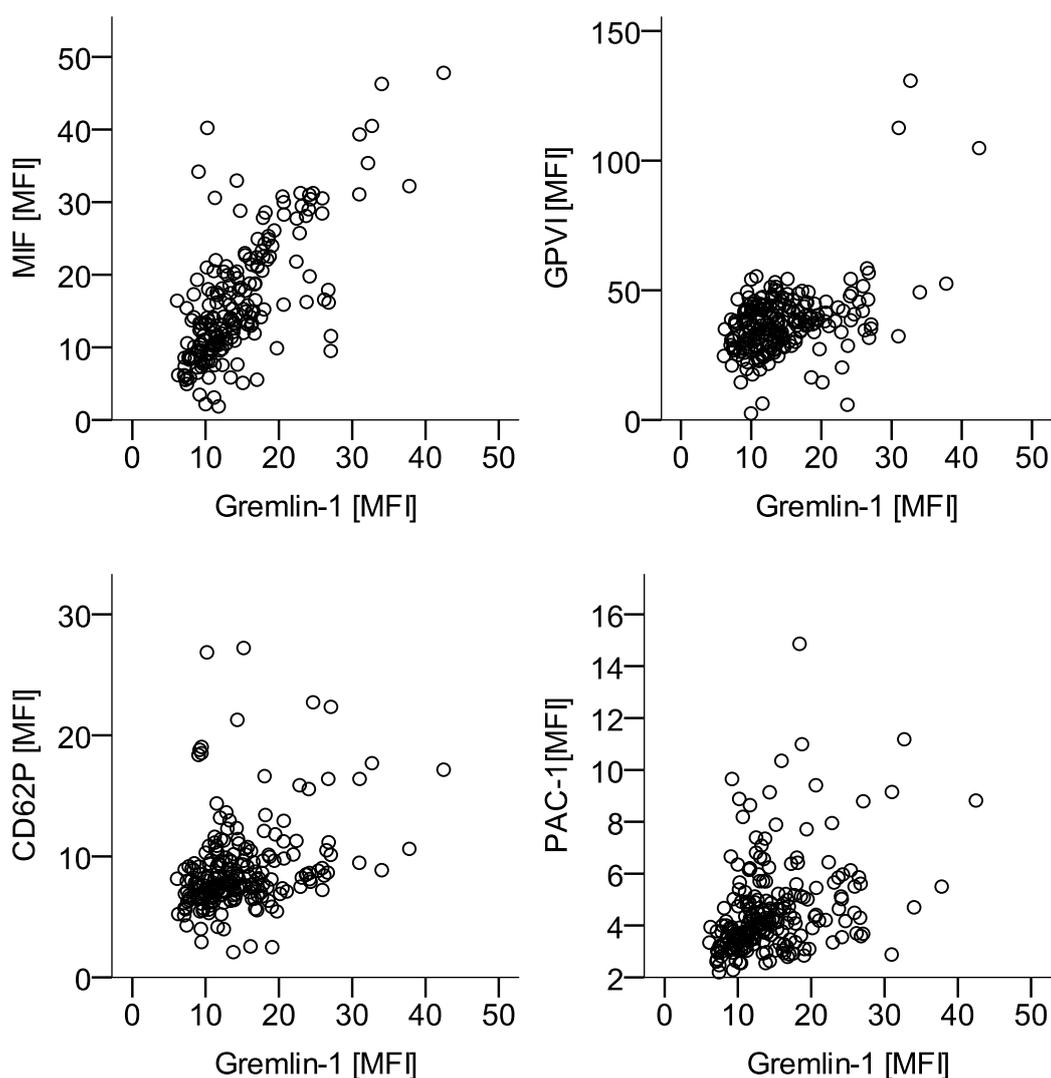


Abbildung 9: Verhältnis der thrombozytären Gremlin-1-Konzentration zu den Konzentrationen von MIF, GPVI, CD62p und PAC-1. Abkürzungen: mean fluorescence intensity (MFI), Macrophage migration inhibitory factor (MIF), Glykoprotein VI (GPVI), P-Selektin (CD62p), Procaspase-activating compound 1 (PAC-1)

3.4 Thrombozytäre Marker und Ausprägung der koronaren Herzkrankheit

Im folgenden Unterkapitel dieser Arbeit wird der Zusammenhang zwischen der klinischen Ausprägung der koronaren Herzkrankheit und den Konzentrationen der thrombozytären Marker untersucht. Aufgegliedert werden diese Messwerte anhand der Einteilung in Patienten mit einer stabilen Angina pectoris und Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom. Für den Hauptmarker dieser Doktorarbeit, Gremlin-1, und seinen Gegenspieler MIF wird

zusätzlich eine genauere Untergliederung des Ausprägungsgrades der KHK vorgenommen. Hierzu werden die Patienten in die Gruppen stabile Angina pectoris, instabile Angina pectoris, NSTEMI und STEMI aufgegliedert.

3.4.1 Die Thrombozytenaktivierungsmarker

In Abbildung 10 sind die im Thrombozyten gemessenen Konzentrationen von PAC-1, CD62p und GPVI dargestellt. Für alle Marker zeigt sich im Mittel eine höhere Konzentration bei einer stabilen Ausprägung der KHK im Gegensatz zum akuten Koronarsyndrom.

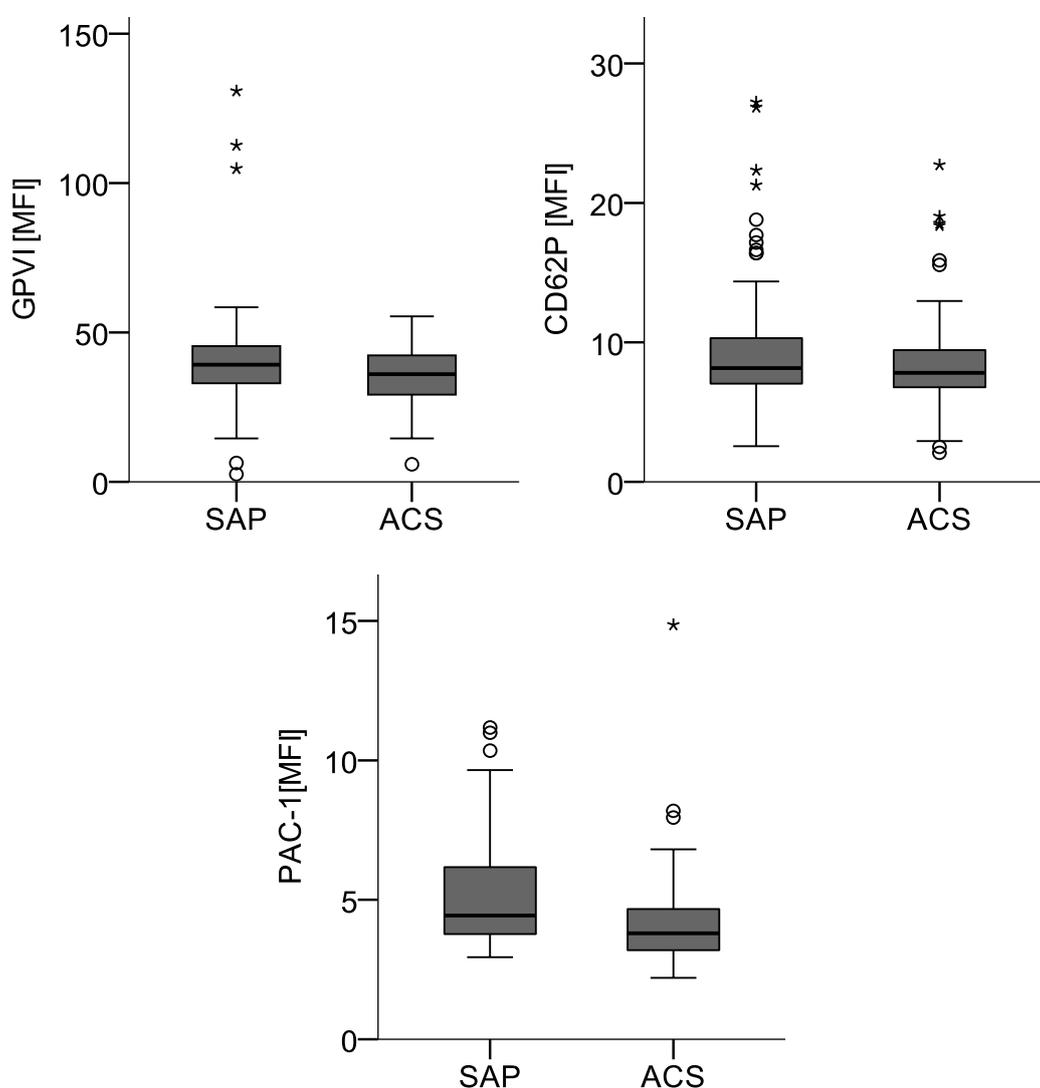


Abbildung 10: Mittlere thrombozytäre Konzentration von GPVI, CD62p und PAC-1 bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit. Abkürzungen: mean fluorescence intensity (MFI), stabile Angina pectoris (SAP), akutes Koronarsyndrom (ACS), Glykoprotein VI (GPVI), P-Selektin (CD62p), Procaspase-activating compound 1 (PAC-1)

3.4.2 Thrombozytäres Gremlin-1

In den Abbildungen 11a und 11b wird die mittlere thrombozytäre Gremlin-1-Konzentration für die einzelnen Ausprägungen der KHK dargestellt. Hierbei zeigt sich, dass Patienten mit einer stabilen Angina pectoris mit 13,7 MFI ein höheres durchschnittliches thrombozytäres Gremlin-1 besitzen als Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom (12,2 MFI). Dieser Zusammenhang ist mit $p=0,022$ statistisch signifikant [98].

Bei einer weiteren Aufgliederung des Krankheitsbildes akutes Koronarsyndrom in die Formen instabile Angina pectoris, NSTEMI und STEMI (Abb. 11b) lässt sich eine über den zunehmenden Schweregrad der KHK abfallende Gremlin-1-Konzentration beobachten. So zeigt sich ein Abfall der mittleren Gremlin-1-Konzentration von der stabilen Angina pectoris (13,7 MFI) über die instabile Angina pectoris und den NSTEMI (12,6 MFI und 12,7 MFI) zum STEMI mit einem Wert von 10,5 MFI. Die Gruppen sind hierbei mit einer statistischen Signifikanz von $p=0,013$ verschieden.

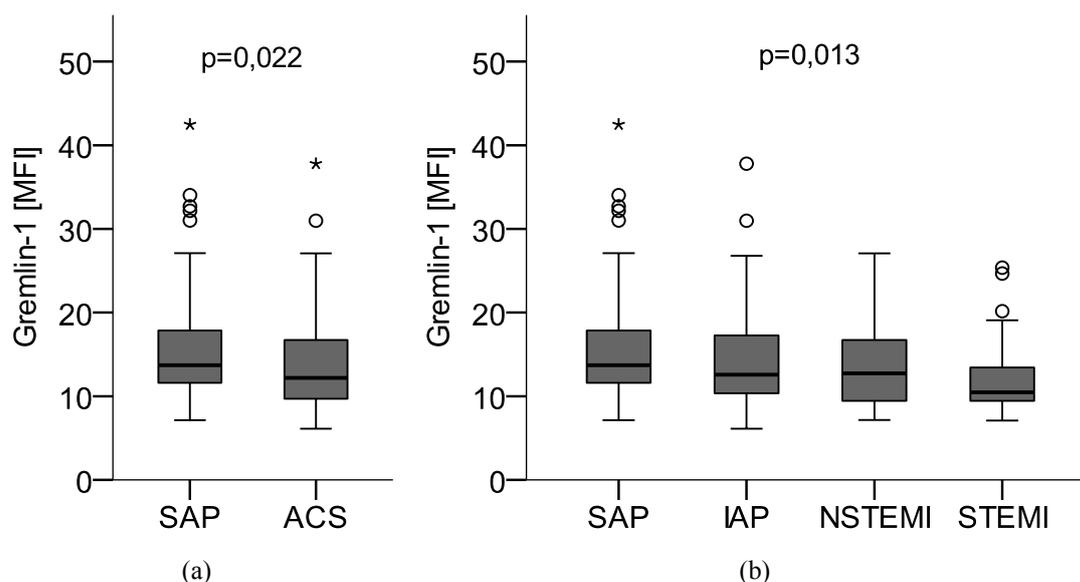


Abbildung 11: Mittlere thrombozytäre Gremlin-1-Konzentration bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit. Die statistische Signifikanz wurde mittels Mann-Whitney-U-Test (Abbildung a) und Kruskal-Wallis-Test (Abbildung b) bestimmt. Abkürzungen: mean fluorescence intensity (MFI), stabile Angina pectoris (SAP), akutes Koronarsyndrom (ACS), instabile Angina pectoris (IAP), Nicht-ST-Streckenhebungs-Myokardinfarkt (NSTEMI), ST-Streckenhebungs-Myokardinfarkt (STEMI) Abbildung a) wurde in [98] veröffentlicht.

3.4.3 Thrombozytäres MIF

Die Abbildungen 12a und 12b zeigen den Zusammenhang zwischen der mittleren thrombozytären MIF-Konzentration und dem Ausprägungsgrad der KHK. In Abbildung 12a ist nach Patienten mit stabiler Angina pectoris und Patienten mit akutem Koronarsyndrom unterteilt. Hierbei zeigt sich eine deutliche höhere MIF-Konzentration für Patienten mit einer SAP (15,9 MFI) im Vergleich zu ACS-Patienten (9,5 MFI). Bei einer feineren Aufgliederung des akuten Koronarsyndroms (Abb. 12b) ist zu sehen, dass das thrombozytäre MIF mit steigendem klinischen Schweregrad der koronaren Herzkrankheit abfällt.

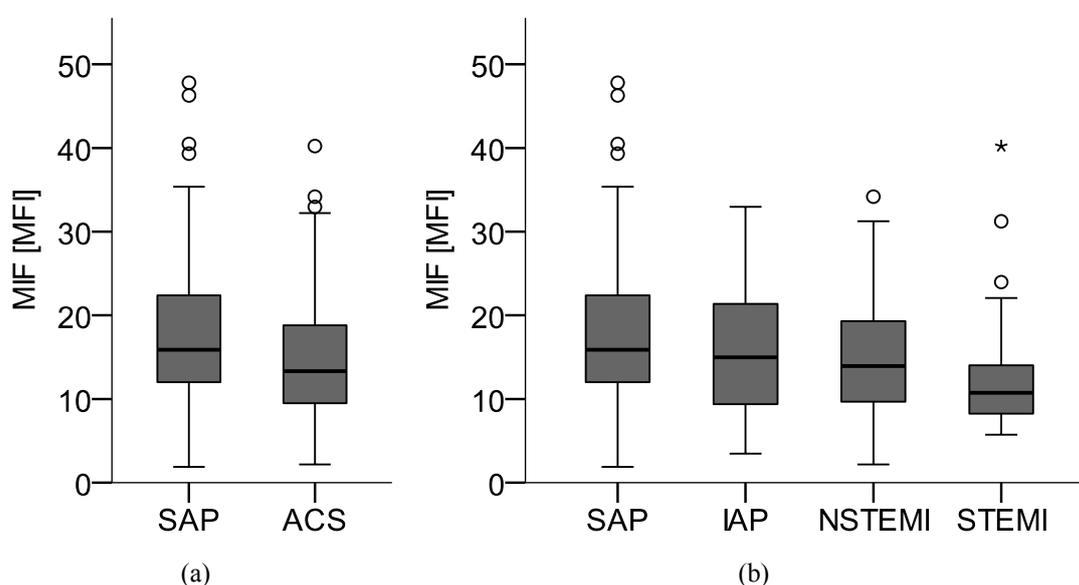


Abbildung 12: Mittlere thrombozytäre MIF-Konzentration bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit. Abkürzungen: mean fluorescence intensity (MFI), Macrophage migration inhibitory factor (MIF), stabile Angina pectoris (SAP), akutes Koronarsyndrom (ACS), instabile Angina pectoris (IAP), Nicht-ST-Streckenhebungs-Myokardinfarkt (NSTEMI), ST-Streckenhebungs-Myokardinfarkt (STEMI)

3.4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

In Tabelle 13 werden die Ergebnisse der Untersuchung über die durchschnittliche thrombozytäre Konzentration der Marker im Vergleich bei einer stabilen oder einer akuten Ausprägung der koronaren Herzkrankheit nochmals zusammengefasst dargestellt. Hierbei wird auch das Verhältnis von Gremlin-1 zu MIF berücksichtigt.

Tabelle 13: Konzentration der thrombozytären Marker in der koronaren Herzkrankheit

Thrombozytärer Marker	SAP	ACS
Gremlin-1 [MFI]	13,7 (11,6; 17,9)	12,2 (9,7; 16,7)
MIF [MFI]	15,9 (12,0; 22,4)	9,5 (13,3; 19,1)
CD62p [MFI]	8,2 (7,0; 10,4)	7,8 (6,8; 9,5)
GPVI [MFI]	39,2 (33,0; 45,5)	36,1 (29,0; 42,3)
PAC-1 [MFI]	4,4 (3,8; 6,2)	3,8 (3,2; 4,7)
Gremlin-1/MIF-Verhältnis	0,8 (0,7; 1,1)	1,0 (0,8; 1,2)

Die Werte sind angegeben als Median (25 %-Quartil; 75 %-Quartil). Abkürzungen: mean fluorescence intensity (MFI), stabile Angina pectoris (SAP), akutes Koronarsyndrom (ACS), Macrophage migration inhibitory factor (MIF), P-Selektin (CD62p), Glykoprotein VI (GPVI), Procaspase-activating compound 1 (PAC-1)

3.5 Prognostische Bedeutung der thrombozytären Gremlin-1-Konzentration

Im folgenden Abschnitt werden die Nachverfolgungen der Patienten behandelt. Es wird untersucht, ob die thrombozytäre Gremlin-1-Konzentration als Marker für eine Prognose des weiteren Krankheitsverlaufes dienen kann. Des Weiteren wird die durchschnittliche Gremlin-1-Konzentration beim Auftreten von Komplikationen untersucht.

3.5.1 Ereignisse während der Nachverfolgungsdauer

Tabelle 14 zeigt eine Übersicht der stattgefundenen Ereignisse innerhalb des Nachverfolgungszeitraumes. Die Patienten werden anhand der initialen, zum Zeitpunkt der Studienaufnahme vorliegenden, Gremlin-1-Konzentration in zwei Gruppen eingeteilt. Als Grenzwert zur Trennung der Gruppen wird hierbei der Median der Gremlin-1-Konzentrationen verwendet. In der Tabelle wird in die Zeiträume 6 Monate, 1 Jahr und die gesamte Nachverfolgungsdauer untergliedert. Die Gesamtdauer schwankt für die einzelnen Patienten. Diese zeitliche Einteilung wurde gewählt um sowohl einen kurzfristigen als auch einen langfristigen Einfluss der Gremlin-1-Werte auf die Prognose erkennen zu können.

Die Ergebnisse zeigen, dass innerhalb der ersten 6 Monate 18 Patienten (7,7 % des Patientenkollektivs) den kombinierten Endpunkt aus Schlaganfall, Stentthrombose, Myokardinfarkt und Tod erreichten. 216 Patienten (92,3 %) waren ereignisfrei. 1 Patient konnte

Tabelle 14: Ereignisse während der Nachverfolgungsdauer verglichen mit der Konzentration des thrombozytären Gremlin-1

Nachverfolgungsdauer	Total (n = 234)	Gremlin-1 ≤ Median (n = 118)	Gremlin-1 > Median (n = 116)
<u>1/2 Jahr:</u>			
kein Endpunkt	216 (92,3)	111 (51,4)	105 (48,6)
Endpunkt erreicht	18 (7,7)	7 (38,9)	11 (61,6)
Myokardinfarkt	6 (2,6)	3 (50,0)	3 (50,0)
Schlaganfall, TIA	2 (0,9)	0 (0,0)	2 (100,0)
Stentthrombose	6 (2,6)	2 (33,3)	4 (66,7)
Tod	4 (1,7)	2 (50,0)	2 (50,0)
<u>1 Jahr:</u>			
kein Endpunkt	199 (85,8)	100 (50,3)	99 (49,7)
Endpunkt erreicht	33 (14,2)	16 (48,5)	17 (51,5)
Myokardinfarkt	14 (6,0)	7 (50,0)	7 (50,0)
Schlaganfall, TIA	3 (1,3)	1 (33,3)	2 (66,7)
Stentthrombose	7 (3,0)	3 (42,9)	4 (57,1)
Tod	9 (3,8)	5 (55,6)	4 (44,4)
<u>Gesamte Dauer:</u>			
kein Endpunkt	191 (81,6)	96 (50,3)	95 (49,7)
Endpunkt erreicht	43 (18,4)	22 (51,2)	21 (48,8)
Myokardinfarkt	19 (8,1)	10 (52,6)	9 (47,4)
Schlaganfall, TIA	4 (1,7)	2 (50,0)	2 (50,0)
Stentthrombose	8 (3,4)	4 (50,0)	4 (50,0)
Tod	12 (5,1)	6 (50,0)	6 (50,0)

Untergliederung der Patienten in zwei Gruppen (initiale Gremlin-1-Konzentration \leq des Medians und initiale Gremlin-1-Konzentration $>$ Median). Die Angabe der Häufigkeiten geschieht in absoluter Häufigkeit und relativer Häufigkeit (in Prozent). Die relativen Häufigkeiten werden zeilenweise bestimmt. Abkürzungen: transitorische ischämische Attacke (TIA)

nicht erreicht werden. Führend bei der Anzahl der Endpunkte nach 6 Monaten sind die Ereignisse Myokardinfarkt und Stentthrombose. Dabei treten etwas mehr Endpunkte bei Patienten mit hohen Gremlin-1-Werten auf. Dies ist jedoch aufgrund der geringen Anzahl der vorgefallenen Ereignisse nur bedingt aussagekräftig.

Nach einem Jahr konnten noch 232 der insgesamt 235 Patienten erreicht werden. Hiervon erlitten 33 Patienten (14,0%) den kombinierten Endpunkt. Die höchste Anzahl der Endpunkte sind hierbei die Ereignisse Myokardinfarkt und Tod, gefolgt von Stentthrombosen und Schlaganfällen. Bei einer Betrachtung der Anzahl der Ereignisse in den jeweiligen Gruppen \leq und $>$ des Medians zeigen sich lediglich geringfügige Unterschiede für das Auftreten der einzelnen Ereignisse.

Eine Auswertung der aufgetretenen Ereignisse über den gesamten Nachverfolgungszeit-

raum zeigt nahezu die selben Auftretenshäufigkeiten der Ereignisse bei Patienten mit hohen Gremlin-1-Werten ($>$ Median) und niedrigen Gremlin-1-Werten (\leq Median).

3.5.2 Prognostische Bedeutung von Gremlin-1

Nachfolgend wird der Einfluss des thrombozytären Gremlin-1 auf die Prognose von Patienten mit einer bekannten KHK betrachtet. Hierbei wird die zum Studieneinschluss gemessene Gremlin-1-Konzentration in Relation zum endpunktfreien Überleben gesetzt. Als kombinierter Endpunkt werden auch hier die Ereignisse Schlaganfall/ TIA, Stentthrombose, Myokardinfarkt und Tod (kardialer und nicht-kardialer Ursache) herangezogen.

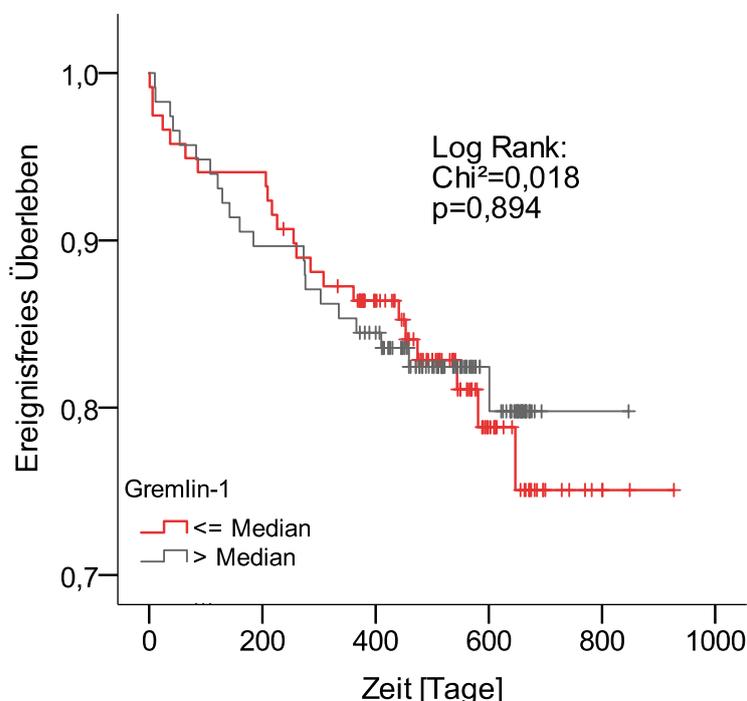
Abbildung 13a zeigt eine Kaplan-Meier-Kurve dieses ereignisfreien Überlebens, aufgeteilt nach der Höhe des Gremlin-1 unter (rote Kurve) und oberhalb des Medians (graue Kurve). Hierbei liegt die Kurve der Patienten mit einem Gremlin-1 \leq des Medians zunächst leicht unterhalb der Kurve der Patienten mit einem Gremlin-1 $>$ des Medians, das heißt, es hatten anfangs etwas mehr Patienten aus der Gruppe mit einem niedrigen Gremlin-1 einen primären Endpunkt. Nach ca. 6 Monaten liegt die Kurve etwas oberhalb und das ereignisfreie Überleben ist bei Patienten mit niedrigem Gremlin-1 besser. Im Bereich von Tag 500 sinkt sie wiederum unter die Kurve der Gruppe oberhalb des Medians. Mit dem Log-Rank-Test lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen feststellen ($p=0,894$).

In den Abbildungen 13b und 13c wird eine Aufteilung der Kaplan-Meier-Kurve nach der ursprünglichen Krankheitsausprägung bei Studienbeginn vorgenommen. Hierbei wird das ereignisfreie Überleben in Bezug zum thrombozytären Gremlin-1, getrennt für Patienten mit einer Aufnahme in die Studie aufgrund einer stabilen Angina pectoris oder aufgrund eines akuten Koronarsyndroms, analysiert. Hierdurch soll eine Beeinflussung der Prognose aufgrund einer initial schwereren Ausprägung der KHK ausgeschlossen werden.

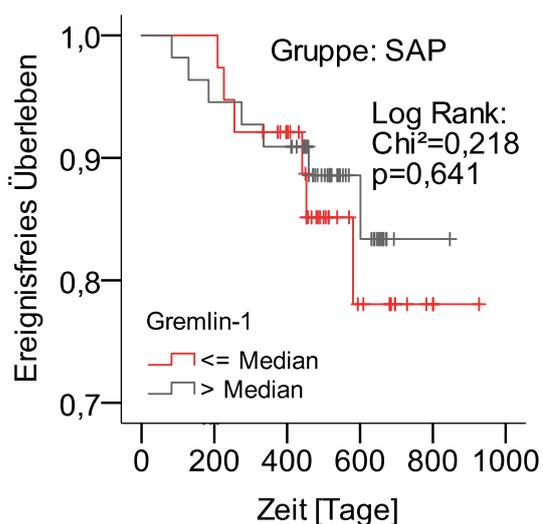
In der Gruppe der Patienten mit stabiler Angina pectoris zeigt sich bis etwa Tag 200 zunächst ein etwas besseres ereignisfreies Überleben für Patienten mit einem Gremlin-1 \leq des Medians – bei allerdings geringer Anzahl vorgefallener Endpunkte. Ab Tag 400 schneidet diese Gruppe etwas schlechter ab als Patienten mit einem Gremlin-1 $>$ des Medians.

Die Patientengruppe, welche aufgrund eines ACS aufgenommen wurde, weist bis ca. Tag 100 einen sehr ähnlichen Verlauf beider Gruppen auf. Danach zeigt die Gruppe mit einem niedrigeren Gremlin-1 ein besseres ereignisfreies Überleben. Ab Tag 600 kehrt sich dieses Verhältnis um und die Gruppe mit einem Gremlin-1 \leq des Medians zeigt ein schlechteres

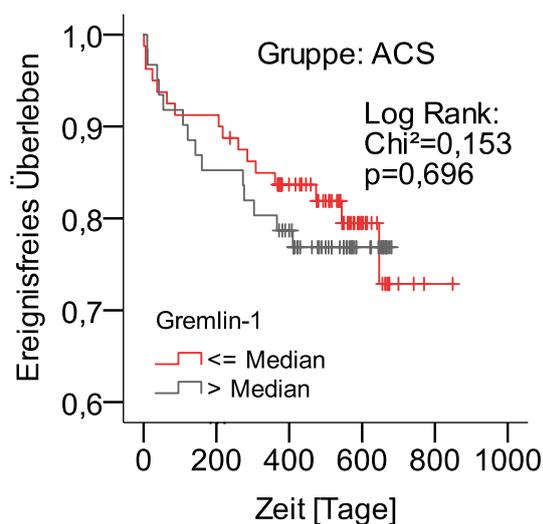
ereignisfreies Überleben. Beim Vergleich beider Abbildungen ergibt sich jedoch das Bild, dass bei Patienten mit einem niedrigen Gremlin-1 und einem ACS ein schnellerer Abfall des ereignisfreien Überlebens vorliegt als bei Patienten mit einem niedrigen Gremlin-1 und einer SAP.



(a) Ereignisfreies Überleben aller Patienten



(b) Initialereignis: SAP



(c) Initialereignis: ACS

Abbildung 13: Ereignisfreies Überleben in Abhängigkeit der initialen Gremlin-1-Konzentration. Aufteilung in Patienten mit Gremlin-1-Konzentration \leq Median (rote Kurve) und $>$ Median (graue Kurve). Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz wurde der Log-Rank-Test verwendet. Abkürzungen: stabile Angina pectoris (SAP), akutes Koronarsyndrom (ACS)

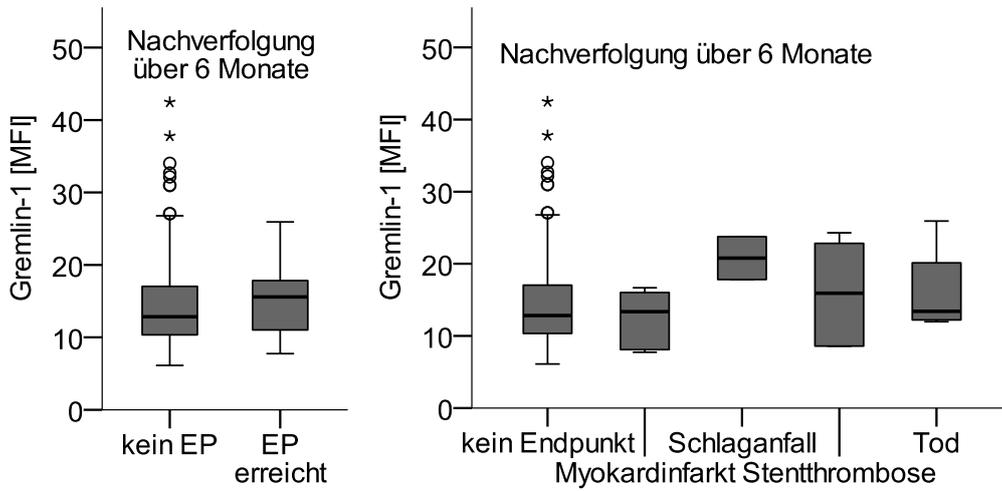
3.5.3 Thrombozytäre Gremlin-1-Konzentration bei Patienten mit Auftreten eines Endpunktes

Im folgenden Abschnitt wird untersucht, ob sich ein Zusammenhang zwischen der initialen thrombozytären Gremlin-1-Konzentration und dem Auftreten von Endpunkten während des Nachverfolgungszeitraumes zeigt. Auch für diese Untersuchung wird der Nachverfolgungszeitraum in die Abschnitte 6 Monate, 1 Jahr und die Gesamtzeit unterteilt.

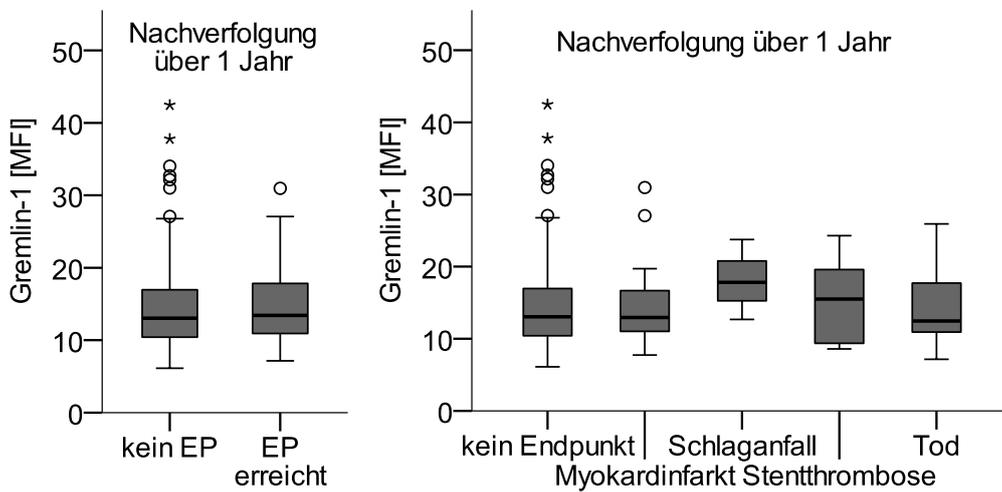
Abbildung 14a zeigt die Höhe des initialen Gremlin-1 bei Patienten mit und ohne Auftreten eines Endpunktes innerhalb der ersten 6 Monate. In Abbildung 14b wird eine feinere Aufteilung in die unterschiedlichen Endpunktarten vorgenommen. Hierbei ist zu sehen, dass die durchschnittliche Gremlin-1-Konzentration bei Patienten mit Auftreten eines Endpunktes in den ersten 6 Monaten höher ist (15,6 MFI) als bei Patienten ohne schwerwiegendes Ereignis (12,8 MFI). Die höchste Gremlin-1-Konzentration weisen hierbei Patienten mit einem Schlaganfall bzw. einer TIA auf (20,8 MFI). Patienten, welche verstarben oder eine Stentthrombose erlitten, hatten eine geringfügig niedrigere Gremlin-1-Konzentration. Patienten, welche innerhalb von 6 Monaten einen Myokardinfarkt erlitten, hatten mit durchschnittlich 13,4 MFI den niedrigsten Gremlin-1-Messwert und lagen damit niedriger als Patienten ohne primären Endpunkt.

Die Abbildungen 14c und 14d gliedern die ursprüngliche thrombozytäre Gremlin-1-Konzentration anhand der Ereignisse innerhalb des ersten Jahres auf. Auch hierbei weisen Patienten ohne primären Endpunkt ein etwas niedrigeres Gremlin-1 (13,0 MFI) als Patienten mit einem primären Endpunkt (13,4 MFI) auf (Abb. 14c). Die höchste Gremlin-1-Konzentration weisen auch in diesem Zeitraum Patienten mit einem Schlaganfall auf (17,8 MFI). Darauf folgen Patienten, welche eine Stentthrombose erlitten. Patienten mit Myokardinfarkt zeigen mit 13,0 MFI dieselbe Gremlin-1-Konzentration wie Patienten ohne primären Endpunkt. Patienten, welche innerhalb des ersten Jahres verstarben weisen mit 12,5 MFI die niedrigste Gremlin-1-Konzentration auf (Abb. 14d).

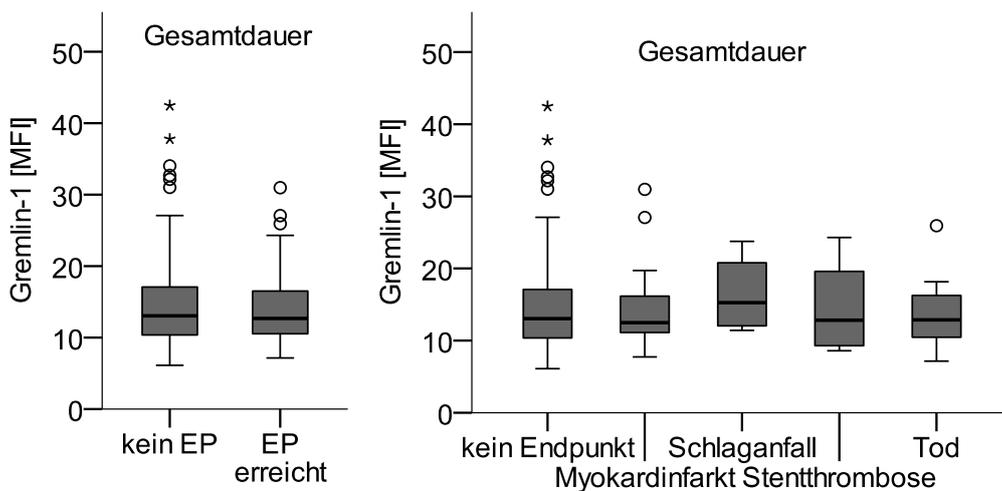
In den Abbildungen 14e und 14f wird der gesamte Nachverfolgungszeitraum betrachtet. Hierbei ist die Gremlin-1-Konzentration bei Patienten mit (12,7 MFI) und ohne Erreichen eines primären Endpunktes (13,0 MFI) ähnlich (Abb. 14e). Das höchste Gremlin-1 weisen auch in diesem Zeitraum Patienten mit Schlaganfall (15,3 MFI) auf. Am zweithöchsten liegen Patienten ohne Erreichen eines primären Endpunktes (13,0 MFI). Darauf folgen Patienten, welche verstarben (12,9 MFI) oder eine Stentthrombose erlitten (12,8 MFI). Den niedrigsten Wert zeigen mit 12,5 MFI Patienten mit einem Myokardinfarkt (siehe Abb. 14f).



(a+b) Ereignisse nach 6 Monaten



(c+d) Ereignisse nach 1 Jahr



(e+f) Ereignisse innerhalb der Gesamtdauer

Abbildung 14: Initiale Gremlin-1-Konzentration und Ereignisse bei Patienten nach 6 Monaten, einem Jahr und über die Gesamtdauer. Abkürzungen: mean fluorescence intensity (MFI), Endpunkt (EP)

3.6 Subgruppenanalyse: Patienten mit Diabetes mellitus

Als weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit werden Patienten, welche unter einem Diabetes mellitus leiden, genauer betrachtet. Wie in Kapitel 1.2.3 beschrieben wird, sind Diabetiker eine besonders gefährdete Gruppe für das Auftreten einer KHK und für thromboembolische Komplikationen. Für diese Untersuchungen wird zusätzlich zur bisher verwendeten Patientenkohorte – mit einer Messung der thrombozytären Konzentrationen – eine zusätzliche Patientenkohorte (Kohorte 2) herangezogen. Diese besitzt eine Messung der plasmatischen Gremlin-1 und MIF-Konzentration. Die Ergebnisse der plasmatischen Untersuchungen wurden bereits in [100] veröffentlicht.

Tabelle 15 zeigt eine Analyse der plasmatischen Konzentrationen von Gremlin-1 und MIF bei Patienten mit einer stabilen Angina pectoris und einem akuten Koronarsyndrom. Die mittlere Gremlin-1-Konzentration ist bei SAP-Patienten etwas höher als bei ACS-Patienten. Die MIF-Konzentration ist hingegen niedriger. Das Verhältnis von Gremlin-1 zu MIF ist bei Patienten mit einer stabilen Angina pectoris deutlich höher als bei Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom (1,8 vs. 0,8).

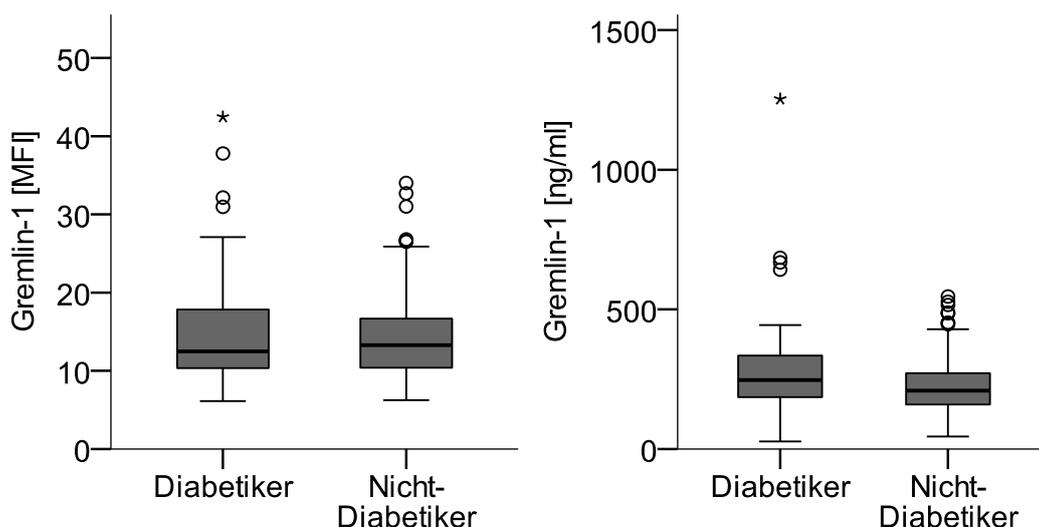
Tabelle 15: Plasmatische Marker bei Patienten mit stabiler Angina pectoris und akutem Koronarsyndrom, Kohorte 2

Plasmatischer Marker	SAP (n = 166)	ACS (n = 120)
Gremlin-1 [ng/ml]	220,2 (172,4; 293,4)	211,0 (158,6; 288,6)
MIF [ng/ml]	1,3 (0,5; 3,5)	2,9 (1,5; 5,0)
Gremlin-1/MIF-Verhältnis ¹	1,8 (0,7; 3,5)	0,8 (0,5; 1,4)

Die Werte sind angegeben als Median (25%-Quartil; 75%-Quartil). ¹ Berechnung des Gremlin/MIF-Verhältnis: (Gremlin-1[ng/ml]/100)/MIF[ng/ml]. Abkürzungen: stabile Angina pectoris (SAP), akutes Koronarsyndrom (ACS), Macrophage migration inhibitory factor (MIF). Veröffentlicht in [100].

3.6.1 Thrombozytäre und plasmatische Konzentrationen bei Diabetikern und Nichtdiabetikern

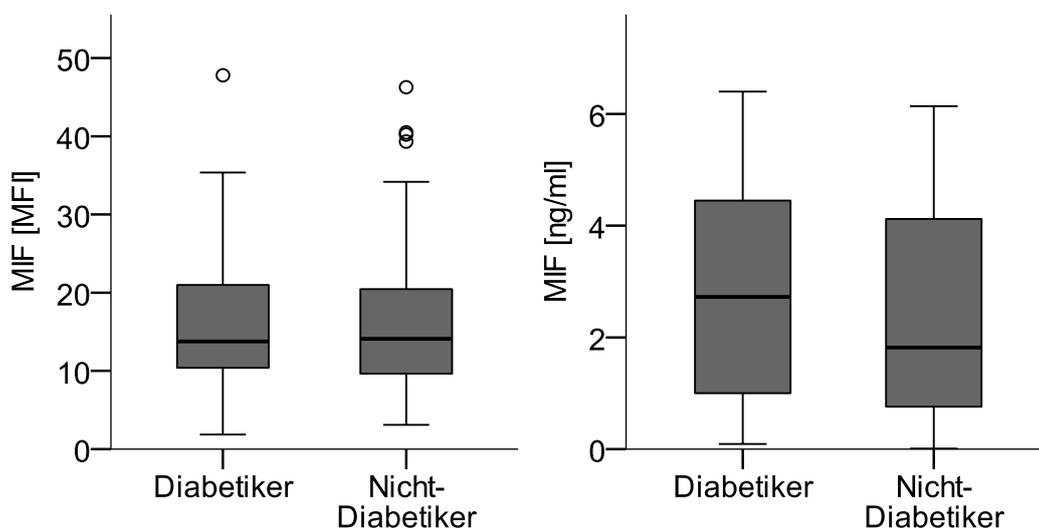
Abbildung 15 zeigt eine graphische Aufschlüsselung der thrombozytären und plasmatischen Gremlin-1-Konzentrationen bei Patienten mit und ohne Diabetes mellitus. Die mittlere thrombozytäre Gremlin-1-Konzentration ist hierbei bei Diabetikern niedriger als bei Nichtdiabetikern (12,5 MFI vs. 13,3 MFI). Es gibt jedoch eine weite Streubreite der Mess-



(a) thrombozytäre Gremlin-1-Konzentration (b) plasmatische Gremlin-1-Konzentration (veröffentlicht in [100])

Abbildung 15: Thrombozytäre und plasmatische Gremlin-1-Konzentration bei Diabetikern und Nichtdiabetikern. Abkürzungen: mean fluorescence intensity (MFI)

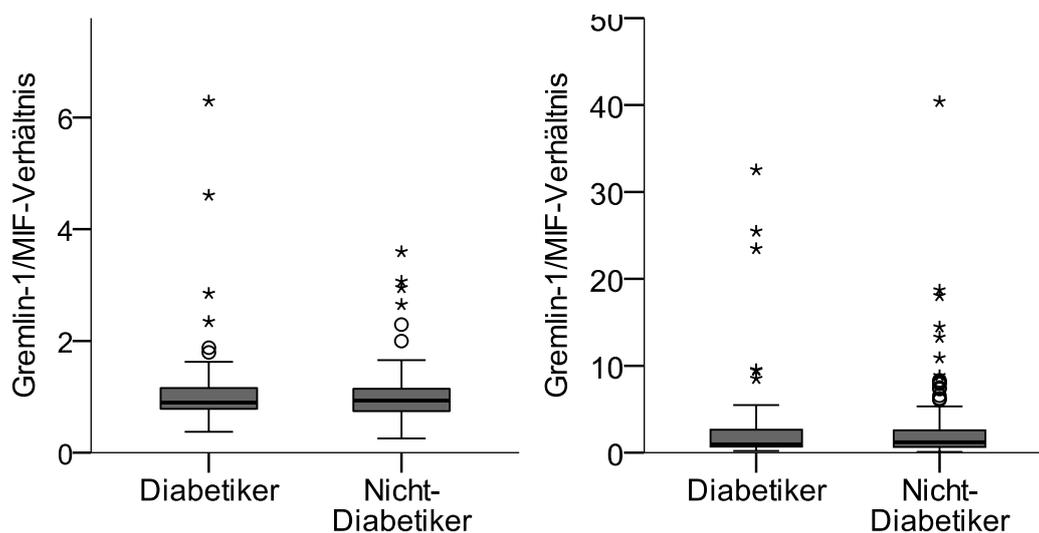
werte. Die plasmatischen Messwerte weisen hingegen eine höhere Gremlin-1-Konzentration bei Diabetikern auf (247,1 ng/ml vs. 208,7 ng/ml). Die thrombozytäre MIF-Konzentration ist bei Diabetikern ebenfalls geringfügig niedriger als bei Nichtdiabetikern (Abb. 16). Es liegt jedoch eine große Streuung der Messwerte vor. Die plasmatische MIF-Konzentration ist hingegen bei Diabetikern höher als bei Nichtdiabetikern.



(a) thrombozytäre MIF-Konzentration (b) plasmatische MIF-Konzentration (veröffentlicht in [100])

Abbildung 16: Thrombozytäre und plasmatische MIF-Konzentration bei Diabetikern und Nichtdiabetikern. Abkürzungen: Macrophage migration inhibitory factor (MIF), mean fluorescence intensity (MFI)

In Abbildung 17 werden die Konzentrationen der Marker Gremlin-1 und MIF ins Verhältnis gesetzt und dieses bei Diabetikern und Nichtdiabetikern verglichen. Hierbei zeigt sich für das thrombozytäre Gremlin-1/MIF-Verhältnis kein Unterschied zwischen Diabetikern und Nichtdiabetikern. Bei Betrachtung des plasmatischen Gremlin-1/MIF-Verhältnis ist hingegen ein niedrigerer Wert bei Diabetikern nachweisbar (1,0 vs. 1,2).



(a) thrombozytäres Gremlin-1/-MIF-Verhältnis (b) plasmatisches Gremlin-1/-MIF-Verhältnis (veröffentlicht in [100])

Abbildung 17: Thrombozytäres und plasmatisches Verhältnis von Gremlin-1 zu MIF bei Diabetikern und Nichtdiabetikern. Abb. b): Berechnung des plasmatischen Gremlin-1/MIF-Verhältnis: $(\text{Gremlin-1}[\text{ng/ml}]/100)/\text{MIF}[\text{ng/ml}]$. Es wurde aus Übersichtlichkeitsgründen ein Wert nicht dargestellt. Dieser beträgt 167 in der Gruppe der Nichtdiabetiker.

In Tabelle 16 werden die Ergebnisse der vorherigen Abbildungen in tabellarischer Form zusammengefasst. Zusätzlich werden hier auch die thrombozytären Konzentrationen der Marker CD62p, PAC-1 und GPVI aufgeführt. Die Konzentrationen der Marker PAC-1 und CD62p sind hierbei bei Diabetikern etwas höher als bei Nichtdiabetikern. Der Marker GPVI weist hingegen eine etwas niedrigere Konzentration auf.

Tabelle 16: Konzentrationen der thrombozytären und plasmatischen Marker bei Diabetikern und Nichtdiabetikern

Thrombozytärer Marker (Kohorte 1)	Nichtdiabetiker (n = 158)	Diabetiker (n = 77)
CD62p [MFI]	7,8 (6,8; 9,6)	8,2 (7,1; 10,0)
PAC-1 [MFI]	4,1 (3,4; 5,0)	4,2 (3,4; 5,5)
GPVI [MFI]	37,8 (31,0; 44,1)	36,5 (28,8; 42,7)
Gremlin-1 [MFI]	13,3 (10,4; 16,7)	12,5 (10,3; 18,2)
MIF [MFI]	14,1 (9,6; 20,5)	13,8 (10,3; 21,0)
Gremlin-1/MIF-Verhältnis ¹	0,9 (0,7; 1,1)	0,9 (0,8; 1,2)
Plasmatischer Marker (Kohorte 2)	Nichtdiabetiker (n = 198)	Diabetiker (n = 88)
Gremlin-1 [ng/ml]	208,7 (159,0; 272,4)	247,1 (185,5; 336,4)
MIF [ng/ml]	1,8 (0,8; 4,1)	2,7 (1,0; 4,5)
Gremlin-1/MIF-Verhältnis ²	1,2 (0,7; 2,6)	1,0 (0,7; 2,6)

Die Werte sind angegeben als Median (25 %-Quartil; 75 %-Quartil). Berechnung des thrombozytären Gremlin-1/MIF-Verhältnis¹: Gremlin-1[MFI]/ MIF[MFI], Berechnung des plasmatischen Gremlin-1/MIF-Verhältnis²: (Gremlin-1[ng/ml]/100)/MIF[ng/ml]. Abkürzungen: mean fluorescence intensity (MFI), P-Selektin (CD62p), Procaspace-activating compound 1 (PAC-1), Glykoprotein VI (GPVI), Macrophage migration inhibitory factor (MIF). Die plasmatischen Werte wurden bereits in [100] veröffentlicht.

3.6.2 Gremlin-1 und MIF bei Diabetikern und Nichtdiabetikern mit stabiler Angina pectoris und akutem Koronarsyndrom

Die folgenden Abbildungen zeigen eine Untersuchung der Gremlin-1 und MIF-Konzentrationen bei einer Unterteilung nach Vorliegen eines Diabetes mellitus und nach der Akuität der koronaren Herzkrankheit. Hierbei werden die Gruppen "Nichtdiabetiker mit stabiler Angina pectoris", "Diabetiker mit stabiler Angina pectoris", "Nichtdiabetiker mit akutem Koronarsyndrom" und "Diabetiker mit akutem Koronarsyndrom" unterschieden.

Die thrombozytäre Gremlin-1-Konzentration (Abb. 18a) ist hierbei bei Patienten mit einer SAP höher als bei Patienten mit einem ACS. Innerhalb dieser Gruppen gibt es lediglich geringfügige Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne Diabetes mellitus. Bei den plasmatischen Messungen zeigt sich hingegen, dass Diabetiker eine deutlich höhere Gremlin-1-Konzentration als Nichtdiabetiker aufweisen. Hier zeigt sich ein geringerer Effekt aufgrund der Ausprägung der KHK. Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom

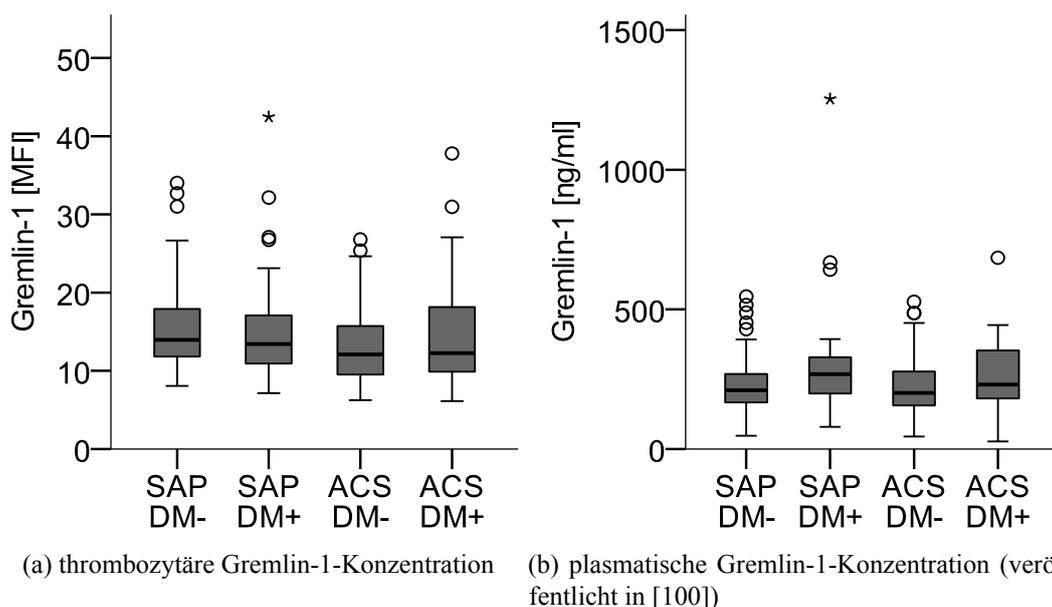


Abbildung 18: Thrombozytäres und plasmatisches Gremlin-1 bei Diabetikern und Nichtdiabetikern mit SAP und ACS. Abkürzungen: mean fluorescence intensity (MFI), stabile Angina pectoris (SAP), akutes Koronarsyndrom (ACS), Nichtdiabetiker (DM-), Diabetiker (DM+)

weisen eine geringere Gremlin-1-Konzentration auf als Patienten mit einer stabilen Angina pectoris. Die höchste Gremlin-1-Konzentration tritt bei Patienten mit einer stabilen Angina pectoris und einem Diabetes mellitus auf. Es folgen Diabetiker mit akutem Koronarsyndrom. Niedrigere Konzentrationen liegen bei Nichtdiabetikern mit stabiler Angina pectoris und die niedrigsten Werte bei Nichtdiabetikern mit akutem Koronarsyndrom vor.

Die Auswertung der thrombozytären MIF-Konzentration (Abb. 19) zeigt ein ähnliches Bild wie das des thrombozytären Gremlin-1. Auch hier ist in erster Linie ein Einfluss der Krankheitsausprägung der KHK zu sehen. Bei einer Betrachtung der plasmatischen MIF-Konzentration zeigt sich eine deutliche Beeinflussung sowohl durch die Ausprägung der KHK als auch durch das Vorliegen eines Diabetes mellitus. Hierbei haben Diabetiker eine höhere Plasmakonzentration als Nichtdiabetiker. Patienten mit einem akutem Koronarsyndrom zeigen eine höhere Konzentration als Patienten mit einer stabilen Angina pectoris.

Wird das Verhältnis zwischen den Konzentrationen von Gremlin-1 und MIF untersucht, so zeigen sich für das thrombozytäre Verhältnis der Marker nur geringe Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 20a). Diese lassen sich nicht in ein Schema anhand der Akuität der Erkrankung oder dem Vorliegen eines Diabetes mellitus einfügen. Das höchste plasmatische Gremlin-1/MIF-Verhältnis ist bei Nichtdiabetikern mit einer stabilen Angina pectoris messbar (Abb. 20b). Darauf folgen Diabetiker mit einer stabilen Angina pectoris. Niedrigere Werte liegen für Patienten mit einem akutem Koronarsyndrom vor. Hier haben Diabetiker ein etwas höheres Gremlin-1/MIF-Verhältnis als Nichtdiabetiker.

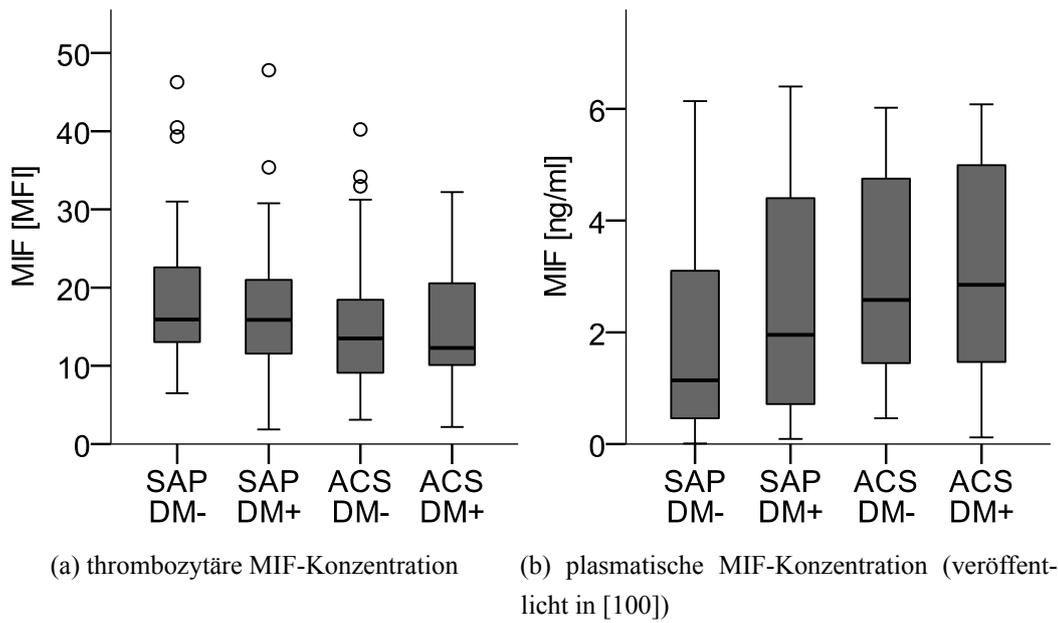


Abbildung 19: Thrombozytäres und plasmatisches MIF bei Diabetikern und Nichtdiabetikern mit SAP und ACS. Abkürzungen: mean fluorescence intensity (MFI), Macrophage migration inhibitory factor (MIF), stabile Angina pectoris (SAP), akutes Koronarsyndrom (ACS), Nichtdiabetiker (DM-), Diabetiker (DM+)

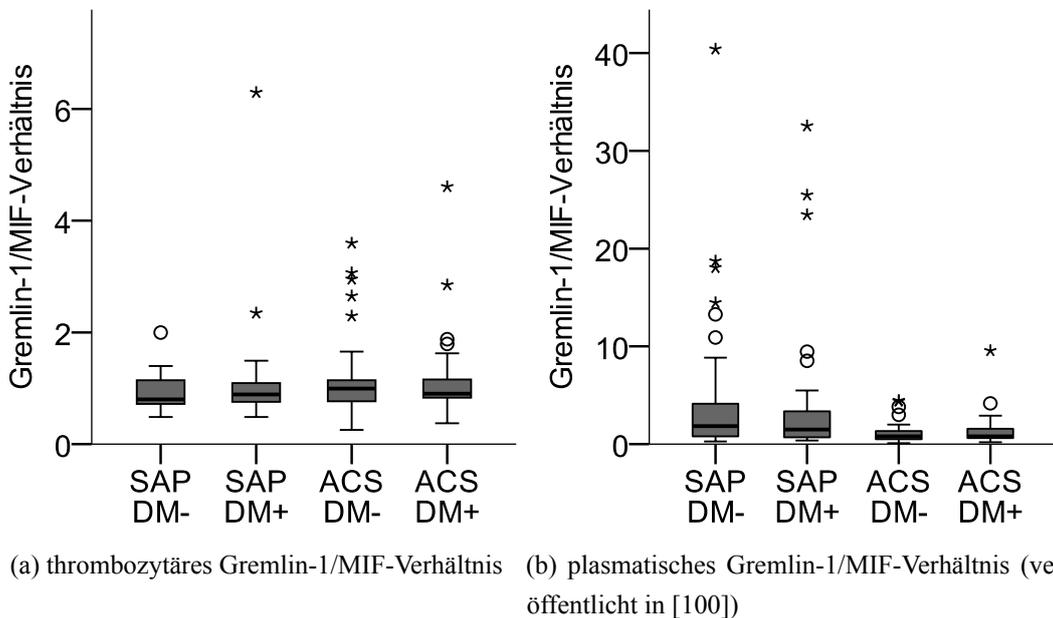


Abbildung 20: Thrombozytäres und plasmatisches Gremlin-1/MIF-Verhältnis bei Diabetikern und Nichtdiabetikern mit SAP und ACS. Abb. b): Berechnung des plasmatischen Gremlin-1/MIF-Verhältnis: $(\text{Gremlin-1}[\text{ng/ml}]/100)/\text{MIF}[\text{ng/ml}]$. Es wurde aus Übersichtlichkeitsgründen ein Wert nicht dargestellt. Dieser beträgt 167 in der Gruppe "SAP DM-". Abkürzungen: mean fluorescence intensity (MFI), Macrophage migration inhibitory factor (MIF), stabile Angina pectoris (SAP), akutes Koronarsyndrom (ACS), Nichtdiabetiker (DM-), Diabetiker (DM+)

3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Korrelation der thrombozytären Marker:

- Bei einer Thrombozyten-Aktivierung sind die Marker Gremlin-1 und MIF erhöht.
- Die Konzentrationen der thrombozytären Marker Gremlin-1 und MIF zeigen eine ausgeprägte Korrelation.

Klinische Bedeutung der thrombozytären Marker-Konzentrationen:

- Das thrombozytäre Gremlin-1 ist bei Vorliegen verschiedener kardiovaskulärer Risikofaktoren erniedrigt, bei Einnahme einer kardioprotektiven Medikation erhöht.
- Patienten mit einer SAP zeigen eine signifikant höhere thrombozytäre Gremlin-1-Konzentration als Patienten mit einem ACS.
- Je höher der klinische Ausprägungsgrad der KHK ist, umso niedriger ist das thrombozytäre Gremlin-1. Dies gilt auch für die Konzentration des thrombozytären MIF.
- Eine klinische Relevanz des thrombozytären Gremlin-1/MIF-Verhältnis kann bei diesem Patientenkollektiv nicht dargestellt werden.

Prognostische Bedeutung der thrombozytären Gremlin-1-Konzentration:

- Eine prognostische Relevanz für die thrombozytären Messwerte von Gremlin-1 kann nicht nachgewiesen werden.

Einfluss eines Diabetes mellitus auf die Gremlin-1- und MIF-Konzentrationen:

- Diabetiker besitzen höhere plasmatische Gremlin-1-Konzentrationen als Nichtdiabetiker, jedoch etwas erniedrigte thrombozytäre Konzentrationen. Ebenso besitzen sie etwas erhöhte plasmatische MIF-Konzentrationen.
- Bei einer Untergliederung anhand eines Diabetes mellitus und anhand der KHK-Ausprägung haben Diabetiker höhere plasmatische Gremlin-1-Konzentrationen als Nichtdiabetiker mit einer SAP/ einem ACS. Auf die thrombozytären Konzentrationen hat das Vorliegen eines Diabetes mellitus lediglich minimale Auswirkungen.
- Diabetiker besitzen eine höhere plasmatische MIF-Konzentration als Nichtdiabetiker sowie höhere Konzentrationen bei einem ACS im Vergleich zur SAP. Bei den thrombozytären Messwerten zeigt sich lediglich der Effekt zwischen SAP- und ACS-Patienten. Unterschiede aufgrund eines Diabetes sind allenfalls gering.
- Bei Betrachtung des thrombozytären Gremlin-1/MIF-Verhältnis zeigen sich lediglich geringfügige Unterschiede zwischen den Gruppen. Das plasmatische Gremlin-1/MIF-Verhältnis ist hingegen bei Diabetikern erhöht gegenüber Nichtdiabetikern.

Kapitel 4 Diskussion

4.1 Betrachtung der Patientenkohorten

4.1.1 Patientencharakteristika bei Kohorte 1

In Tabelle 7 werden die demographischen Daten, kardiovaskulären Risikofaktoren, Begleiterkrankungen sowie die Medikation zum Aufnahmezeitpunkt und laborchemische Messwerte aufgeführt. Es zeigt sich, dass einige Patienten an einem oder mehreren Risikofaktoren für eine koronare Herzkrankheit leiden. Die Betrachtung der Aufnahmemedikation zeigt, dass Patienten mit einer stabilen Angina pectoris häufiger antithrombozytär vorbehandelt waren, sowie häufiger Betablocker, Statine und Aldosteron-Antagonisten erhielten. Dies ist nicht verwunderlich, da diese Patienten geplant zur Durchführung einer perkutanen Koronarintervention in das Krankenhaus eingewiesen wurden und somit eine bereits vorbekannte diagnostizierte KHK hatten. Diese erfordert eine begleitende konservative Therapie. Bei den Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom liegen häufiger Erstereignisse oder eine zuvor unbehandelte koronare Herzkrankheit vor. Bei den laborchemischen Messwerten zeigen Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom eine höhere Leukozytenanzahl. Die Marker für einen Myokardschaden bzw. Muskelschaden allgemein sind – wie zu erwarten – bei Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom erhöht.

Bei einem Vergleich von Diabetikern und Nichtdiabetikern (Tabelle 8) sind Diabetiker im Durchschnitt älter und leiden häufiger an kardiovaskulären Risikofaktoren wie einer arteriellen Hypertonie oder einer Hyperlipidämie. Sie weisen häufiger ein Vorhofflimmern oder einen Myokardinfarkt in der Krankenvorgeschichte auf. Sie haben eine niedrigere linksventrikuläre Ejektionsfraktion und sind somit häufiger herzinsuffizient. Auch das Vorliegen einer Niereninsuffizienz ist erhöht. Sie werden häufiger medikamentös vorbehandelt als Nichtdiabetiker und weisen erhöhte Entzündungswerte auf. Zusammenfassend sind Diabetiker dieser Kohorte im Schnitt älter und kränker als die Nichtdiabetiker.

4.1.2 Patientencharakteristika bei Kohorte 2

In Tabelle 9 erfolgt eine Betrachtung der Vergleichskohorte (Kohorte 2) mit Messung der plasmatischen Gremlin-1 und MIF-Konzentrationen. In dieser Kohorte sind Patienten, welche aufgrund eines ACS in die Klinik aufgenommen wurden, im Durchschnitt älter und häufiger männlich als SAP-Patienten. Sie weisen mehr kardiovaskuläre Risikofaktoren wie eine arterielle Hypertonie, eine Hyperlipidämie oder einen Nikotinabusus auf. Sie hatten ebenfalls bereits häufiger einen Myokardinfarkt erlitten. Sie leiden jedoch seltener an einer Nierensinsuffizienz oder einer eingeschränkten linksventrikulären Ejektionsfraktion. Vergleichend gibt es zwischen den beiden Kohorten Unterschiede. Insbesondere beim Durchschnittsalter und im Vorliegen von kardiovaskulären Risikofaktoren bei SAP- und ACS-Patienten sind die Kohorten verschieden.

Bei einer Untersuchung von Diabetikern und Nichtdiabetikern in Kohorte 2 weisen Diabetiker ein höheres Durchschnittsalter und häufiger kardiovaskuläre Risikofaktoren wie eine arterielle Hypertonie, eine Hyperlipidämie oder einen Nikotinkonsum auf. Sie leiden häufiger an einer Niereninsuffizienz oder hatten bereits einen Myokardinfarkt erlitten. Des Weiteren haben sie eine höhere Medikation als Nichtdiabetiker. Dies ist vergleichbar mit der Untersuchung der Diabetiker und Nichtdiabetiker in Kohorte 1.

4.2 Einfluss der Patientencharakteristika auf die thrombozytäre Gremlin-1-Konzentration

In Abschnitt 3.2 wird die Abhängigkeit zwischen den Patientencharakteristika und der thrombozytären Gremlin-1-Konzentration betrachtet. Hier zeigen sich niedrigere durchschnittliche Gremlin-1-Konzentrationen bei Patienten mit den kardiovaskulären Risikofaktoren arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie, Nikotinabusus und Diabetes mellitus. Dies könnte die These bekräftigen, dass Gremlin-1 als Schutzfaktor wirkt, welcher die Gefahr eines kardiovaskulären Ereignisses senkt. Bei einem Vorliegen von vielen kardiovaskulären Risikofaktoren, und damit einer hohen Gefahr für das Auftreten eines ACS, wäre somit eine niedrigere Gremlin-1-Konzentration und dadurch auch ein niedrigerer Schutz gegeben. Es stellt sich daher die Frage, ob die kardiovaskulären Risikofaktoren unabhängige Einflussfaktoren auf die thrombozytäre Gremlin-1-Konzentration sind oder gar die thrombozytäre Gremlin-1-Konzentration an der Entstehung und Förderung der Risikofaktoren beteiligt sein könnte.

Der gegenläufige Effekt zeigt sich bei einer Betrachtung der Vormedikation. Es zeigen sich erhöhte Gremlin-1-Konzentrationen bei Einnahme nahezu aller Medikamentengruppen. Dies könnte ein Hinweis auf die schützende Funktion der verabreichten Medikamente sein. Bisher wurde noch nie untersucht ob die Gremlin-Konzentration durch verschiedene Medikamente beeinflusst wird. Es kann sich jedoch ebenfalls um einen Bias handeln. In der untersuchten Kohorte weisen Patienten mit einer stabilen Angina pectoris eine höhere Vormedikation auf als ACS-Patienten (siehe Tab. 7). Zugleich wird in Abschnitt 3.4.2 nachgewiesen, dass Patienten mit einer stabilen Angina pectoris eine höhere Gremlin-1-Konzentration besitzen als ACS-Patienten (Abb. 11a, Tab. 13). Daher kann diese beobachtete Beeinflussung der Gremlin-1-Konzentration durch die Einnahme von Medikamenten möglicherweise ein Scheineffekt sein, welcher durch die Beeinflussung der Gremlin-Konzentration durch die Akuität der Erkrankung (SAP oder ACS) hervorgerufen wird. Die Fragestellung, ob die Einnahme verschiedener Medikamente einen Einfluss auf die thrombozytäre Gremlin-1-Konzentration hat oder es sich lediglich um einen Bias handelt, müsste daher in weiteren Untersuchungen betrachtet werden.

4.3 Verhältnis der thrombozytären Marker zueinander

In Tabelle 12 wird der Zusammenhang zwischen den Konzentrationen der für diese Studie ausgewählten thrombozytären Marker untersucht. Abbildung 9 stellt die Korrelation von Gremlin-1 mit den Markern MIF, GPVI, CD62p und PAC-1 graphisch dar.

Es wird für alle untersuchten thrombozytären Marker ein Zusammenhang untereinander von schwacher bis mittelhoher Stärke nachgewiesen. Die thrombozytären Adhäsionsrezeptoren CD62p, GPVI und der GP2b3a-Rezeptor (gemessen durch PAC-1) sind als Aktivierungsmarker von Thrombozyten vorbeschrieben [39,46]. Der Nachweis einer erhöhten Konzentration zeigt an, dass vermehrt Thrombozyten aktiviert wurden. Die positive Korrelation zur Gremlin-1- und MIF-Konzentration zeigt somit, dass auch diese Marker im Rahmen einer thrombozytären Aktivierung vermehrt vorhanden sind. Dies lässt sich sehr gut mit den in der Literatur beschriebenen Effekten von Gremlin-1 und MIF als Teilnehmer an der Inflammationsreaktion vereinbaren [59, 61, 90].

Eine Sonderstellung bei dieser Untersuchung nehmen Gremlin-1 und MIF ein. Diese weisen mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,7 eine für Blutmarker sehr hohe Korrelation auf. Dies lässt sich gut mit der in der Literatur vorbeschriebenen Interaktion beider Marker [90] vereinigen und weist ihr enges Zusammenspiel zum ersten Mal im Thrombozyten nach.

4.4 Thrombozytäre Aktivierungsmarker und klinisches Erscheinungsbild

In Abschnitt 3.4.1 wird gezeigt, dass die Konzentration der thrombozytären Marker GPVI, CD62p, und PAC-1 eine Abhängigkeit zum Ausprägungsgrad der KHK aufweisen. Patienten mit einer stabilen Angina pectoris besitzen im Mittel eine höhere Konzentration dieser Marker als Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom. Dieses Ergebnis ist zunächst überraschend. Nach der Literaturrecherche ist ein gegenteiliges Ergebnis mit höheren Konzentrationen bei ACS-Patienten zu erwarten. So wurde bei ACS-Patienten eine signifikant höhere GPVI- und CD62p-Konzentration beschrieben als bei Patienten mit einer stabilen Angina pectoris [46]. Für die Konzentration von PAC-1 ist ebenfalls ein gegenläufiges Ergebnis beschrieben [101].

Eine Erklärung dieser Unterschiede ist durch andere Ein- und Ausschlusskriterien, eine andere Vormedikation sowie durch eine Blutentnahme zu einem anderen Zeitpunkt denkbar. Bei der Medikation verhindern insbesondere antithrombozytäre Substanzen eine Aktivierung der Thrombozyten. Dies kann sich daher auf die thrombozytären Konzentrationen der gemessenen Marker auswirken. Der Zeitpunkt der Blutentnahme ist ebenfalls als Grund für die gefundenen Unterschiede denkbar. So weisen die meisten Akteure im Rahmen der Inflammation, der Aktivierung oder der Gerinnung keine statischen Konzentrationen auf, sondern stehen in einem dynamischen Verhältnis. Auch ein Verbrauch der aktivierten Thrombozyten im Verlauf des akuten Ereignisses und eine dadurch bedingte niedrigere Konzentration der Marker bei ACS-Patienten ist denkbar.

4.5 Klinische Bedeutung der Gremlin-1-Konzentration

Die Konzentration des thrombozytären Gremlin-1 korreliert mit der Konzentration der Thrombozyten-Aktivierungsmarker GPVI, CD62p und PAC-1 (siehe Abschnitt 3.3). Dies legt die Vermutung nahe, dass durch eine Aktivierung der Thrombozyten auch die Gremlin-1-Exprimierung angeregt wird.

Bei einer Untersuchung des thrombozytären Gremlin-1 in Abhängigkeit der Ausprägung der KHK zeigt sich ein signifikant höheres Gremlin-1 bei einer stabilen Angina pectoris als bei einem akuten Koronarsyndrom (Mann-Whitney-U-Test: $p = 0,022$, veröffentlicht in [98]). Bei einer näheren Untergliederung lässt sich ein Trend erkennen. Die Gremlin-1-Konzentration nimmt mit zunehmendem Schweregrad der KHK ab. Dieser Zusammen-

hang lässt sich anhand des Kruskal-Wallis-Tests mit einem Signifikanzniveau von $p = 0,013$ bestätigen. Dies ist gut vereinbar mit der Sicht von Gremlin-1 als Schutzfaktor im Rahmen der Atherosklerose und KHK. Vorangegangene Studien zeigten, dass Gremlin-1 ein direkter Inhibitor des MIF ist, welcher als proinflammatorischer Marker die Gefahr einer Plaqueruptur erhöhen kann [90]. In seiner Funktion als Gegenspieler würde eine hohe Gremlin-1-Konzentration die Wirkung des MIF neutralisieren.

Interessant ist in Anbetracht dieser Messwerte ebenfalls, dass Gremlin-1 nicht nur auf und in den Thrombozyten gespeichert bzw. exprimiert wird, sondern auch ins Blutplasma sezerniert werden kann [98]. Somit wird insbesondere die Frage nach dem Zeitpunkt der thrombozytären Messung relevant. Möglicherweise kann bereits ein Teil des Gremlin-1 sezerniert worden sein und daher der Messwert im Thrombozyten niedrig sein.

4.6 Klinische Bedeutung der MIF-Konzentration

In Abschnitt 3.4.3 wird der Zusammenhang der thrombozytären MIF-Konzentration mit dem klinischen Ausprägungsgrad der koronaren Herzkrankheit untersucht. Hierbei wird eine abfallende MIF-Konzentration mit zunehmendem Schweregrad der KHK gemessen. Dies ist zunächst verwunderlich. Im Rahmen eines akuten Koronarsyndroms erfolgt eine Aktivierung der Thrombozyten. Es wäre daher wahrscheinlich, dass in diesem Rahmen auch die Konzentrationen der Thrombozyten-Aktivierungsmarker sowie von MIF erhöht sind. Jedoch zeigte auch die Messung der Thrombozytenaktivierungsmarker niedrigere Konzentrationen bei Patienten mit einem ACS als bei SAP-Patienten. Das Ergebnis der MIF-Konzentration ist somit zu diesen Ergebnissen kongruent.

Ein möglicher Erklärungsansatz ist, dass aktivierte Thrombozyten im Verlauf des akuten Ereignisses (IAP, NSTEMI oder STEMI) verbraucht werden und daher auch die auf diesen befindlichen Marker nur niedrigere Konzentrationen zeigen. In vorangegangenen Studien wurde eine erhöhte plasmatische MIF-Konzentration bei Patienten mit koronarischemischen Ereignissen gefunden [64, 65]. Die Konzentrationen im Blutplasma und im Thrombozyten sind jedoch nicht direkt vergleichbar. Eine weitere Erklärung für eine abfallende MIF-Konzentration mit zunehmendem Schweregrad der KHK könnte in der Sezernierung von MIF durch die Thrombozyten liegen. Dies würde die thrombozytäre MIF-Konzentration verringern und die plasmatische MIF-Konzentration erhöhen. Des Weiteren wurde für MIF eine zirkadiane Rhythmik nachgewiesen [102].

4.7 Gremlin-1 im Vergleich mit MIF

Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit ist, ob das Verhältnis der Konzentrationen von Gremlin-1 und MIF einen Einfluss auf den klinischen Ausprägungsgrad der KHK hat. Von Müller et al. wurde diese Frage bereits für die Konzentrationen der Marker im Blutplasma untersucht. Dabei zeigte sich, dass weniger die absoluten plasmatischen Konzentrationen von Gremlin-1 und MIF, jedoch das Verhältnis der Konzentrationen beider Marker zueinander, einen Einfluss auf das klinische Erscheinungsbild der Patienten hat [91]. In unserer Studie wird nun erstmals das Gremlin-1/MIF-Verhältnis in der auf Thrombozyten exprimierten und im Thrombozyten gespeicherten Form untersucht.

Hierbei zeigt sich, dass das thrombozytäre Gremlin-1/MIF-Verhältnis nur schwach mit der Akuität der KHK korreliert (siehe Tabelle 13). Es stellt sich jedoch auch hier die Frage nach dem Einfluss des Messzeitpunktes. Da beide Marker von Thrombozyten sezerniert werden können, könnte sich deren thrombozytäre Konzentration im Laufe eines akuten Ereignisses stark verändern. Da in dieser Studie nur eine einmalige Messung beider Marker durchgeführt wurde, lässt sich keine Aussage über eine Dynamik des thrombozytären Gremlin-1/MIF-Verhältnis treffen.

4.8 Prognostische Bedeutung der thrombozytären Gremlin-1-Konzentration

Ein zusätzlicher Schwerpunkt dieser Arbeit ist die Frage nach der prognostischen Bedeutung der thrombozytären Gremlin-1-Konzentration. Wie in Kapitel 3.5 gezeigt wird, lässt sich ein Einfluss der thrombozytären Gremlin-1-Konzentration auf die weitere Prognose bei KHK-Patienten in dieser Kohorte nicht nachweisen. Es gibt keinen auffälligen Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Ereignisse Myokardinfarkt, Stentthrombose, Schlaganfall/ TIA und Tod und der initialen thrombozytären Gremlin-1-Konzentration (Tab. 14 und Abb. 13a). Dies deutet darauf hin, dass eine einmalige Messung der thrombozytären Gremlin-1-Konzentration nicht als Prognosemarker zur Vorhersage für das Risiko auftretender Ereignisse geeignet ist. Es muss hierbei jedoch der Trennwert zur Unterscheidung der Gruppen kritisch betrachtet werden. In dieser Arbeit wurden die Patienten anhand des Medians der Gremlin-1-Konzentrationen in zwei Gruppen eingeteilt. Eine Gruppe beinhaltet die Patienten mit einer initialen Gremlin-1-Konzentration \leq des Medians aller Gremlin-1-Konzentrationen, die zweite Gruppe alle Patienten mit einer Konzentration $>$

des Medians. Der Median der Werte wurde hierbei als Trennwert – mangels vorbeschriebener Kenngrößen – willkürlich festgesetzt. Möglicherweise wäre eine andere Trennung der Gruppen in der Prognosefähigkeit überlegen. Insbesondere bei einer starken Ballung von Messwerten im Bereich des Medians oder bei nahe zusammenliegenden mittleren Konzentrationen der Gruppen, kann eine Unterteilung anhand des Medians möglicherweise nicht optimal sein.

Außerdem wurde die initiale Gremlin-1-Konzentration bei Patienten mit Auftreten eines Endpunktes untersucht (Abschnitt 3.5.3, Abb. 14). Hierbei sind die initialen Gremlin-1-Konzentrationen bei Auftreten der unterschiedlichen Ereignisse leicht verschieden, gleichen sich jedoch im Verlauf des Nachverfolgungszeitraumes zunehmend an. Insbesondere Patienten, welche später einen Schlaganfall erlitten, hatten eine höhere initiale Gremlin-1-Konzentration. Jedoch liegen hier nur sehr wenige aufgetretene Ereignisse zugrunde. Daher lässt sich im Rahmen dieser Arbeit nicht aus der initialen Gremlin-1-Konzentration auf das Auftreten spezieller kardiovaskulärer Komplikationen in der Zukunft schließen. Hierzu sind noch weitere Untersuchungen notwendig.

4.9 Subgruppenanalyse: Patienten mit Diabetes mellitus

Wie in Kapitel 1.2.3 beschrieben, ist die koronare Herzkrankheit eine häufig auftretende Krankheit bei Patienten mit einem Diabetes mellitus. Es ist beschrieben, dass Gremlin-1 und MIF bei Patienten mit einem Diabetes mellitus vermehrt in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden [93–96]. Patienten mit einer erhöhten MIF-Plasmakonzentration und einem Diabetes mellitus Typ 2 haben eine erhöhte Gefahr für kardiovaskuläre Ereignisse [97]. Daher sind Diabetiker als Patientengruppe für die weitere Untersuchung des Einflusses von Gremlin-1 und MIF auf den Verlauf einer KHK besonders interessant.

Für diese Subgruppenanalyse wird zusätzlich zu der Hauptkohorte dieser Arbeit eine zweite Patientenkohorte verwendet. Diese Kohorte besitzt eine Messung der Plasmakonzentrationen von Gremlin-1 und MIF. Zunächst werden in Abschnitt 3.6 dieser Arbeit die plasmatischen Gremlin-1- und MIF-Konzentrationen getrennt für SAP- und ACS-Patienten (ohne Berücksichtigung eines Diabetes mellitus) betrachtet. Hierbei zeigen sich deutliche Unterschiede in den gemessenen Konzentrationen. Patienten mit einer SAP haben im Mittel deutlich höhere plasmatische Gremlin-1-Konzentrationen und deutlich niedrigere MIF-Konzentrationen als Patienten mit einem ACS. Bei einer Berechnung des Gremlin-1/MIF-Verhältnisses ist dies bei Patienten mit einer SAP höher als bei Patienten mit einem ACS. Dies wurde in vorherigen Arbeiten bereits beschrieben [91] und als ein weiterer Hin-

weis auf eine mögliche Schutzfunktion von Gremlin-1 im Verlauf einer KHK gewertet.

Zur Untersuchung des Einflusses eines Diabetes mellitus auf die Konzentrationen der Marker wurden die beiden Patientenkollektive in die Gruppen Diabetiker und Nichtdiabetiker aufgeteilt. In Kapitel 3.6.1 erfolgt für diese beiden Gruppen eine Untersuchung der thrombozytären und plasmatischen Konzentrationen der untersuchten Marker. Hierbei zeigen sich nur geringfügige Unterschiede in den thrombozytären Konzentrationen von CD62p, PAC-1, GPVI, Gremlin-1 und MIF zwischen Diabetikern und Nichtdiabetikern. Es gibt jedoch einen deutlichen Unterschied des plasmatischen Gremlin-1 mit einer erhöhten Konzentration bei Diabetikern. Dies deckt sich mit den bereits in der Literatur beschriebenen Ergebnissen [93, 94]. Die mittlere plasmatische MIF-Konzentration ist bei Diabetikern ebenfalls höher als bei Nichtdiabetikern, eine Betrachtung der 25- und 75 %-Quartile zeigt jedoch eine ähnliche Spannbreite bei beiden Gruppen. Auch eine Erhöhung des MIF ist aufgrund der vermehrten Inflammation bei Diabetikern und der Wirkung von MIF als proinflammatorischer Marker plausibel.

Es folgt eine Betrachtung der Konzentrationen nicht nur anhand der Untergliederung in Diabetiker und Nichtdiabetiker, sondern zusätzlich unter Berücksichtigung der zum Studienbeginn vorliegenden Akuität der koronaren Herzkrankheit. Bei einer Betrachtung der thrombozytären Gremlin-1-Konzentration zeigt sich in erster Linie eine Beeinflussung der Konzentration durch die Akuität der KHK. Eine zusätzliche Beeinflussung durch das Vorliegen eines Diabetes mellitus kann nicht beobachtet werden. Bei den plasmatischen Gremlin-1-Konzentrationen zeigt sich im Gegensatz hierzu eine Beeinflussung sowohl durch den Ausprägungsgrad der KHK als auch durch das Vorliegen eines Diabetes mellitus. Diabetiker zeigen im Mittel deutlich höhere Gremlin-1-Konzentrationen als Nichtdiabetiker. Im Vergleich haben Patienten mit einer SAP eine höhere Gremlin-1-Konzentration als ACS-Patienten. Dieser Effekt ist jedoch weniger stark ausgeprägt als der Effekt durch das Vorliegen eines Diabetes mellitus.

Die thrombozytäre MIF-Konzentration (Abb. 19) zeigt – vergleichbar zur thrombozytären Gremlin-1-Konzentration – in erster Linie einen Einfluss der Krankheitsausprägung der KHK. Ein Effekt durch das Vorliegen eines Diabetes mellitus lässt sich nicht sicher darstellen. Eine Betrachtung der plasmatischen MIF-Konzentration zeigt einen deutlichen Einfluss sowohl durch die Ausprägung der KHK als auch durch das Vorliegen eines Diabetes mellitus. Diabetiker haben eine höhere MIF-Plasmakonzentration als Nichtdiabetiker und ACS-Patienten zeigen eine höhere Konzentration als Patienten mit einer stabilen Angina pectoris.

Insgesamt fällt auf, dass das Vorliegen eines Diabetes mellitus einen starken Einfluss auf

die plasmatischen Gremlin-1- und MIF-Konzentrationen ausübt. Die Konzentrationen der Marker in und auf den Thrombozyten scheint durch diese Vorerkrankung jedoch nicht betroffen zu sein. Es ist keine erhöhte Thrombozytenaktivierung (gemessen durch die Marker GPVI, CD62p und PAC-1) und keine erhöhte Gremlin-1 oder MIF-Expression ersichtlich.

4.10 Schlussfolgerung dieser Arbeit

In dieser Arbeit wurde mit der Untersuchung des thrombozytären Gremlin-1 ein weiteres Puzzleteil zum Einfluss verschiedener Blut- und Thrombozytenmarker im Verlauf einer koronaren Herzkrankheit untersucht. Hierbei konnten wichtige neue Erkenntnisse erlangt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die thrombozytäre Gremlin-1-Konzentration direkt mit dem Schweregrad einer KHK korreliert. Es wurde nachgewiesen, dass die thrombozytäre Gremlin-1-Konzentration mit den Konzentrationen der Thrombozytenaktivierungsmarker GPVI, CD62p und PAC-1 und insbesondere auch mit der seines Gegenspielers MIF korreliert. Eine Untersuchung der prognostischen Relevanz der gemessenen Gremlin-1-Konzentration fiel hingegen negativ aus. So lässt sich in dieser Studie kein Zusammenhang zwischen der Gremlin-1-Konzentration und dem Auftreten von kardiovaskulären Komplikationen in der Zukunft nachweisen.

Eine Untersuchung des Einflusses eines Diabetes mellitus bei KHK-Patienten zeigt allenfalls eine minimale Beeinflussung der thrombozytären Konzentrationen durch das Vorliegen eines Diabetes mellitus. Im Gegensatz dazu sind die plasmatischen Konzentrationen von Gremlin-1 und MIF stark durch das Vorliegen eines Diabetes mellitus betroffen. Es zeigen sich große Unterschiede zwischen den Konzentrationen auf den Thrombozyten und im Blutplasma.

Trotz dieser neuen Erkenntnisse bleiben noch viele Fragen offen. Die genaue Interaktion von Gremlin-1 mit anderen Markern und seine Rolle und sein Einfluss im Verlauf einer koronaren Herzkrankheit sind noch nicht verstanden. Hierzu werden noch weitere Studien und Untersuchungen folgen müssen um ein vollständiges Bild zu erhalten. Insbesondere die Untersuchung der dynamischen Entwicklung der thrombozytären Gremlin-1-Konzentration im Verlauf eines Ereignisses, die Dynamik im Gremlin-1/MIF-Verhältnis sowie eine Untersuchung der direkten Interaktion der thrombozytären und plasmatischen Konzentrationen versprechen interessante neue Erkenntnisse. Gremlin-1 zeigt sich somit als ein spannender Marker, dessen weitere Erforschung lohnenswert erscheint.

4.11 Limitationen der Studie

Diese Arbeit untersucht den Einfluss der thrombozytären Gremlin-1-Konzentration auf den Verlauf einer koronaren Herzkrankheit. Der verwendete Datensatz weist jedoch Grenzen auf.

Es wurde keine Vergleichskohorte mit gesunden Patienten gemessen. Daher konnten ausschließlich die Messwerte von Patienten mit einer bereits bestehenden kardiovaskulären Erkrankung untersucht werden.

Es wurde nur eine einzelne Messung der thrombozytären sowie plasmatischen Konzentrationen durchgeführt. Aufgrund der Einzelmessung ist lediglich die Betrachtung einer Momentaufnahme möglich. Eine Dynamik der Konzentrationen im Rahmen der Ereignisse sowie eine eventuelle tageszeitliche Schwankung kann nicht erfasst werden. Des Weiteren erfolgte diese Messung bei Patienten, welche aufgrund eines akuten Koronarsyndroms aufgenommen wurden, während einer akuten Komplikation. Dies kann durch eine Aktivierung und einen Verbrauch von Thrombozyten, beispielsweise durch eine Thrombusbildung, die Messung der thrombozytären Marker-Konzentrationen beeinflussen.

Für die Messung der thrombozytären und der plasmatischen Konzentrationen wurden unterschiedliche Patientenkohorten verwendet. Hierdurch ist der direkte Vergleich der thrombozytären und plasmatischen Konzentrationen leider nicht möglich.

Die prognostische Untersuchung erstreckt sich über eine relativ kurze Nachverfolgungszeit und weist nur wenige Ereignisse auf. Insbesondere für den späteren Zeitraum konnten nur noch wenige Patienten nachverfolgt werden. Zur Betrachtung der Prognosefähigkeit der Gremlin-1-Konzentration könnte die Untersuchung einer größeren Patientenkohorte sowie mehrfache Konzentrationsmessungen weitere Erkenntnisse liefern.

In dieser Studie wurden zwei Hypothesen überprüft:

- Hypothese 1: Die thrombozytäre Gremlin-1-Konzentration ist bei Patienten mit einer stabilen Angina pectoris verschieden zu Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom.
- Hypothese 2: Die thrombozytäre Gremlin-1-Konzentration zeigt einen Einfluss auf die Prognose der Patienten.

Die restlichen Daten und Untersuchungen sind rein explorativ. Diese sind daher lediglich hypothesengenerierend. Zur Bestätigung der gefundenen Zusammenhänge sind weitere Untersuchungen notwendig.

Kapitel 5 Zusammenfassung

Die koronare Herzkrankheit ist weltweit verbreitet und insbesondere in den Industrienationen Ursache vieler Krankheits- und Todesfälle. Ihre pathologische Grundlage ist die Atherosklerose – eine chronisch-entzündliche Erkrankung der Gefäße. In den letzten Jahren tritt bei der Erforschung der Atherosklerose zunehmend die Bedeutung entzündlicher Zustände in den Fokus der Forschung. Thrombozyten sind an der Inflammationsreaktion beteiligt und sind Träger und Speicher einer Vielzahl inflammatorischer Marker. In dieser Arbeit wird die Rolle des thrombozytären Markers Gremlin-1 im Verlauf der KHK näher untersucht. Hierzu wird erstmalig die Konzentration von Gremlin-1 im Thrombozyten untersucht. Vergleichend werden die Konzentrationen des Macrophage migration inhibitory factor (MIF) – einem bekannten proinflammatorischen Zytokin und direktem Gegenspieler von Gremlin-1 – sowie der Thrombozytenaktivierungsmarker GPVI, CD62p und PAC-1 betrachtet. Die Messung der thrombozytären Konzentrationen erfolgte mittels Durchflusszytometrie, die plasmatischen Konzentrationen wurden durch ELISA-Messungen bestimmt.

Es zeigt sich, dass die Konzentrationen von Gremlin-1 und MIF mit den Konzentrationen der Thrombozytenaktivierungsmarker korrelieren. Dies zeigt, dass Gremlin-1 und MIF bei einer Aktivierung der Thrombozyten vermehrt vorhanden sind und deckt sich mit der Beschreibung von Gremlin-1 und MIF als Teilnehmer der Inflammationsreaktion. Einen besonders starken Zusammenhang weist Gremlin-1 zu der Konzentration von MIF auf. Im Blutplasma wurde bereits eine direkte Interaktion beider Marker nachgewiesen. Unsere Ergebnisse weisen ihren engen Zusammenhang erstmalig im Thrombozyten nach.

Bei einem Vergleich der thrombozytären Marker-Konzentrationen mit dem klinischen Ausprägungsgrad der koronaren Herzkrankheit zeigt sich für alle Marker eine höhere Konzentration bei Patienten mit einer stabilen Angina pectoris gegenüber Patienten mit akutem Koronarsyndrom. Dies ist zunächst überraschend, da aufgrund der Thrombozytenaktivierung im akuten Koronarsyndrom ein gegenteiliges Ergebnis erwartet wurde. Eine mögliche Erklärung kann in einer Dynamik der thrombozytären Konzentrationen während des

Krankheitsverlaufes liegen. Ebenso ist ein Verbrauch der Thrombozyten und eine dadurch erniedrigte Konzentration der Marker denkbar. Für die Marker Gremlin-1 und MIF wurde des Weiteren ein Sezernierungs-Mechanismus beschrieben. Diese könnten während der Thrombozytenaktivierung sezerniert werden und dadurch zu den bekannten erhöhten Blutplasmakonzentrationen beitragen und somit im Thrombozyten in niedriger Konzentration vorliegen. Für Gremlin-1 zeigt sich eine statistisch signifikante abfallende Konzentration mit zunehmendem Schweregrad der koronaren Herzkrankheit. In Voruntersuchungen wurde das Verhältnis von Gremlin-1 zu MIF im Blutplasma als relevanter Faktor für die klinische Ausprägung der KHK erkannt. Dieser Einfluss lässt sich bei den thrombozytären Konzentrationen nicht nachweisen.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit ist die Untersuchung der prognostischen Relevanz der thrombozytären Gremlin-1-Konzentration. Hierfür lässt sich in dieser Arbeit kein Anhaltspunkt finden. Es zeigt sich kein Unterschied im ereignisfreien Überleben zwischen Patienten mit einer hohen und Patienten mit einer niedrigen initialen Gremlin-1-Konzentration. Ebenso lässt die initiale Gremlin-1-Konzentration keine Rückschlüsse auf langfristig auftretende kardiovaskuläre Ereignisse zu.

Da das Vorliegen eines Diabetes mellitus ein besonderer Risikofaktor im Verlauf einer koronaren Herzkrankheit ist, wird eine nähere Untersuchung des Einflusses von Gremlin-1 und MIF bei Diabetikern mit einer koronaren Herzkrankheit durchgeführt. Der Einfluss eines Diabetes mellitus auf die thrombozytären Konzentrationen von Gremlin-1 und MIF ist hierbei gering. Es lässt sich jedoch ein Einfluss auf die Plasma-Konzentrationen von Gremlin-1 und MIF bestätigen. Diabetiker weisen hierbei höhere plasmatische Konzentrationen von Gremlin-1 und MIF auf als Nichtdiabetiker.

Diese Arbeit zeigt interessante neue Erkenntnisse über die Konzentration von Gremlin-1 im Thrombozyten bei Patienten mit einer koronaren Herzkrankheit. Dennoch sind viele Mechanismen und Zusammenhänge auch weiterhin unklar. So sind die genauen Interaktionen zwischen den Markern noch nicht vollständig verstanden. Auch der Zusammenhang zwischen den thrombozytären und den plasmatischen Konzentrationen wurde bislang noch kaum erforscht. Dies könnte weitere Rückschlüsse auf die Abläufe im Verlauf einer koronaren Herzkrankheit erbringen. Insbesondere die Dynamik der thrombozytären Konzentrationen während des Krankheitsverlaufes ist eine spannende Fragestellung, welche in weiteren Untersuchungen erforscht werden könnte.

Literaturverzeichnis

- [1] Statistisches Bundesamt, “Die 10 häufigsten Todesfälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Sterbefälle insgesamt 2014.” <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/HerzKreislaufErkrankungen.html>. Stand 16.08.2016, 11:59Uhr.
- [2] Robert Koch-Institut, “Daten und Fakten: Ergebnisse der Studie Gesundheit in Deutschland aktuell 2010,” September 2012.
- [3] W. B. Kannel, D. McGee, and T. Gordon, “A general cardiovascular risk profile: The Framingham study,” *The American Journal of Cardiology*, vol. 38, pp. 46–51, Juli 1976.
- [4] Robert Koch-Institut, “Koronare Herzkrankheit und akuter Myokardinfarkt – Heft 33. Gesundheitsberichterstattung des Bundes,” August 2006.
- [5] P. Greenland, M. D. Knoll, J. Stamler, J. D. Neaton, A. R. Dyer, D. B. Garside, and P. W. Wilson, “Major risk factors as antecedents of fatal and nonfatal coronary heart disease events,” *JAMA*, vol. 290, no. 7, pp. 891–897, 2003.
- [6] B. J. Skaggs, B. H. Hahn, and M. McMahon, “Accelerated atherosclerosis in patients with SLE—mechanisms and management,” *Nat Rev Rheumatol*, vol. 8, pp. 214–223, Apr 2012.
- [7] J. Frostegard, “SLE, atherosclerosis and cardiovascular disease,” *Journal of Internal Medicine*, vol. 257, pp. 485–495, Mai 2005.
- [8] A. Schins, A. Honig, H. Crijns, L. Baur, and K. Hamulyák, “Increased Coronary Events in Depressed Cardiovascular Patients: 5-HT_{2A} Receptor as Missing Link?,” *Psychosomatic Medicine*, vol. 65, no. 5, pp. 729–737, 2003.

- [9] W. Jiang, A. Glassman, R. Krishnan, C. M. O'Connor, and R. M. Califf, "Depression and ischemic heart disease: What have we learned so far and what must we do in the future?," *American Heart Journal*, vol. 150, no. 1, pp. 54 – 78, 2005.
- [10] C. Nemeroff and D. Musselman, "Are platelets the link between depression and ischemic heart disease?," *American Heart Journal*, vol. 140, pp. 57–62, Oktober 2000.
- [11] F. Hosseinpanah, M. Barzin, H. Golkashani, A. Nassiri, F. Sheikholeslami, and F. Azizi, "Association between moderate renal insufficiency and cardiovascular events in a general population: Tehran lipid and glucose study," *BMC Nephrology*, vol. 13, no. 1, p. 59, 2012.
- [12] R. N. Foley, A. M. Murray, S. Li, C. A. Herzog, A. M. McBean, P. W. Eggers, and A. J. Collins, "Chronic Kidney Disease and the Risk for Cardiovascular Disease, Renal Replacement, and Death in the United States Medicare Population, 1998 to 1999," *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 16, no. 2, pp. 489–495, 2005.
- [13] I. Cho, H.-S. Min, E. J. Chun, S. K. Park, Y. Choi, R. S. Blumenthal, J. J. Rivera, K. Nasir, Y.-J. Kim, D.-W. Sohn, B.-H. Oh, Y.-B. Park, and H.-J. Chang, "Coronary atherosclerosis detected by coronary {CT} angiography in asymptomatic subjects with early chronic kidney disease," *Atherosclerosis*, vol. 208, no. 2, pp. 406 – 411, 2010.
- [14] P. Muntner, J. He, B. C. Astor, A. R. Folsom, and J. Coresh, "Traditional and Non-traditional Risk Factors Predict Coronary Heart Disease in Chronic Kidney Disease: Results from the Atherosclerosis Risk in Communities Study," *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 16, no. 2, pp. 529–538, 2005.
- [15] E. L. Schiffrin, M. L. Lipman, and J. F. Mann, "Chronic Kidney Disease: Effects on the Cardiovascular System," *Circulation*, vol. 116, no. 1, pp. 85–97, 2007.
- [16] W. Böcker, H. Denk, U. Heitz, and H. Moch, *Pathologie*. Elsevier Urban & Fischer, 4 ed., 2008.
- [17] C. K. Glass and J. L. Witztum, "Atherosclerosis: The Road Ahead," *Cell*, vol. 104, no. 4, pp. 503 – 516, 2001.
- [18] P. Libby and P. M. Ridker, "Inflammation and Atherothrombosis From Population Biology and Bench Research to Clinical Practice," *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 48, no. 9s1, pp. A33–A46, 2006.

- [19] R. F. Schmidt, F. Lang, and M. Heckmann, *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. Springer Medizin Verlag Heidelberg, 31 ed., 2010.
- [20] J. X. Rong, S. Rangaswamy, L. Shen, R. Dave, Y. H. Chang, H. Peterson, H. N. Hodis, G. M. Chisolm, and A. Sevanian, “Arterial Injury by Cholesterol Oxidation Products Causes Endothelial Dysfunction and Arterial Wall Cholesterol Accumulation,” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 18, no. 12, pp. 1885–1894, 1998.
- [21] S. Parthasarathy, D. Steinberg, and J. L. Witztum, “The Role of Oxidized Low-Density Lipoproteins in the Pathogenesis of Atherosclerosis,” *Annual Review of Medicine*, vol. 43, no. 1, pp. 219–225, 1992. PMID: 1580586.
- [22] I. Tabas, “Nonoxidative Modifications of Lipoproteins in Atherogenesis,” *Annual Review of Nutrition*, vol. 19, no. 1, pp. 123–139, 1999. PMID: 10448519.
- [23] P. Shah, “Mechanisms of plaque vulnerability and rupture,” *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 41, p. S15–S22, Feb 2003.
- [24] M. J. Davies, “The pathophysiology of acute coronary syndromes,” *Heart*, vol. 83, no. 3, pp. 361–366, 2000.
- [25] R. Ross, “Atherosclerosis—an inflammatory disease.” *N Engl J Med*, vol. 340, pp. 115–126, Jan 1999.
- [26] E. Falk, P. K. Shah, and V. Fuster, “Coronary Plaque Disruption,” *Circulation*, vol. 92, no. 3, pp. 657–671, 1995.
- [27] A. Metheus, L. Tannus, R. Cobas, C. Palma, C. Negrato, and M. Gomes, “Impact of diabetes on cardiovascular disease: an update.” *International Journal of Hypertension*, vol. 2013, no. 2090-0384 (Print), pp. –, 2013.
- [28] International Diabetes Federation, “IDF Diabetes Atlas Seventh Edition,” 2015.
- [29] L. M. Jaacks, K. R. Siegel, U. P. Gujral, K. V. Narayan, R. Hubert, and O. Hubert, “Type 2 diabetes: A 21st century epidemic.” *Best Practice and Research. Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 30, no. 1521-690X, pp. 331–343, 2016.
- [30] A. C. Dale, L. J. Vatten, T. I. Nilsen, K. Midthjell, and R. Wiseth, “Secular decline in mortality from coronary heart disease in adults with diabetes mellitus: cohort study.” *BMJ*, vol. 337, p. a236, 2008.

- [31] C. S. Fox, S. Coady, P. D. Sorlie, D. Levy, J. B. Meigs, R. B. D'Agostino, Sr, P. W. F. Wilson, and P. J. Savage, "Trends in cardiovascular complications of diabetes.," *JAMA*, vol. 292, pp. 2495–2499, Nov 2004.
- [32] U.S. Department of Health and Human Services, "National Diabetes Statistics Report: Estimates of Diabetes and Its Burden in the United States, 2014," 2014.
- [33] B. Leon and T. Maddox, "Diabetes and cardiovascular disease: Epidemiology, biological mechanisms, treatment recommendations and future research.," *World Journal of Diabetes*, vol. 10, pp. –, Oct 2015.
- [34] A. Chait, C. Y. Han, J. F. Oram, and J. W. Heinecke, "Thematic review series: The immune system and atherogenesis. Lipoprotein-associated inflammatory proteins: markers or mediators of cardiovascular disease?," *J Lipid Res*, vol. 46, pp. 389–403, Mar 2005.
- [35] S. E. Shoelson, J. Lee, and A. B. Goldfine, "Inflammation and insulin resistance.," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 116, July 2006.
- [36] B. Vicenová, V. Vopálenský, L. Burýsek, and M. Pospíšek, "Emerging role of interleukin-1 in cardiovascular diseases.," *Physiol Res*, vol. 58, no. 4, pp. 481–498, 2009.
- [37] I. L. Williams, B. Noronha, and A. G. Zaman, "Review: The management of acute myocardial infarction in patients with diabetes mellitus," *The British Journal of Diabetes & Vascular Disease*, vol. 3, no. 5, pp. 319–324, 2003.
- [38] A. I. Vinik, T. Erbas, T. S. Park, R. Nolan, and G. L. Pittenger, "Platelet dysfunction in type 2 diabetes.," *Diabetes Care*, vol. 24, pp. 1476–1485, Aug 2001.
- [39] M. Gawaz, *Das Blutplättchen: Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und antithrombozytäre Therapie bei koronarer Herzerkrankung*. Georg Thieme Verlag, 1 ed., 1999.
- [40] S. Lindemann, N. D. Tolley, D. A. Dixon, T. M. McIntyre, S. M. Prescott, G. A. Zimmerman, and A. S. Weyrich, "Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1 β synthesis," *The Journal of Cell Biology*, vol. 154, no. 3, pp. 485–490, 2001.
- [41] S. Massberg, K. Brand, S. Grüner, S. Page, E. Müller, I. Müller, W. Bergmeier, T. Richter, M. Lorenz, I. Konrad, B. Nieswandt, and M. Gawaz, "A Critical Role

- of Platelet Adhesion in the Initiation of Atherosclerotic Lesion Formation,” *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 196, no. 7, pp. 887–896, 2002.
- [42] R. Braun and E. Willnow, “Die „Knockout“-Maus als Krankheitsmodell: Prinzipien und klinische Relevanz,” *Dtsch Arztebl*, vol. 93, no. 26, pp. A–1765–, 1996.
- [43] S. Lindemann, B. Krämer, P. Seizer, and M. Gawaz, “Platelets, inflammation and atherosclerosis,” *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 5, pp. 203–211, 2007.
- [44] M. Jandrot-Perrus, S. Busfield, A. H. Lagrue, X. Xiong, N. Debili, T. Chickering, J. P. Le Couedic, A. Goodearl, B. Dussault, C. Fraser, W. Vainchenker, and J. L. Villeval, “Cloning, characterization, and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the immunoglobulin superfamily,” *Blood*, vol. 96, pp. 1798–1807, Sep 2000.
- [45] J. Clemetson, J. Polgar, E. Magnenat, T. Wells, and K. Clemetson, “The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to Fc α R and the natural killer receptors,” *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, Oct 1999.
- [46] B. Bigalke, S. Lindemann, R. Ehlers, P. Seizer, K. Daub, H. Langer, T. Schonberger, E. Kremmer, D. Siegel-Axel, A. E. May, and M. Gawaz, “Expression of platelet collagen receptor glycoprotein VI is associated with acute coronary syndrome,” *European Heart Journal*, vol. 27, no. 18, pp. 2165–2169, 2006.
- [47] S. Massberg, M. Gawaz, S. Grüner, V. Schulte, I. Konrad, D. Zohlhörer, U. Heinzmann, and B. Nieswandt, “A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo,” *J Exp Med*, vol. 197, pp. 41–49, Jan 2003.
- [48] T. Calandra, J. Bernhagen, R. A. Mitchell, and R. Bucala, “The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor,” *J Exp Med*, vol. 179, pp. 1895–1902, Jun 1994.
- [49] A. Burger-Kentischer, H. Goebel, R. Seiler, G. Fraedrich, H. E. Schaefer, S. Dimmeler, R. Kleemann, J. Bernhagen, and C. Ihling, “Expression of macrophage migration inhibitory factor in different stages of human atherosclerosis,” *Circulation*, vol. 105, pp. 1561–1566, Apr 2002.
- [50] A. Schober, J. Bernhagen, M. Thiele, U. Zeiffer, S. Knarren, M. Roller, R. Bucala, and C. Weber, “Stabilization of atherosclerotic plaques by blockade of macropha-

- ge migration inhibitory factor after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice.," *Circulation*, vol. 109, pp. 380–385, Jan 2004.
- [51] J. Nishihira, Y. Koyama, and Y. Mizue, "Identification of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human vascular endothelial cells and its induction by lipopolysaccharide.," *Cytokine*, vol. 10, pp. 199–205, Mar 1998.
- [52] S. G. Lin, X. Y. Yu, Y. X. Chen, X. R. Huang, C. Metz, R. Bucala, C. P. Lau, and H. Y. Lan, "De novo expression of macrophage migration inhibitory factor in atherosclerosis in rabbits.," *Circ Res*, vol. 87, pp. 1202–1208, Dec 2000.
- [53] J. Bernhagen, T. Calandra, R. Mitchell, S. Martin, K. Tracey, W. Voelter, K. Manogue, A. Cerami, and R. Bucala, "MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia," *Nature*, vol. 365, pp. 756–759, Oct 1995.
- [54] E. F. Morand, M. Leech, and J. Bernhagen, "MIF: a new cytokine link between rheumatoid arthritis and atherosclerosis.," *Nat Rev Drug Discov*, vol. 5, pp. 399–410, May 2006.
- [55] A. Mikulowska, C. N. Metz, R. Bucala, and R. Holmdahl, "Macrophage migration inhibitory factor is involved in the pathogenesis of collagen type II-induced arthritis in mice.," *J Immunol*, vol. 158, pp. 5514–5517, Jun 1997.
- [56] A. Foote, E. M. Briganti, Y. Kipen, L. Santos, M. Leech, and E. F. Morand, "Macrophage migration inhibitory factor in systemic lupus erythematosus.," *The Journal of Rheumatology*, vol. 31, no. 2, pp. 268–273, 2004.
- [57] A. Schmeisser, R. Marquetant, T. Illmer, C. Graffy, C. D. Garlich, D. Böckler, D. Menschikowski, R. Braun-Dullaeus, W. G. Daniel, and R. H. Strasser, "The expression of macrophage migration inhibitory factor 1alpha (MIF 1alpha) in human atherosclerotic plaques is induced by different proatherogenic stimuli and associated with plaque instability.," *Atherosclerosis*, vol. 178, pp. 83–94, Jan 2005.
- [58] V. A. Korshunov, T. A. Nikonenko, V. A. Tkachuk, A. Brooks, and B. C. Berk, "Interleukin-18 and macrophage migration inhibitory factor are associated with increased carotid intima-media thickening.," *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 26, pp. 295–300, Feb 2006.
- [59] C. Weber, A. Schober, and A. Zerneck, "Chemokines: key regulators of mononuclear cell recruitment in atherosclerotic vascular disease.," *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 24, pp. 1997–2008, Nov 2004.

- [60] A. Burger-Kentischer, H. Göbel, R. Kleemann, A. Zerneck, R. Bucala, L. Leng, D. Finkelmeier, G. Geiger, H. E. Schaefer, A. Schober, C. Weber, H. Brunner, H. Rütten, C. Ihling, and J. Bernhagen, "Reduction of the aortic inflammatory response in spontaneous atherosclerosis by blockade of macrophage migration inhibitory factor (MIF).," *Atherosclerosis*, vol. 184, pp. 28–38, Jan 2006.
- [61] T. Calandra and T. Roger, "Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity.," *Nat Rev Immunol*, vol. 3, pp. 791–800, Oct 2003.
- [62] J. Bernhagen, R. Krohn, H. Lue, J. Gregory, A. Zerneck, R. Koenen, M. Dewor, I. Georgiev, A. Schober, L. Leng, T. Kooistra, G. Fingerle-Rowson, P. Ghezzi, R. Kleemann, S. McColl, R. Bucala, M. Hickey, and C. Weber, "MIF is a non-cognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment.," *Nature medicine*, vol. 13, pp. 587–96, May 2007.
- [63] A. Zerneck, J. Bernhagen, and C. Weber, "Macrophage migration inhibitory factor in cardiovascular disease.," *Circulation*, vol. 117, pp. 1594–1602, Mar 2008.
- [64] I. I. Müller, K. A. L. Müller, H. Schönleber, A. Karathanos, M. Schneider, R. Jorbenadze, B. Bigalke, M. Gawaz, and T. Geisler, "Macrophage Migration Inhibitory Factor Is Enhanced in Acute Coronary Syndromes and Is Associated with the Inflammatory Response," *PLoS ONE*, vol. 7, p. e38376, 06 2012.
- [65] C.-M. Yu, C.-P. Lau, K. W.-H. Lai, X.-R. Huang, W.-H. Chen, and H. Y. Lan, "Elevation of plasma level of macrophage migration inhibitory factor in patients with acute myocardial infarction," *The American Journal of Cardiology*, vol. 88, no. 7, pp. 774 – 777, 2001.
- [66] S. M. Boekholdt, R. J. G. Peters, N. E. Day, R. Luben, S. A. Bingham, N. J. Wareham, C. E. Hack, P. H. Reitsma, and K.-T. Khaw, "Macrophage migration inhibitory factor and the risk of myocardial infarction or death due to coronary artery disease in adults without prior myocardial infarction or stroke: the EPIC-Norfolk Prospective Population study.," *Am J Med*, vol. 117, pp. 390–397, Sep 2004.
- [67] C. Herder, T. Illig, J. Baumert, M. Mueller, N. Klopp, N. Khuseyinova, C. Meisinger, S. Martin, B. Thorand, and W. Koenig, "Macrophage migration inhibitory factor (MIF) and risk for coronary heart disease: Results from the MONICA/KORA Augsburg case-cohort study, 1984-2002," *Atherosclerosis*, vol. 200, no. 2, pp. 380 – 388, 2008.

- [68] L. Z. Topol, M. Marx, D. Laugier, N. N. Bogdanova, N. V. Boubnov, P. A. Clausen, G. Calothy, and D. G. Blair, "Identification of *drm*, a novel gene whose expression is suppressed in transformed cells and which can inhibit growth of normal but not transformed cells in culture.," *Mol Cell Biol*, vol. 17, pp. 4801–4810, Aug 1997.
- [69] L. Z. Topol, B. Bardot, Q. Zhang, J. Resau, E. Huillard, M. Marx, G. Calothy, and D. G. Blair, "Biosynthesis, post-translation modification, and functional characterization of *Drm/Gremlin*," *J Biol Chem*, vol. 275, pp. 8785–8793, Mar 2000.
- [70] D. R. Hsu, A. N. Economides, X. Wang, P. M. Eimon, and R. M. Harland, "The *Xenopus* dorsalizing factor *Gremlin* identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities.," *Mol Cell*, vol. 1, pp. 673–683, Apr 1998.
- [71] C. C. Rider and B. Mulloy, "Bone morphogenetic protein and growth differentiation factor cytokine families and their protein antagonists," *Biochemical Journal*, vol. 429, no. 1, pp. 1–12, 2010.
- [72] R. H. Church, A. Krishnakumar, A. Urbanek, S. Geschwindner, J. Meneely, A. Bianchi, B. Basta, S. Monaghan, C. Elliot, M. Strömstedt, N. Ferguson, F. Martin, and D. P. Brazil, "Gremlin1 preferentially binds to bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and BMP-4 over BMP-7.," *Biochem J*, vol. 466, pp. 55–68, Feb 2015.
- [73] V. Dolan, M. Murphy, P. Alarcon, H. R. Brady, and C. Hensey, "Gremlin - a putative pathogenic player in progressive renal disease.," *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, vol. 7, pp. 523–526, Aug 2003.
- [74] K. A. L. Müller, "Die Bedeutung von Gremlin als Antagonist der "Bone Morphogenetic Protein"(BMPs) und von Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in der kalzifizierten Aortenstenose." Antrag auf Gewährung einer Sachbeihilfe durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft, 2015.
- [75] J. Sun, F.-F. Zhuang, J. E. Mullersman, H. Chen, E. J. Robertson, D. Warburton, Y.-H. Liu, and W. Shi, "BMP4 activation and secretion are negatively regulated by an intracellular gremlin-BMP4 interaction.," *J Biol Chem*, vol. 281, pp. 29349–29356, Sep 2006.
- [76] O. Michos, A. Gonçalves, J. Lopez-Rios, E. Tiecke, F. Naillat, K. Beier, A. Galli, S. Vainio, and R. Zeller, "Reduction of BMP4 activity by gremlin 1 enables ureteric bud outgrowth and GDNF/WNT11 feedback signalling during kidney branching morphogenesis.," *Development*, vol. 134, pp. 2397–2405, Jul 2007.

- [77] D. Kami, I. Shiojima, H. Makino, K. Matsumoto, Y. Takahashi, R. Ishii, A. T. Naito, M. Toyoda, H. Saito, M. Watanabe, I. Komuro, and A. Umezawa, "Gremlin enhances the determined path to cardiomyogenesis.," *PLoS One*, vol. 3, no. 6, p. e2407, 2008.
- [78] B. Chen, D. G. Blair, S. Plisov, G. Vasiliev, A. O. Perantoni, Q. Chen, M. Athanasiou, J. Y. Wu, J. J. Oppenheim, and D. Yang, "Cutting Edge: Bone Morphogenetic Protein Antagonists *Drm*/Gremlin and *Dan* Interact with Slits and Act as Negative Regulators of Monocyte Chemotaxis," *The Journal of Immunology*, vol. 173, no. 10, pp. 5914–5917, 2004.
- [79] H. Stabile, S. Mitola, E. Moroni, M. Belleri, S. Nicoli, D. Coltrini, F. Peri, A. Pessi, L. Orsatti, F. Talamo, V. Castronovo, D. Waltregny, F. Cotelli, D. Ribatti, and M. Presta, "Bone morphogenic protein antagonist *Drm*/gremlin is a novel proangiogenic factor," *Blood*, vol. 109, no. 5, pp. 1834–1840, 2007.
- [80] S. Mitola, C. Ravelli, E. Moroni, V. Salvi, D. Leali, K. Ballmer-Hofer, L. Zammataro, and M. Presta, "Gremlin is a novel agonist of the major proangiogenic receptor VEGFR2," *Blood*, vol. 116, no. 18, pp. 3677–3680, 2010.
- [81] S. Mitola, E. Moroni, C. Ravelli, G. Andres, M. Belleri, and M. Presta, "Angiopoietin-1 mediates the proangiogenic activity of the bone morphogenic protein antagonist *Drm*," *Blood*, vol. 112, pp. 1154–1157, Aug 2008.
- [82] W. Boers, S. Aarrass, C. Linthorst, M. Pinzani, R. O. Elferink, and P. Bosma, "Transcriptional profiling reveals novel markers of liver fibrogenesis: gremlin and insulin-like growth factor-binding proteins.," *J Biol Chem*, vol. 281, pp. 16289–16295, Jun 2006.
- [83] R. Kane, L. Stevenson, C. Godson, A. W. Stitt, and C. O'Brien, "Gremlin gene expression in bovine retinal pericytes exposed to elevated glucose.," *Br J Ophthalmol*, vol. 89, pp. 1638–1642, Dec 2005.
- [84] K. A. L. Müller, E. Tavlaki, M. Schneider, R. Jorbenadze, T. Geisler, R. Kandolf, M. Gawaz, I. I. Müller, and C. S. Zürn, "Gremlin-1 identifies fibrosis and predicts adverse outcome in patients with heart failure undergoing endomyocardial biopsy.," *J Card Fail*, vol. 19, pp. 678–684, Oct 2013.
- [85] L. Farkas, D. Farkas, J. Gauldie, D. Warburton, W. Shi, and M. Kolb, "Transient overexpression of Gremlin results in epithelial activation and reversible fibrosis in rat lungs.," *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol. 44, pp. 870–878, Jun 2011.

- [86] K. Koli, E. Sutinen, M. Rönty, P. Rantakari, V. Fortino, V. Pulkkinen, D. Greco, P. Sipilä, and M. Myllärniemi, “Gremlin-1 Overexpression in Mouse Lung Reduces Silica-Induced Lymphocyte Recruitment - A Link to Idiopathic Pulmonary Fibrosis through Negative Correlation with CXCL10 Chemokine.,” *PLoS One*, vol. 11, no. 7, p. e0159010, 2016.
- [87] M. S. Mulvihill, Y.-W. Kwon, S. Lee, L. T. Fang, H. Choi, R. Ray, H. C. Kang, J.-H. Mao, D. Jablons, and I.-J. Kim, “Gremlin is overexpressed in lung adenocarcinoma and increases cell growth and proliferation in normal lung cells.,” *PLoS One*, vol. 7, no. 8, p. e42264, 2012.
- [88] J. B. Sneddon, H. H. Zhen, K. Montgomery, M. van de Rijn, A. D. Tward, R. West, H. Gladstone, H. Y. Chang, G. S. Morganroth, A. E. Oro, and P. O. Brown, “Bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is widely expressed by cancer-associated stromal cells and can promote tumor cell proliferation.,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 103, pp. 14842–14847, Oct 2006.
- [89] H. Namkoong, S. M. Shin, H. K. Kim, S.-A. Ha, G. W. Cho, S. Y. Hur, T. E. Kim, and J. W. Kim, “The bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is overexpressed in human cancers and interacts with YWHAH protein.,” *BMC Cancer*, vol. 6, p. 74, 2006.
- [90] I. Müller, T. Schönberger, M. Schneider, O. Borst, M. Ziegler, P. Seizer, C. Leder, K. Müller, M. Lang, F. Appenzeller, O. Lunov, B. Büchele, M. Fahrleitner, M. Olbrich, H. Langer, T. Geisler, F. Lang, M. Chatterjee, J. F. de Boer, U. J. F. Tietge, J. Bernhagen, T. Simmet, and M. Gawaz, “Gremlin-1 is an inhibitor of macrophage migration inhibitory factor and attenuates atherosclerotic plaque growth in ApoE^{-/-} Mice.,” *J Biol Chem*, vol. 288, pp. 31635–31645, Nov 2013.
- [91] I. I. Müller, K. A. Müller, A. Karathanos, H. Schönleber, D. Rath, S. Vogel, M. Chatterjee, M. Schmid, M. Haas, P. Seizer, H. Langer, E. Schaeffeler, M. Schwab, M. Gawaz, and T. Geisler, “Impact of counterbalance between macrophage migration inhibitory factor and its inhibitor Gremlin-1 in patients with coronary artery disease,” *Atherosclerosis*, vol. 237, pp. 426–432, Dec 2014.
- [92] K. Chang, D. Weiss, J. Suo, J. D. Vega, D. Giddens, W. R. Taylor, and H. Jo, “Bone morphogenic protein antagonists are coexpressed with bone morphogenic protein 4 in endothelial cells exposed to unstable flow in vitro in mouse aortas and in human coronary arteries: role of bone morphogenic protein antagonists in inflammation and atherosclerosis.,” *Circulation*, vol. 116, pp. 1258–1266, Sep 2007.

- [93] R. McMahon, M. Murphy, M. Clarkson, M. Taal, H. S. Mackenzie, C. Godson, F. Martin, and H. R. Brady, "IHG-2, a Mesangial Cell Gene Induced by High Glucose, Is Human gremlin: Regulation by extracellular glucose concentration, cyclic mechanical strain, and transforming growth factor-1 β ," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 14, pp. 9901–9904, 2000.
- [94] M. Murphy, C. Godson, S. Cannon, S. Kato, H. S. Mackenzie, F. Martin, and H. R. Brady, "Suppression subtractive hybridization identifies high glucose levels as a stimulus for expression of connective tissue growth factor and other genes in human mesangial cells.," *J Biol Chem*, vol. 274, pp. 5830–5834, Feb 1999.
- [95] N. Yabunaka, J. Nishihira, Y. Mizue, M. Tsuji, M. Kumagai, Y. Ohtsuka, M. Imamura, and M. Asaka, "Elevated serum content of macrophage migration inhibitory factor in patients with type 2 diabetes.," *Diabetes Care*, vol. 23, pp. 256–258, Feb 2000.
- [96] G. Waeber, T. Calandra, R. Roduit, J. A. Haefliger, C. Bonny, N. Thompson, B. Thorens, E. Temler, A. Meinhardt, M. Bacher, C. N. Metz, P. Nicod, and R. Bucala, "Insulin secretion is regulated by the glucose-dependent production of islet beta cell macrophage migration inhibitory factor.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, pp. 4782–4787, Apr 1997.
- [97] A. Makino, T. Nakamura, M. Hirano, Y. Kitta, K. Sano, T. Kobayashi, D. Fujioka, Y. Saito, K. Watanabe, Y. Watanabe, K. ichi Kawabata, J. ei Obata, and K. Kugiyama, "High plasma levels of macrophage migration inhibitory factor are associated with adverse long-term outcome in patients with stable coronary artery disease and impaired glucose tolerance or type 2 diabetes mellitus," *Atherosclerosis*, vol. 213, no. 2, pp. 573 – 578, 2010.
- [98] M. Chatterjee, A. Behrendt, M. Schmid, S. Beck, M. Schneider, A. Mack, I. Müller, T. Geisler, and M. Gawaz, "Platelets as a novel source of Gremlin-1: Implications for thromboinflammation," *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 2, pp. 311–324, 2016.
- [99] S. J. Shattil, M. Cunningham, and J. A. Hoxie, "Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry.," *Blood*, vol. 70, pp. 307–315, Jul 1987.
- [100] K. A. Müller, D. Rath, M. Schmid, H. Schoenleber, M. Gawaz, T. Geisler, and I. I. Müller, "High Plasma Levels of Gremlin-1 and Macrophage Migration Inhibitory Factor, but Not Their Ratio, Indicate an Increased Risk for Acute Coronary Syndro-

- me in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus,” *Clinical Cardiology*, vol. 39, no. 4, pp. 201–206, 2016.
- [101] L. Fang and J. Zheng, “The changes of platelet and platelet activation markers in acute coronary syndrome patients.,” *Clin Lab*, vol. 59, no. 11-12, pp. 1339–1342, 2013.
- [102] N. Petrovsky, L. Socha, D. Silva, A. B. Grossman, C. Metz, and R. Bucala, “Macrophage migration inhibitory factor exhibits a pronounced circadian rhythm relevant to its role as a glucocorticoid counter-regulator,” *Immunology and Cell Biology*, vol. 81, p. 137–143, Apr 2003.

Erklärung zum Eigenanteil

Diese Doktorarbeit wurde in der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Geisler und Frau Dr. Karin Müller durchgeführt. Die Konzeption und Betreuung der Studie erfolgte durch Herrn Professor Geisler. Die Labormessungen, die Erhebung der Basisdaten und der Follow-up-Daten wurden von mir in Zusammenarbeit mit den weiteren Doktoranden der Arbeitsgruppe durchgeführt. Bei den Laboruntersuchungen erhielten wir Unterstützung von Frau L. Laptev und Frau A. Hoffmann. Die ELISA-Messungen wurden von Frau M. Schneider, Frau J. Kwiatkowska und Herrn H. Schönleber durchgeführt. Der Datensatz für die Patientenkohorte 2 (plasmatische Messungen) wurde von Frau Dr. Karin Müller überarbeitet und zur Verfügung gestellt. Die statistische Auswertung erfolgte durch mich mit Hilfestellung von Frau Dr. Müller und Frau A. Naumann vom Institut für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie.

Teile der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht. Mein Anteil an diesen Veröffentlichungen beträgt:

- Chatterjee et al. *Platelets as a novel source of Gremlin-1: Implications for thromboinflammation* [98]. Recherche der klinischen Patientendaten und Messung der thrombozytären Gremlin-1-Konzentrationen in Zusammenarbeit mit weiteren Doktoranden der Arbeitsgruppe. Erstellung und Bearbeitung des Datensatzes, Bereitstellung und Auswertung der klinischen Daten (Patientenbasisdaten, thrombozytäre Gremlin-1-Konzentrationen), Erstellung von Tabelle 1 und Abbildung 2F.
- Müller et al. *High Plasma Levels of Gremlin-1 and Macrophage Migration Inhibitory Factor, but Not Their Ratio, Indicate an Increased Risk for Acute Coronary Syndrome in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus* [100]. Recherche der klinischen Daten in Zusammenarbeit mit weiteren Doktoranden der Arbeitsgruppe.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 15. März 2017

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Professor Geisler für die Zurverfügungstellung des interessanten Themas und für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe zu verfassen. Ein herzlicher Dank gilt ebenfalls Frau Dr. Karin Müller, welche mir als Betreuerin zur Seite stand. Bei ihr möchte ich mich insbesondere für die Hilfestellung bei der statistischen Auswertung und die Korrektur der schriftlichen Ausarbeitung bedanken.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Mitdoktoranden für eine gute Zusammenarbeit im Labor und die Unterstützung auch in schwierigen Zeiten. Ebenfalls möchte ich Frau Lydia Laptev herzlich danken, welche mir im Labor bei allen Fragestellungen und Problemen stets geduldig und hilfreich zur Seite stand.

Ein weiterer Dank gilt Frau Aline Naumann vom Institut für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie für die Unterstützung und Hilfestellung bei der statistischen Auswertung der Daten.

Ebenfalls möchte ich mich herzlich bei allen Patienten bedanken, welche an dieser Studie teilgenommen haben. Durch ihre Bereitschaft wird diese Studie und die Durchführung wissenschaftlicher Forschung überhaupt erst ermöglicht.

Mein letzter Dank gilt meiner Familie, meinen Freunden und meinem Freund Lukas, welche mich stets unterstützt haben. Ohne euch wäre mein Studium und die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.