

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
Tübingen**

Abteilung Innere Medizin III

(Schwerpunkt: Kardiologie und Kreislaufkrankungen)

**Die Bedeutung von Zytokinen der Cystein-Knot-
Superfamilie in der ischämischen Kardiomyopathie und
degenerativen Aortenstenose**

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

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

**vorgelegt von
Kechaiov, Christina**

2018

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. I. Müller

2. Berichterstatter: Professor Dr. T. Nordt

Tag der Disputation: 07.03.2018

Für Christoph

& Mama

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1-5
Abbildungsverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis	7-8
1. Einleitung	9
1.1 Atherosklerose.....	9
1.1.1 Epidemiologie der Atherosklerose.....	9
1.1.2 Pathogenese der Atherosklerose.....	9-11
1.2 Atherosklerose-assoziierte Krankheitsbilder der Studie.....	11
1.2.1 Degenerative kalzifizierende Aortenklappenstenose.....	12-14
1.2.2 Koronare Herzkrankheit.....	14-17
1.3 BMPs – Bone Morphogenetic Proteins und Gremlin.....	17
1.3.1 Generelle Funktion der Bone Morphogenetic Proteins 2/4/7.....	17-20
1.3.2 Rolle der Bone Morphogenetic Proteins in der Atherosklerose- entstehung.....	20-22
1.3.3 Funktion von Gremlin1 und 2.....	22-24
1.3.4 Rolle von Gremlin1 und Gremlin2 in der Atheroskleroseentstehung.....	24-25
1.4 Zusammenfassung der Bone Morphogenetic Proteins 2/4/7 vs. Gremlin1/2.....	25-26
1.5 Funktion der Thrombozyten in der Entstehung der Atherosklerose.....	26-29
1.6 Funktion der Monozyten in der Entstehung der Atherosklerose.....	29-32
1.7 Fragestellung der Dissertation.....	33
2. Material und Methoden	34
2.1 Material.....	34
2.1.1 Patientenkollektiv.....	34-35

2.1.2	Studienprotokoll.....	36
2.1.3	Geräte und Verbrauchsmaterial.....	37-38
2.2	Methoden.....	39
2.2.1	Blutprobenverarbeitung der Kontroll- und Studiengruppe.....	39
2.2.2	Vorbereitung der Substanzen für die Durchführung der Messung.....	39-40
2.2.3	Aufbereitung der Blutproben.....	40
2.2.4	Verarbeitung der Blutproben mittels Durchflusszytometrie.....	40-42
2.2.5	Funktionsweise und Durchführung der Durchflusszytometrie.....	42-43
2.2.5.1	Analyse der Thrombozyten mittels Durchflusszytometrie.....	44
2.2.5.2	Analyse der Monozyten mittels Durchflusszytometrie.....	45
2.2.6	Statistische Analyse.....	46
3.	Ergebnisse.....	47
3.1	Assoziationen der Gesamt- und Einzelkohorten mit demographischen Faktoren.....	47-53
3.2	Korrelationen der Patientenkollektive.....	54
3.2.1	Korrelationsmatrix der Gesamtkohorte.....	54
3.2.1.1	Korrelationen von Gremlin1-Expression auf Thrombozyten.....	54-55
3.2.1.2	Korrelationen von Gremlin1-Expression auf Monozyten.....	55
3.2.1.3	Korrelationen von Gremlin2-Expression auf Thrombozyten.....	56
3.2.1.4	Korrelationen von Gremlin2-Expression auf Monozyten.....	56-57
3.2.1.5	Korrelationen von BMP2-Expression auf Monozyten...	57
3.2.1.6	Korrelationen von BMP7-Expression auf Monozyten.....	57-58

3.2.1.7	Korrelationen von BMP4-Expression auf Monozyten und Thrombozyten.....	58
3.2.2	Korrelationsmatrix der SAP-Kohorte.....	58
3.2.2.1	Korrelationen von Gremlin1-Expression auf Thrombozyten.....	59
3.2.2.2	Korrelationen von Gremlin1-Expression auf Monozyten.....	59
3.2.2.3	Korrelationen von Gremlin2-Expression auf Thrombozyten.....	59-60
3.2.2.4	Korrelationen von Gremlin2-Expression auf Monozyten.....	60
3.2.2.5	Korrelationen von BMP2-Expression auf Monozyten...	60
3.2.2.6	Korrelationen von BMP7-Expression auf Monozyten...	60
3.2.2.7	Korrelationen von BMP4-Expression auf Monozyten und Thrombozyten.....	60
3.2.3	Korrelationsmatrix der ACS-Kohorte.....	61
3.2.3.1	Korrelationen von Gremlin1-Expression auf Thrombozyten.....	61
3.2.3.2	Korrelationen von Gremlin1-Expression auf Monozyten.....	61
3.2.3.3	Korrelationen von Gremlin2-Expression auf Thrombozyten.....	62
3.2.3.4	Korrelationen von Gremlin2-Expression auf Monozyten.....	62
3.2.3.5	Korrelationen von BMP2-Expression auf Monozyten.....	62-63
3.2.3.6	Korrelationen von BMP7-Expression auf Monozyten...	63
3.2.3.7	Korrelationen von BMP4-Expression auf Monozyten und Thrombozyten.....	63
3.2.4	Korrelationsmatrix der Aortenstenosen-Kohorte.....	64
3.2.4.1	Korrelationen von Gremlin1-Expression auf Thrombozyten.....	64

3.2.4.2	Korrelationen von Gremlin1-Expression auf Monozyten.....	64-65
3.2.4.3	Korrelationen von Gremlin2-Expression auf Thrombozyten.....	65
3.2.4.4	Korrelationen von Gremlin2-Expression auf Monozyten.....	65
3.2.4.5	Korrelationen von BMP2-Expression auf Monozyten...	66
3.2.4.6	Korrelationen von BMP7-Expression auf Monozyten...	66
3.2.4.7	Korrelationen von BMP4-Expression auf Thrombozyten und Monozyten.....	66
3.2.5	Zusammenfassung der Korrelationsmatrixtabellen.....	67
3.2.5.1	Zusammenfassung für Gremlin1.....	67
3.2.5.2	Zusammenfassung für Gremlin2.....	67-68
3.2.5.3	Zusammenfassung für BMP2.....	68
3.2.5.4	Zusammenfassung für BMP4.....	68
3.2.5.5	Zusammenfassung für BMP7.....	68
3.3	Signifikante Marker innerhalb der Kohorten.....	69-79
3.4	Follow-up der Studie mit Analyse der periinterventionellen Baseline characteristics und klinischem Verlauf mit Kaplan-Meier-Analysen der Überlebensfunktionen und Messendpunkte.....	80
3.4.1	Baseline characteristics im Verlauf.....	80-83
3.4.2	Kaplan-Meier-Kurven mit klinischem Endpunkt.....	84-88
4.	Diskussion	89
4.1	Die wichtigsten Aussagen der Studie in der Übersicht.....	89
4.2	Wichtigste Ergebnisse für die SAP-Kohorte.....	90
4.3	Wichtigste Ergebnisse für die ACS-Kohorte.....	90
4.4	Wichtigste Ergebnisse für die Aortenstenosen-Kohorte.....	90-91
4.5	Analyse der Kaplan-Meier-Kurven.....	91
4.6	Limitationen der Studie.....	91-92
4.7	Klinische Bedeutung der Ergebnisse.....	92-93
4.8	Schlussfolgerungen.....	93-95
5.	Zusammenfassung	96

6. Literaturverzeichnis.....	97-113
7. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift.....	114
8. Danksagung.....	115
9. Curriculum vitae.....	116

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1 Yanwen Qin and Guo-Ping Shi. Cysteinyl cathepsins and mast cell proteases in the pathogenesis and therapeutics of cardiovascular diseases. *Pharmacol Ther.* 2011 Sep; 131(3): 338–350.
- Abbildung 2 Cai J, Pardali E, Sánchez-Duffhues G, ten Dijke P. BMP signaling in vascular diseases. *FEBS Lett.* 2012 Jul 4;586(14):1993-2002.
- Abbildung 3 Hruska KA, Mathew S and Saab G. Bone morphogenetic proteins in vascular calcification. *Circ Res.* 2005;97:105-14.
- Abbildung 4 Avsian-Kretchmer O, Hsueh AJ. Comparative genomic analysis of the eight-membered ring cystine knot-containing bone morphogenetic protein antagonists. *Mol Endocrinol.* 2004 Jan;18(1):1-12.
- Abbildung 5 Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Karin Müller, Iris Müller
- Abbildung 6 Bhatt DL. Intensifying platelet inhibition--navigating between Scylla and Charybdis. *N Engl J Med.* 2007 Nov 15;357(20):2078-81
- Abbildung 7 Idzkowska E, Eljaszewicz A, Miklasz P, Musial WJ, Tycinska AM, Moniuszko M. The Role of Different Monocyte Subsets in the Pathogenesis of Atherosclerosis and Acute Coronary Syndromes. *Scand J Immunol.* 2015 Sep;82(3):163-73.
- Abbildung 8-23 Ergebnisse der Studie

Abkürzungsverzeichnis

1/2/3 G	1/2/3 Gefäß
ACE-Hemmer	Angiotensin-converting-enzyme-Hemmer
ACS	Acute coronary syndrome, akutes Koronarsyndrom
AKS	Aortenklappenstenose
AUC	Area under curve
BMP	Bone Morphogenetic Protein
Ca ²⁺	Kalzium
CABG	Coronary artery bypass graft
CaPO ₄	Kaliumphosphat
CD	Cluster of differentiation
CRP	C-reaktives Protein
CV-	Kardiovaskulär-
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FACS	Flourescence-activated cell sorting; Durchflusszytometrie
Fb RG	Feinblasige Rasselgeräusche
Gr	Gremlin
HDL-	High-density-lipoprotein-
HPT	Hauptstamm
ICD	Implantierbarer Kardioverter-Defibrillator
IL	Interleukin
INF	Interferon
KHK	Koronare Herzerkrankung, -krankheit
LDL-	Low-density-lipoprotein-
LV-	Linksventrikulär-
LVEDD	Left ventricular end diastolic diameter
MFI	Mean Fluorescence Intensity
MI	Myokardinfarkt
Mono	Monozyten
NO	Nitroxid
NP	Nicht-permeabilisiert

NYHA	New York Heart Association
OAD	Orales Antidiabetikum
P	Permeabilisiert
PBS	Phosphate-buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
PTCA	Perkutane Transluminale Koronar-Angioplastie
SAP	Stabile Angina Pectoris
TAVI	Transcatheter Aortic Valve Implantation
TGF-beta	Transforming growth factor beta
Thr	Thrombozyten
TNF	Tumornekrose-Faktor
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VHF	Vorhofflimmern

1. Einleitung

1.1 Atherosklerose

1.1.1 Atherosklerose - Epidemiologie

Die Atherosklerose gehört zu den pathognomonischen Ursachen für die Krankheiten mit den höchsten Morbiditäts- und Mortalitätsraten [1]; die Folgen der daraus entstehenden Krankheitsbilder, also der chronisch ischämischen Herzkrankheit, des akuten Myokardinfarkts, Herzinsuffizienz und hypertensiven Herzkrankheit, betragen im Jahr 2014 rund 21,2% der Todesfälle in Deutschland [2], in den Industrienationen führt dieses Krankheitsbild am häufigsten zum Tode [3]. Sie ist eine multifaktoriell bedingte, systemische Erkrankung, die sich sowohl akut als auch chronisch in Form eines Schlaganfalls, akuten Koronarsyndroms, koronarer Herzerkrankung oder peripherer arterieller Verschlusskrankheit (pAVK) manifestieren kann [4]. Die Kosten der daraus entstandenen Gesundheitsschäden machen den Großteil der Gesundheitskosten in den Industrieländern aus, allein in den USA belaufen sich diese 2015 auf rund 316,6 Mrd. US\$ [5]. Zu den Risikofaktoren, die die Entstehung einer Atherosklerose begünstigen können, zählen männliches Geschlecht, hohes Lebensalter, arterielle Hypertension, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie, Nikotinkonsum und chronische Niereninsuffizienz [6]. Heute erst weiß man, dass die Pathogenese ein komplexes, multifaktorielles Geschehen ist, was durch den Lipidstoffwechsel, die individuelle Immunantwort und multiple Zytokine beeinflusst wird [13].

1.1.2 Pathogenese der Atherosklerose

Die Entstehung der Atherosklerose ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. Bezüglich der initialen Entstehung gibt es zwei Hypothesen:

Die erste Hypothese ist die Response-to-injury-Hypothese von Russell Ross, die eine Verletzung der Gefäßintima-Schicht als grundlegende Voraussetzung für die Entstehung von Atherosklerose sieht. Dabei können die Schäden an der

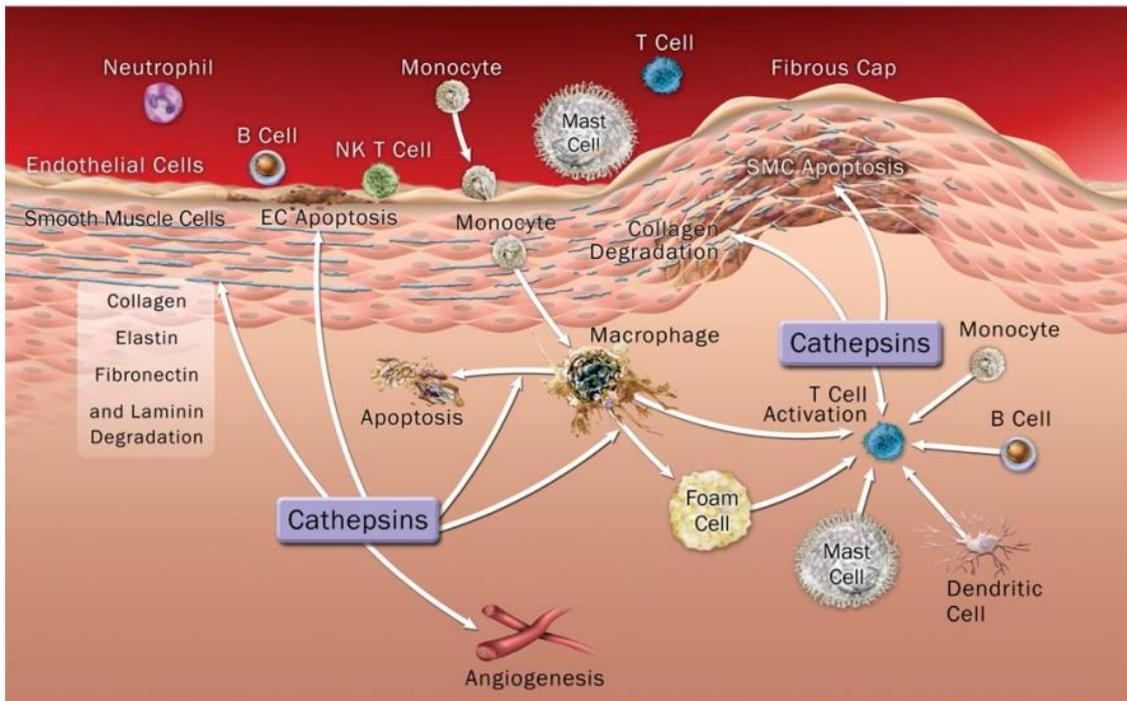


Abbildung 1: Entwicklung der Atherosklerose im Zusammenspiel mit Inflammation, Lipiden und endothelialer Dysfunktion [10]. Der Entstehung einer fibrösen Kappe als Vorstufe eines atherosklerotischen Plaques gehen eine Vielzahl von Vorgängen voraus, zum Beispiel Monozytenmigration von intravasal nach subendothelial und deren Umwandlung zu Makrophagen, welche lipidabhängig zu Schaumzellen deformieren. Parallel findet eine T-Zellaktivierung statt, wobei auch andere myeloische Zellen sowie Zytokine bei der Apoptose von glatten Muskelzellen entscheidend sind. Aus: Yanwen Qin and Guo-Ping Shi. Cysteiny cathepsins and mast cell proteases in the pathogenesis and therapeutics of cardiovascular diseases. *Pharmacol Ther.* 2011 Sep; 131(3): 338–350.

Intima multifaktoriell begünstigt sein, durch Trauma (z.B. durch arterielle Hypertension), biochemische Schädigung, bakterielle oder virale Toxine [7]. Durch in-vitro und in-vivo Versuche konnte gezeigt werden, dass hierbei die Gefäßschäden mit darauffolgender endothelialer Dysfunktion und vermehrter Thrombozytenaggregation einhergehen [7]. Des Weiteren sind hier Thrombozyten für die Migration der glatten Gefäßmuskulatur der Media-Schicht in das Subendothelium von Bedeutung [8]. Die zweite Hypothese, die Lipoprotein-Induced-Atherosclerosis-Hypothese des Nobelpreisträgers Joseph Goldstein, bezieht Lipide, insbesondere das LDL-Cholesterin, ein, welches von Makrophagen aufgenommen wird, die sich dadurch zu den sogenannten Schaumzellen differenzieren [9]. Beide Theorien weisen darauf hin, dass im Rahmen der progredienten endothelialen Dysfunktion auch ein entzündlicher Prozess stattfindet [10], der die Zellverbände des Endothels durchlässig macht für Zytokine und Makrophagen [8], die bis in die Media eindringen und den

Gewebeumbau ermöglichen. Die Entstehung der sogenannten „fatty streaks“ ist das erste Stadium einer manifesten atherosklerotischen Läsion und unmittelbare Vorstufe eines Atheroms [11]. Wachstumsfaktoren wie beispielsweise der PDGF (Platelet-derived Growth Factor) [12] begünstigen das weitere Wachstum der Atherome zu größeren komplexen Läsionen, die zusätzlich zu Monozyten, Makrophagen, Schaumzellen, proliferierten glatten Muskelzellen und Endothelzellen auch verkalkte Areale und Cholesterinkristalle enthalten [12]. Die Atherombildung wird von aktivierten T-Lymphozyten mitbewirkt, die den inflammatorischen Progress vorantreiben [10]. Dabei migrieren zunächst Monozyten und Makrophagen durch die permeable Endothelzellschicht und führen hier zur T-Zell-Aktivierung [12]. Es kommt zur Ausbildung einer fibrösen Kappe, die die atherosklerotische Plaque zum Gefäßlumen abgrenzt und stabilisiert [12]. Der individuelle molekulare Aufbau des Plaques und seiner Vorstufen ist dabei abhängig von zahlreichen Kofaktoren und dem Vorhandensein der verschiedenen kardiovaskulären Risikofaktoren [11]. Eine wesentliche Rolle bei der Entstehung atherosklerotischer Läsionen spielen aber immer die Schaumzellen, die sich unmittelbar in die Subintima einlagern können oder aber neben den migrierten und proliferierten glatten Muskelzellen der Media liegen [11]. Die vermehrte Bildung von Kollagen ist Grundlage für die spätere Entstehung der fibrösen Plaques [12]. Das atherosklerotisch veränderte Gefäß ist nicht länger NO-Sensitiv [12].

1.2 Atherosklerose-assoziierte Krankheitsbilder der Studie

Die Atherosklerose ruft eine Vielzahl von pathologischen Veränderungen hervor, in der vorliegenden Studie wurden die degenerative kalzifizierende Aortenklappenstenose und die koronare Herzerkrankung untersucht [4],[14].

1.2.1 Degenerative kalzifizierende Aortenklappenstenose

Die kalzifizierende Aortenklappenstenose wird häufig mit Atherosklerose assoziiert, obgleich nur rund 50% der Patienten mit kalzifizierender Aortenklappe auch Zeichen einer Atherosklerose zeigen [16]. Dieses Krankheitsbild wird zunehmend bedeutsamer, die Prävalenz bei Erwachsenen über 75 Jahren beträgt ca. 2,8% [16]. Etwa ein Viertel der über 65-Jährigen zeigt bereits eine Sklerosierung der Klappe [15]. Darüber hinaus haben Patienten mit Aortenklappensklerose ein 1,8-faches Risiko, ein neu auftretendes koronares Ereignis zu entwickeln und ein erhöhtes Risiko eines plötzlichen kardiovaskulären Todes ohne vorherige koronare Herzerkrankung [17]. Neben der Sklerosierung und Kalzifizierung spielt die kongenitale Anomalie der bikuspiden Aortenklappe eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Aortenklappenstenose; sie ist eine der häufigsten angeborenen Herzfehlbildungen, mit einer Prävalenz von 1-2%, wobei männliche Patienten dabei rund 2-3mal häufiger betroffen sind als weibliche [18]. Im Folgenden soll genauer auf die kalzifizierende Aortenklappenstenose eingegangen werden, da diese im Rahmen der Studie untersucht wurde. Für das Verständnis der Entstehung einer Sklerose ist die Grundkenntnis des normalen Klappenaufbaus Voraussetzung: die ventrikulär gelegene Seite der Klappe besteht aus Elastinreichen Fasern, wohingegen die aortal-gelegene Seite reich an Fibroblasten und zirkulär angeordneten Kollagenfasern ist [17]. Die für die Kalzifizierung typische Einlagerung von Knochen-ähnlichem Material, wie CaPO_4 , und die aktive Tätigkeit von osteogenen Progenitorzellen konnte dabei an den Klappen nachgewiesen werden [19],[20]; Der Kalzifizierung geht ein inflammatorischer Prozess mit verschiedenen Immunreaktionen voraus [17],[21]. Die Sklerosierung der Aortenklappe kann bereits in jungen Jahren beginnen [15], bleibt dabei lange asymptomatisch und wird meist Jahre vor dem Auftreten klinischer Symptome diagnostiziert [22]. Dennoch lässt sich im frühen Stadium bereits eine strukturelle Veränderung des Herzens nachweisen, zum Beispiel eine myokardiale Hypertrophie [25], um die Aortenstenose zunächst zu kompensieren. Die LV-Funktion ist hier kein sensitiver Marker, da diese oft noch lange normal bleibt [24]. Die Symptomatik einer fortgeschrittenen

Aortenklappenstenose reicht von Dyspnoe, Angina pectoris und Synkopen mit Hypotonie bis hin zum Herzversagen und plötzlichen Herztod [26]. Ein therapeutisches-invasives Einschreiten wird derzeit unter sorgfältiger Abwägung von Schweregrad der Stenose, Risikostratifizierung und Symptomatik empfohlen. Grundsätzlich sollte ein Ersatz der stenosierten Aortenklappe erfolgen, sobald der Patient diesbezüglich symptomatisch wird [29],[30],[31]. Therapeutisch bestehen derzeit zwei Verfahren zur Behebung der Aortenklappenstenose: der chirurgische Aortenklappenersatz oder der interventionelle transarterielle Aortenklappenersatz (TAVI: Transcatheter Aortic Valve Implantation) [27],[28]. Patienten mit niedrigem oder mittlerem perioperativen Risiko und einem noch jüngeren Lebensalter von unter 80 Jahren wird ein chirurgischer Aortenklappenersatz empfohlen, Patienten mit hohem perioperativen Risiko und fortgeschrittenem Lebensalter wird meist eine TAVI empfohlen [26],[29],[30]. Der Schweregrad der Aortenstenose wird nicht invasiv mittels Echokardiographie und invasiv mittels Rechts-Links-Herzkatheter ermittelt [31],[32]:

Tabelle 1: Einteilung der Aortenklappenstenose und –sklerose zur Klassifikation des Schweregrades mittels Echokardiographie [23].

	Aortensklerose	Mild	Moderat	Schwer
Anterograder Fluss(m/s)	≤2,5m/s	2,6-2,9	3,0-4,0	>4,0
Mittl. Druckgradient (mmHg)	-	<20 (<30 ^a)	20-40 ^b (30-50 ^a)	>40 ^b (>50 ^a)
Aortenklappenöffnungsfläche (cm²)	-	>1,5	1,0-1,5	<1,0
Klappenöffnungsfläche Index (cm²/m²)		>0,85	0,60-0,85	<0,6
Geschwindigkeitsindex		>0,50	0,25-0,50	<0,25

^aESC Guidelines; ^bAHA Guidelines

Das Outcome der Patienten mit Aortenklappenstenose gestaltet sich unterschiedlich: Entgegen der Annahme, dass Patienten mit milder oder moderater Stenose ein besseres Outcome haben, zeigt sich, dass diese Gruppe im Falle eines schnellen Fortschreitens der Klappenkalzifizierung und koronarer Herzerkrankung als Komorbidität eine schlechtere Prognose besitzen [30]. Patienten mit asymptomatischer, schwerer Stenose haben ein 80%iges Risiko, innerhalb der nächsten vier Jahre zu versterben [33]. Vergleicht man die therapeutischen Maßnahmen konventionell chirurgisch vs. interventionell, so zeigt die TAVI in den Niedrig-Risiko Gruppen ähnliche Ergebnisse wie der konventionell chirurgische Klappenersatz, was die Krankenhausmortalität betrifft, und eine niedrigere Krankenhausmortalität in den Moderat- und Hoch-Risiko Gruppen [34],[35]. Allerdings verbleibt bei der TAVI die native verkalkte Aortenklappe in situ und kann den späteren Zugang zu den Koronargefäßen, ebenso wie die im Rahmen der TAVI implantierten Klappenprothesen, erheblich erschweren, so dass spätere Koronarinterventionen, zum Beispiel im Rahmen eines akuten Myokardinfarktes, erschwert sind. Auch zur Lebensdauer der TAVI-Prothesen gibt es bisher noch keine Langzeitdaten, da diese Prothesen erst seit 2011 in höherer Zahl implantiert werden, und in den bisher implantierten Patientenkollektiven aufgrund des hohen Lebensalters und der ausgeprägten Komorbidität zwischen 60 und 85% der implantierten Patienten bereits nach fünf Jahren verstorben sind, sodass eine Aussage über die Haltbarkeit der TAVI-Prothesen bisher nur eingeschränkt möglich ist [35].

1.2.2 Koronare Herzkrankheit

Das zweite für die Studie relevante Krankheitsbild ist die koronare Herzkrankheit (im Folgenden auch kurz KHK genannt), welche durch Atherosklerose entsteht. Zu den „Koronarien“ zählen die linke Koronararterie (LCA), welche sich in den Ramus interventricularis anterior (RIVA) und Ramus circumflexus (RCX) aufteilt, und die rechte Koronararterie (RCA). In den Industrieländern führt die KHK mit ihren Folgen am häufigsten zum Tode [2], in den USA allein ist sie für 20% der Todesfälle im Jahr 2005 verantwortlich

gewesen [36]. In den letzten Jahren kam es zu einer Risikoreduktion für die Entwicklung einer KHK durch effektive Medikamente zur Cholesterinsenkung und besseren Einstellung einer arteriellen Hypertonie, sowie sinkenden Raucherzahlen und erhöhter körperlicher Aktivität [37]. Diese Effekte werden aber aufgehoben durch zunehmende Fettleibigkeit und steigende Diabetes mellitus-Prävalenz [37]. Die Entstehung der KHK beruht auf der Pathogenese der Atherosklerose, also der Entstehung von atherosklerotischen Plaques an den arteriellen Koronargefäßwänden [38]. Risikofaktoren sind neben männlichem Geschlecht und familiärer Disposition Übergewicht, Nikotinabusus, erhöhte Serum-Cholesterinspiegel, erhöhter arterieller Blutdruck, Diabetes mellitus und chronische Niereninsuffizienz [37],[39]. Symptomatisch äußert sich die KHK meist durch Angina-pectoris Anfälle [40], attackenartige retrosternale Brustschmerzen, häufig belastungsinduziert und in Ruhe verschwindend. Die stenosierten Koronargefäße können mit fortschreitender KHK und Gefäßverkalkung die Myokardperfusion nicht mehr ausreichend gewährleisten, was zu akuten Ischämien führt. Bei Frauen und bei Diabetikern treten oft atypische Beschwerden auf oder es kommt zu einem stummen Myokardinfarkt [41]. Tatsächlich ist bei den meisten Patienten das erste Symptom einer koronaren Herzerkrankung nicht die stabile oder instabile Angina pectoris, sondern der akute Myokardinfarkt ohne vorausgehende Prodromi [41]. Die koronare Herzerkrankung kann unterteilt werden in stabile Angina pectoris, instabile Angina pectoris, Nicht-ST-Hebungsinfarkt und akuten ST-Hebungsinfarkt. Die instabile Angina pectoris, der akute Nicht-ST-Hebungsinfarkt und der akute ST-Hebungsinfarkt werden auch unter dem Sammelbegriff akutes Koronarsyndrom, kurz ACS zusammengefasst [42]. Charakteristisch für die stabile Angina pectoris sind belastungsabhängige Beschwerden, die auch durch Kälte oder Stress ausgelöst werden können, und in Ruhe oder durch Nitratgabe verschwinden [43]. Instabile Angina pectoris ist dadurch gekennzeichnet, dass sie entweder erstmals beim asymptomatischen Patienten oder gar in Ruhe auftritt. Näheres zu STEMI und NSTEMI siehe unter 2.1.1. Diagnostisch kann man die KHK und ihre Stenosen am genauesten mit der Koronarangiographie diagnostizieren [44]. Die weitere Diagnostik für eine koronare Herzerkrankung besteht aus der Anamnese mit Erhebung der

Symptome und der kardiovaskulären Risikofaktoren sowie anderer bereits vorbekannter kardiovaskulärer Erkrankungen, dem Ruhe-EKG und dem Belastungs-EKG (signifikante, charakteristische Erregungsrückbildungsstörungen wie ST-Streckensenkungen), der Echokardiographie und gegebenenfalls der radiologischen Bildgebung, wie Kardio-Computertomographie, Kardio-Kernspintomographie oder Myokardszintigraphie [45]. Um das Fortschreiten der KHK zu reduzieren, sollte diese nach Möglichkeit präventiv therapiert werden [36]; dazu gehört eine optimale Lebensweise mit Nikotinabstinenz, gesunder Ernährung, Gewichtsnormalisierung und einem gut eingestellten arteriellen Blutdruck [46]; eine vorbestehende Hyperlipidämie sollte so gut wie möglich eingestellt werden, Statine bieten hier einen erfolgreichen Ansatz zur Senkung des Gesamt-Cholesterins und des LDL-Cholesterins (→ Atherosklerose-Pathogenese) und beeinflussen dabei das HDL-Cholesterin nicht negativ [47]. Vor allem Menschen mit genetischer Disposition haben einen enormen Benefit von einer Statin-Therapie [48]. Eine wichtige Säule der sekundären KHK-Therapie ist die Thrombozytenaggregationshemmung, welche meist mit Aspirin durchgeführt wird [49]. Um die medikamentöse Therapie für die Patienten mit manifester KHK zu erleichtern, gibt es seit neuestem für die optimale Einstellung der Risikofaktoren die sogenannte „Polypill“, eine Kombipille aus Aspirin, Statin und ACE-Hemmer, ein Vorteil vor allem für Patienten, die multimorbide sind oder schon älter, und die bei der Vielzahl an Medikamenten, die sie täglich einnehmen sollen bisweilen den Überblick verlieren [50]. Nach einer Koronarintervention mittels perkutaner transluminaler Angioplastie und/oder Stentimplantation, wie etwa nach einem akuten Myokardinfarkt, wird zusätzlich noch eine duale Plättchenhemmung für einen begrenzten Zeitraum durchgeführt: Zum Einsatz kommen hier Thrombozytenaggregationshemmer, die den ADP-Rezeptor vom Subtyp P2Y₁₂ (Clopidogrel, Prasugrel, Ticagrelor, Cangrelor) inhibieren [51],[52]. Bei eingeschränkter Pumpfunktion oder zusätzlich bestehenden Herzrhythmusstörungen ist der Einsatz eines β -Blockers vorteilhaft, um das Myokard zu entlasten und einen Circulus vitiosus durch Aktivierung des Sympathikus im Rahmen der Herzinsuffizienz zu vermeiden [53],[54]. Die primär-präventive Therapie zielt darauf ab, die

Ausbildung höhergradiger hämodynamisch relevanter Koronarstenosen zu vermeiden. Häufig reicht die durchgeführte Primär-Prävention aber nicht aus, sodass es im weiteren Verlauf notwendig sein kann, immer wieder Revaskularisationsmaßnahmen (interventionelle Therapie mit perkutaner transluminaler Koronar-Angioplastie (PTCA) und/oder Stentimplantation sowie konventionelle operative Therapie mit aortokoronarer Bypassoperation) durchzuführen. Bei einfachen hochgradigen (>70% Lumeneinengung) Stenosen kann dies mit gutem Ergebnis mittels PTCA und Stentimplantation durchgeführt werden, bei einer Dreigefäß-KHK, hochgradiger Hauptstammstenose, hochgradiger LCA-Stenose oder Stenosen von RCX und RIVA zeigt der Koronararterienbypass (=CABG) ein besseres Outcome [55].

1.3 BMPs – Bone Morphogenetic Proteins und Gremlin

Im Rahmen der Studie wurden verschiedene molekulare Mechanismen untersucht, die eine Rolle in der Atherosklerose spielen, wie die Bone Morphogenetic Proteins 2, 4, 7.

1.3.1 Generelle Funktion der Bone Morphogenetic Proteins 2 / 4 / 7

BMPs sind pleiotrope Zytokine des TGF- β -Signalweges, die über Typ I und Typ II Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren und intrazelluläre Smad-Transkriptionsfaktoren kommunizieren [56]. Sie liegen zunächst intrazellulär als Vorläuferproteine mit einem N-terminalen Aminopeptidende für Faltung und Sekretion und einem aktiven C-terminalen Ende vor [57]. Sie werden von der taktgebenden Zelle ausgeschüttet und binden an Rezeptoren der benachbarten Zellmembranen, wobei die Affinität zum Typ I-Rezeptor gegenüber dem Typ II-Rezeptor erhöht ist [58]. Nach Sekretion, Ausbildung von Dimeren und Bindung an ihren Rezeptor führen die BMP-Homodimere zur Aktivierung des Smad-Signalling Pathways, sodass das Signal ins Zellinnere weitergeleitet wird [59]. Anschließend wird in der Signalkaskade die Zellkernaktivität und somit die Genaktivität der Zelle verändert [59]. Die Einteilung der BMPs erfolgt anhand

des im Rahmen der Evolution der Arten hochkonservierten Cysteine-Knots, den alle BMPs besitzen, der sich aber geringfügig zwischen den einzelnen Proteinen unterscheidet, in BMP-2/4, BMP-5/6/7/8, GDF-5/6/7 und BMP-9/10 [59]. In der vorliegenden Studie wurde die Protein-Expression von BMP 2, 4 und 7 analysiert, weil diese Vertreter der BMPs bekanntermaßen eine Rolle im Rahmen der Pathogenese der Atherosklerose spielen und bereits in Thrombozyten und Monozyten nachgewiesen werden konnten. Über Bone Morphogenetic Protein Receptor 1 (BMPR1) wird ein intrazellulärer Smad-Signaltransduktionsweg induziert, wobei Smad-Proteine in 3 Gruppen unterteilt werden können:

- Rezeptor-regulierte Smads (R-Smads)
- Inhibitorische Smads (I-Smads)
- common-mediator Smads, wie Smad4 (Co-Smad).

Inhibitorische Smads (I-Smad6 und 7) hemmen die durch BMPs und TGF-β1

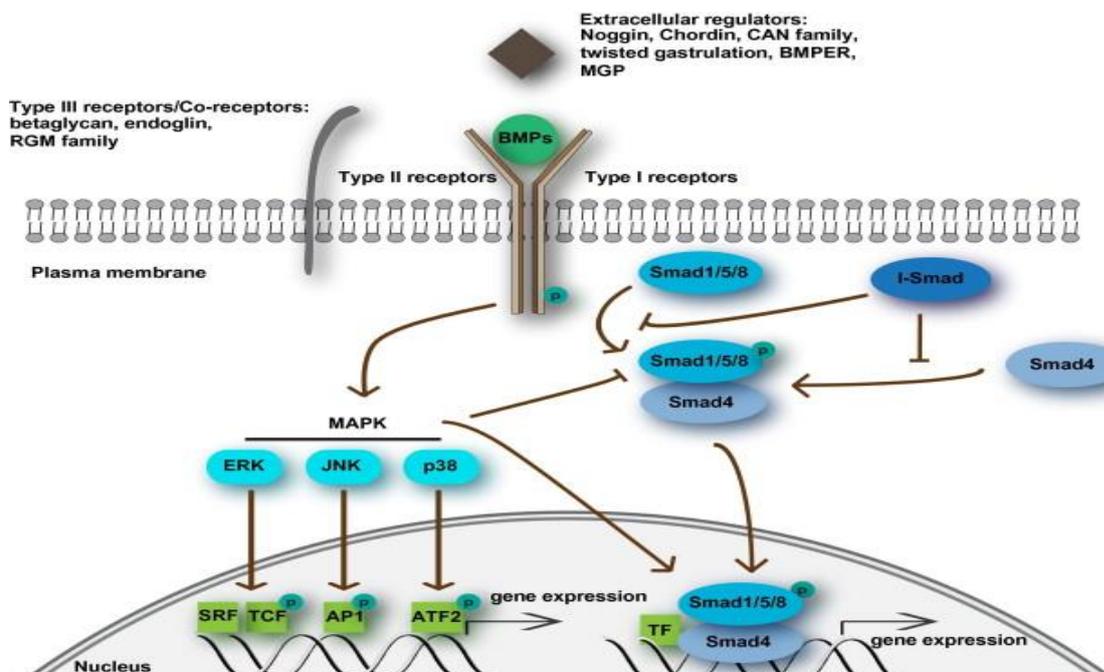


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Antagonisten der BMPs und deren Wirkmechanismus [56] Sowohl BMPs als auch deren Antagonisten (braunes Viereck) haben eine Affinität zu Typ I/II-Rezeptoren. Kompetitiver Antagonismus bestimmt den Bindungspartner des Rezeptors, und somit das intrazelluläre Signalling. Mittels Rezeptor-Phosphorylierung wird die MAP-Kinase aktiviert, was wiederum eine erhöhte Gen-Expression bewirkt und Smad-abhängige Vorgänge inhibiert. Aus: Cai J, Pardali E, Sánchez-Duffhues G, ten Dijke P. BMP signaling in vascular diseases. FEBS Lett. 2012 Jul 4;586(14):1993-2002.

vermittelten Rezeptorsignale, indem sie den Abbau von BMP-Rezeptoren und R-Smads einleiten [60]. Ubiquitäre Smad-Ligasen (Smurf1 und Smurf2) werden ebenfalls durch I-Smads aktiviert und führen zum Abbau von Rezeptoren [60]. Die Aktivität der BMPs kann von deren Antagonisten an ihren Rezeptoren blockiert werden mittels kompetitivem Antagonismus. Dabei lassen sich die Antagonisten in drei Untergruppen einteilen: die CAN (Cerberus/DAN) Familie zu der Gremlin-1 und Gremlin-2 gehören, twisted gastrulation, Chordin und Noggin [61]. Diese und noch weitere Antagonisten sind wichtig in der Embryonalentwicklung, da es ohne sie zu Defekten im Setup der Körperachsen kommt sowie zu Defekten im kardiovaskulären System, in Nieren, Rückenmark und Knochenformierung [62]. Nachdem BMP-Liganden an Rezeptoren binden und sich Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren zu einem heteromeren Komplex zusammenschließen, kommt es zu einer Phosphorylierung des Typ-I-Rezeptors durch die Typ-II-Rezeptor-Kinase [63]. Der aktivierte Typ-I-Rezeptor wiederum aktiviert die Smad-Proteine, welche an der intrazellulären Signalübertragung beteiligt sind. Darüber hinaus gibt es noch Smad-unabhängige Signalwege, beispielsweise über MAP-Kinasen, PI3-Kinasen, Protein-C-Kinasen und Rho-GTPasen, welche über BMPs aktiviert werden können [63], und in der Pathogenese vaskulärer Erkrankungen, wie der pulmonalarteriellen Hypertonie, eine Rolle spielen [64]. Die BMPs sind in der Angiogenese von Bedeutung, vor allem BMP 2, 4, (6) und 7 induzieren die Angiogenese, Endothelzellproliferation und –migration [65]. Auch in der Proliferation und Differenzierung der glatten Muskelzellen ist die Rolle von BMP2 und 7, welche die Proliferation von glatten Muskelzellen hemmen und gleichzeitig deren Differenzierung fördern, zu beachten [66],[67]. Nachweislich ist deren Aktivität steigend mit Zunahme einer Diabetes-mellitus-induzierten Hyperglykämie [68]. Dies ist auf die Rolle der BMPs in der Organogenese des exokrinen Pankreas zurückzuführen [69], wenngleich auch bei der Entstehung der endokrinen Malfunktion des Pankreas ein indirekter Zusammenhang eruierbar ist: bei der Entwicklung der Pankreasinseln sind inflammatorische Prozesse involviert [70], welche wiederum über Zytokine die Expression von BMP2 induzieren [71]. Erhöhte BMP-Expression korreliert positiv mit dem menschlichen HbA1c-Spiegel [72]. Über vermehrte Ausschüttung von VEGF stimulieren BMP2 und 4 die

Angiogenese [73], was in der Karzinomentstehung von Bedeutung ist; deren fehlerhafte Exprimierung konnte bei Ovarial-, Magen-, Lungen-, Prostata- und Dickdarmkrebs nachgewiesen werden [74]-[79]. Auch in der Nephrogenese sind BMP4 und 7 von Bedeutung, BMP4 stimuliert hier das mesenchymale Wachstum der Nephrone, verhindert frühzeitigen Zelltod und fördert so die Entstehung der Ureteren und Nieren [80]. Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz weisen erhöhte Serum-BMP4-Spiegel auf [81], wohingegen die vermehrte Expression von BMP7 im distalen Tubulus, Podozyten und Sammelrohren prognostisch günstiger ist, was den Progress der chronischen Niereninsuffizienz betrifft; erhöhte renale BMP7-Expression spricht für eine länger erhaltene Nierenfunktion und ist früh vermindert, sobald renale Fibrosierungsvorgänge stattfinden [82]. Eine Verminderung der BMP7-Expression, deren Rezeptoren und Smad 1/5/8 bei Nierenzellkarzinomen stellt eine Verbindung von deren Rolle in der Tumorneogenese her [83]. Auch die Serumspiegel von BMP2 sind bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz erhöht, hier korreliert der BMP2-Serumspiegel über den Wnt/ β -catenin-Signalweg positiv mit Kalziumeinlagerungen in der glatten Gefäßmuskulatur und mit der Gefäßverkalkung [84]. Heterozygote Genmutationen für den BMP-II-Rezeptor sind mit 70% der familiären pulmonalarteriellen Hypertonie (=PAH) und 20% der sporadischen PAH assoziiert [85], welche zu einer geringeren Expression der endothelialen NO-Synthetase führen und so zur Pathogenese der PAH beitragen [86].

1.3.2 Rolle der Bone Morphogenetic Proteins 2 / 4 / 7 in der Atheroskleroseentstehung

Wie bereits bei der Pathogenese der Atherosklerose beschrieben, sind hier vorrangig kalzifizierende Vorgänge von Bedeutung, sowohl am Gefäßendothel als auch an den Aortenklappen. Die Kalzifikation zeigt dabei, wenngleich eine ektope Verknöcherung der Klappen und Gefäße nicht nachweisbar ist, einen osteogenen Vorgang mit entsprechender Genexpression [87], und somit große Ähnlichkeiten mit der Knochenmineralisierung [88]. Auch die

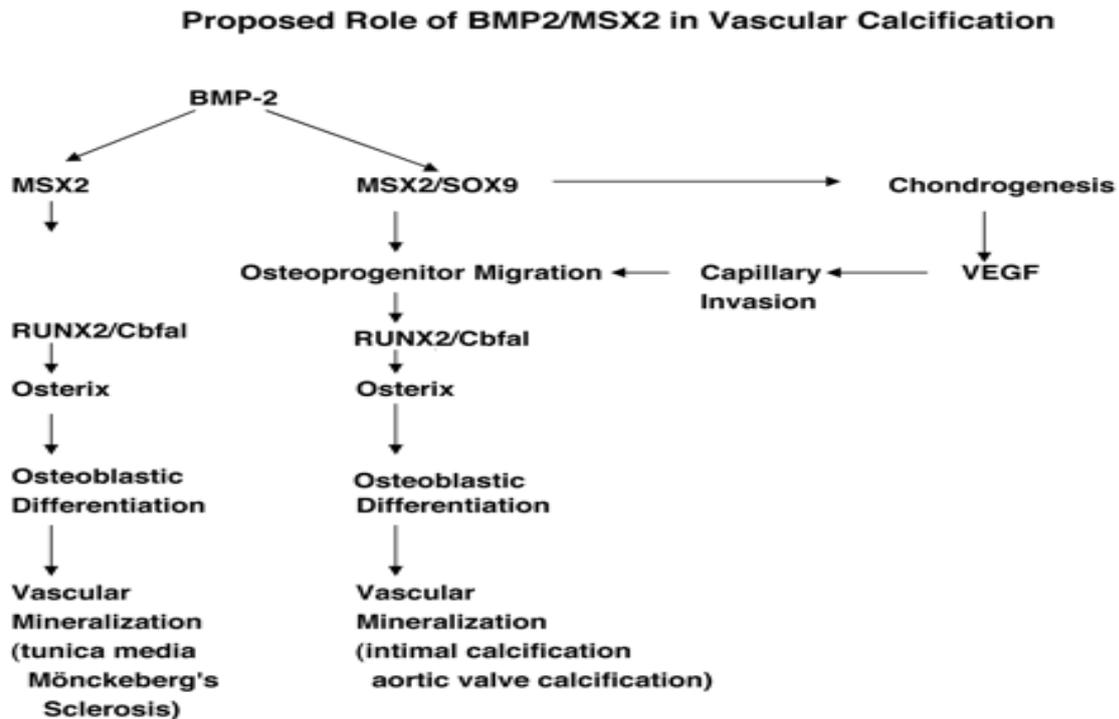


Abbildung 3: Funktion der BMPs in der Atherosklerose und Kalzifizierung [88].

Ausgangspunkt der MSX2-gesteuerten Osteoprogenitorzell-Migration sowie Chondrogenese ist unter anderem BMP2. Parallel findet Osterix-vermittelt die Osteoblastendifferenzierung statt, mit letzlicher Verkalkung der Intima (Atherosklerose) und Media (Mönckeberg-Sklerose). Aus: Hruska KA, Mathew S and Saab G. Bone morphogenetic proteins in vascular calcification. *Circ Res.* 2005;97:105-14.

proinflammatorische Wirkung von BMPs, vor allem von BMP 2 und 4, ist für die endotheliale Dysfunktion verantwortlich [89]. Sie sind maßgeblich an der frühen Morphogenese von Herz und Klappenapparat, also auch der Aortenklappe, beteiligt [90], wobei die Differenzierung der Osteoblasten aus mesenchymalen Vorläuferzellen entscheidend durch BMP2, 4, und 7 reguliert wird [91].

Perizyten, mesenchymale Stammzellen und glatte Gefäßmuskelzellen sind Zellen, die sich in Gefäßen zu Osteoblasten differenzieren können [92]-[94]. BMP2 und 7 induzieren die Expression der Transkriptionsfaktoren Runx2 und Osterix [95]-[98] in mesenchymalen Stammzellen und leiten so deren Differenzierung zu Osteoblasten ein. Glatte Gefäßmuskelzellen können sich nicht nur zu Osteoblasten umwandeln, sondern sind auch in der Lage, extrazelluläre Matrix zu produzieren und zu proliferieren [99]; dieser Vorgang wird durch BMP2 und 4 gefördert, und somit auch der Vorgang der Kalzifizierung [100],[101]. Dies ist abhängig vom Stadium der Zellteilung: wirkt BMP2 genau im Zellzyklusarrest an den vaskulären glatten Muskelzellen, so

werden diese zur Expression von Msx2 angeregt, einem Transkriptionsfaktor, welcher wiederum die Expression osteogener Gene fördert, wie der alkalinen Phosphatase (ALP) oder Osteopontin [102],[103]. Erhöhte ALP-Aktivität geht mit einer vermehrten Ablagerung von Kalziumphosphat in der extrazellulären Matrix einher und zeigt so osteogene Wirkung [104]. Durch Msx2 wird Osterix (Osx) vermehrt produziert, welcher per Transkription die Mineralisierung und Osteoblastendifferenzierung in allen Knochen reguliert [105],[106]. Der Effekt von BMP7 hingegen ist im Vergleich zum Effekt BMP2 etwas unterschiedlich: so unterstützt BMP7 im Gegensatz zu BMP2 die glatten Muskelzellen der Gefäße in ihrem ursprünglichen Phänotyp, und nicht etwa deren Umbau [107],[108]. Als Begründung hierfür werden unterschiedliche spezifische Rezeptoren genannt, wie beispielsweise Endoglin (ein TyplIII-TGF β -Rezeptor), welcher BMP2, aber nicht BMP7 bindet [109].

1.3.3 Funktion von Gremlin 1 und 2

Gremlin 1 und 2 gehören zur Cystein-Knot Superfamilie und inhibieren bestimmte ihrer Vertreter, nämlich BMP2, 4 und 7 [61]. Sie sind Teil der sogenannten DAN-Familie (=differential screening-selected gene in neuroblastoma), welche sieben Moleküle beinhaltet: Nbl1 (=DAND1), SOST (Sclerostin), USAG-1/Wise (uterine sensitization-associated gene-1), Coco (DAND5), Gremlin-1 (Gremlin, Drm), Cereberus (Cer1) und Gremlin-2 (PRDC, Protein related to Dan and Cereberus) [110]. Des Weiteren lassen sich die Mitglieder der DAN-Familie hinsichtlich ihrer Aminosäuren und Cystein-Formation in drei Hauptgruppen einteilen: 1) Gremlin-1 (Gremlin), Gremlin-2 (PRDC), Cereberus und Coco (8 Cystein), 2) SOST und USAG (9 Cystein), 3) Nbl1 (10 Cystein) [111]. Wie bereits unter 1.3.1 erwähnt, ist das molekulare Verhalten der BMPs und der Gremlins von kompetitivem Antagonismus gekennzeichnet. Vor allem die BMP-Antagonisten Gremlin 1 (Gremlin), Gremlin 2 (PRDC) und Coco scheinen diesbezüglich vor allem inhibitorisch auf BMP2, BMP4 und BMP7 zu wirken [112]-[116]. Sie entfalten ihre inhibitorische Wirkung, indem jeweils ein Gremlin-Protein mit einem BMP-Protein ein

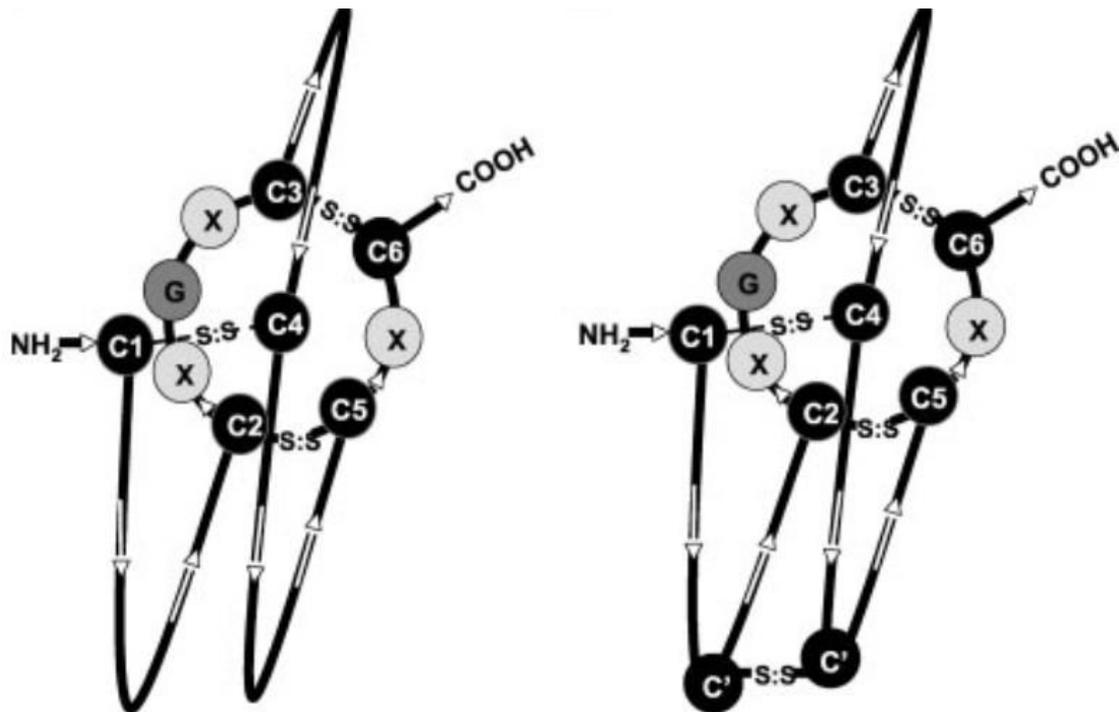


Abbildung 4: Dreidimensionale Struktur der Proteine von BMP7 (links), Gremlin 1 (rechts) [121]. Die Grundstrukturen von BMPs und Gremlin ähneln sich stark, sodass deren hohe Affinität zu denselben Rezeptortypen deutlich wird. Aus: Avsian-Kretschmer O, Hsueh AJ. Comparative genomic analysis of the eight-membered ring cystine knot-containing bone morphogenetic protein antagonists. *Mol Endocrinol.* 2004 Jan;18(1):1-12.

Heterodimer bildet, sodass die Ausbildung von BMP-Homodimeren verhindert wird und die BMPs ihre Wirkung am Rezeptor nicht mehr entfalten können [121]. Dies wird besonders deutlich, wenn man die molekularen Strukturen von BMP7 und Gremlin 1 (Abbildung 4) betrachtet. Die anderen Mitglieder der DAN-Familie besitzen ebenso inhibitorische Wirkung auf die Bone Morphogenetic Proteins, jedoch in geringerem Ausmaß und mit Bindung an teilweise andere BMP-Vertreter (BMP5/6) [117]-[120]. Molekularbiologisch wurden lange Zeit Disulfid-Brückenbindungen der DAN-Mitglieder als Voraussetzung für deren Wirkung auf die BMPs angesehen, welche diese zu einem Homodimer-Komplex formieren sollten [121]. Mittlerweile geht man aber vielmehr davon aus, dass diese Moleküle nicht über Disulfid-Brücken zu einem Homodimer konvergieren, sondern vielmehr als β -Faltblattstrukturen auftreten [122],[123]. Die ähnlichen Protein-Strukturen der BMPs und der Gremlins lassen aber auch ähnliche Eigenschaften an den Rezeptoren vermuten: so fördert Gremlin, genau wie die BMPs, die Angiogenese und somit das Tumorwachstum, was aber nicht in Verbindung gebracht werden konnte mit dessen direkter Wirkung

auf BMPs, sondern vielmehr mit dessen eigener Wirkung am VEGF-Rezeptor VEGFR2 [124]. Auch die bisherige Annahme, BMP2 und Gremlin1 würden einen 1:1 Komplex bilden, womit die Wirkung von BMP2 aufgehoben werden würde, scheint möglicherweise nicht der einzige Mechanismus zu sein: so formieren sich diese beiden Proteine eher zu Oligomeren als zu Dimeren. Dieser inhibitorische Mechanismus unterscheidet sich maßgeblich zu dem anderer Inhibitoren von BMP2, wie Chordin und Noggin [125]. Die genauen molekularen Interaktionen zwischen BMP 2,4,7 und Gremlin 1,2 müssen aber noch genauer untersucht und weiter erforscht werden.

1.3.4 Rolle von Gremlin 1 und Gremlin 2 in der Atheroskleroseentstehung

Die Rolle der BMPs, Gremlins und MIF für die Pathogenese der degenerativen Aortenstenose

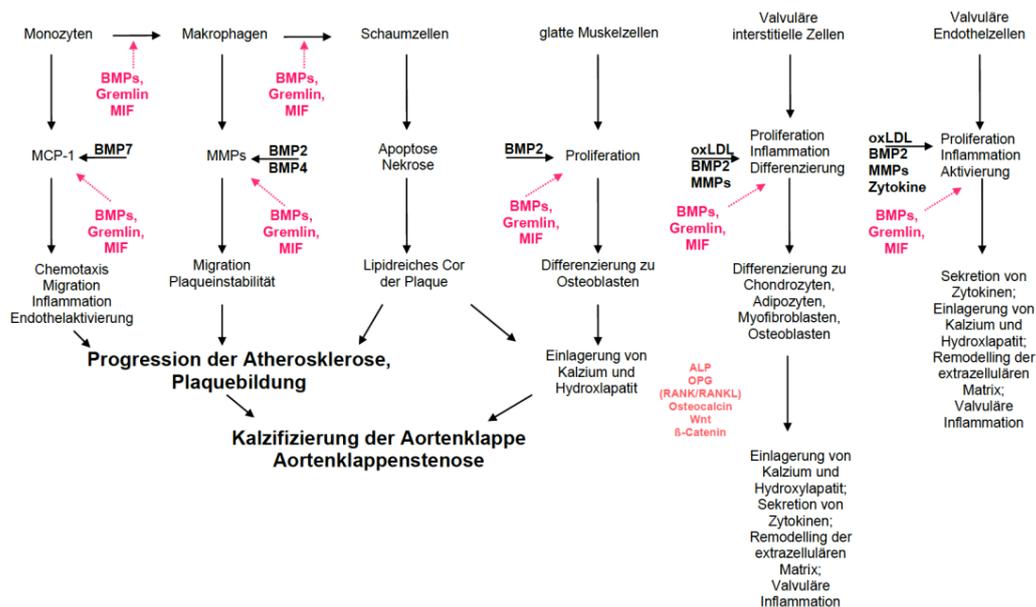


Abbildung 5: Rolle der BMPs und Gremlins in der Entstehung der Atherosklerose und Aortenstenose. Diese Darstellung zeigt den Zusammenhang der BMPs und Gremlins bei Inflammation und Proliferation der vaskulären Endothelzellen, Schaumzellentstehung, Differenzierung von glatten Muskelzellen zu Osteoblasten und der Entstehung eines instabilen Plaques, was letztlich auch in eine Kalzifizierung der Aortenklappe mündet. Aus: Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Karin Müller, Iris Müller

Gremlin verhält sich, wie bereits beschrieben, meist antagonistisch im Vergleich zu den Bone Morphogenetic Proteins. Es gibt aber noch weitere Proteine, mit

denen Gremlin interagiert und deren Wirkung Gremlin inhibieren kann. Hier ist im Kontext der Pathogenese der Atherosklerose der Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) zu nennen. Der essentielle Schritt bei der Entstehung der Atherosklerose, die Bildung von Schaumzellen, wird durch Gremlin *in vitro* gehemmt [126]. MIF ist ein pro-inflammatorisches Protein, das die Entstehung der Schaumzellen aus Makrophagen *in vitro* fördert und *in vivo* zum Progress der Atherosklerose durch Förderung der Schaumzellbildung in Mäusen beiträgt. Gremlin wird ebenso wie MIF in Monozyten, Makrophagen, Schaumzellen und glatten Muskelzellen exprimiert [127]. Im Folgenden soll erläutert werden, wie sich der Antagonismus von Gremlin 1 und 2 und MIF in der Entstehung der Atherosklerose auswirkt. Abbildung 5 verdeutlicht schematisch die Entstehung der Atherosklerose unter Berücksichtigung von BMPs, MIF und Gremlin. Gremlin1 hemmt hier das Wachstum atherosklerotischer Plaques, durch Inhibition von MIF [127]. Kürzlich konnte außerdem gezeigt werden, dass nach einem Myokardinfarkt Gremlin 2 zunächst hochreguliert wird, was diesen als inflammatorischen Marker demaskiert. Dies beruht auf einer erhöhten BMP-Signalaktivierung, welche durch erhöhte Gremlin2 – Expression antagonisiert wird. Somit kann eine erhöhte inflammatorische Antwort nach einem Myokardinfarkt durch Gremlin 2 reduziert werden [128].

1.4 Zusammenfassung Bone Morphogenetic Proteins 2/4/7 vs. Gremlin 1/2

Die Bone Morphogenetic Proteins, als Vertreter der TGF- β -Superfamilie einerseits, und die Gremlin Proteine 1 und 2, als deren Antagonisten andererseits, erfüllen eine Vielzahl an molekularen Eigenschaften. So wirken die BMPs Angiogenese-fördernd und hemmen oder fördern die Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen [65]. Auch hyperglykämie Plasmaspiegel werden mit erhöhten BMP (2)-Spiegeln und somit erhöhter Inflammation in Verbindung gebracht [70]-[73]. Sie fördern teilweise die Entstehung bzw. Differenzierung verschiedener Karzinome [74]-[79]. Bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion werden erhöhte BMP2-, BMP4-Expressionen gemessen, BMP7 wirkt hingegen nephroprotektiv [80]-[84]. Des Weiteren sind die BMPs an der

Entstehung der endothelialen Dysfunktion sowie Gefäßkalzifizierung beteiligt [89]. Gremlin1 und 2 sind Mitglieder der DAN-Familie, einer Antagonisten-Gruppe der BMPs, die vorrangig als Antagonisten der BMPs 2, 4 und 7 wirken [61]. Gremlin1 reduziert die Schaumzellbildung *in vitro* und die Entstehung von atherosklerotischen Läsionen *in vivo*, was den Progress der koronaren Herzerkrankung günstig beeinflusst. Kürzlich konnte außerdem gezeigt werden, dass nach einem akuten Myokardinfarkt Gremlin2 eine erhöhte BMP-Signalaktivierung antagonisiert und so eine erhöhte inflammatorische Antwort nach einem Myokardinfarkt reduziert [128]. BMPs und Gremlins haben häufig denselben Angriffspunkt, jedoch mit unterschiedlichen Effekten, welche letztlich zu deren Antagonismus, aber auch Synergismus, führen.

1.5 Funktion der Thrombozyten in der Entstehung der Atherosklerose

Thrombozyten und deren Aggregation spielen eine entscheidende Rolle in der Genese der Atherosklerose. Sie sind kleine Blutbestandteile, mit einem Vorkommen von ungefähr 150.000 bis 450.000/ μ l Blut [129]. Neben der endothelialen Dysfunktion beeinflussen die Thrombozyten essentiell die Entstehung atherosklerotischer Plaques, sowie eine daraus resultierende verminderte Ausschüttung von Prostazyklin und NO [130]. Auch die Sezernierung verschiedener Botenstoffe durch Thrombozyten, wie beispielsweise Histamin und Thromboxan, ist hierbei wichtig, welche Monozyten und Granulozyten anlocken [131]. Sie besitzen die Fähigkeit, bei Aktivierung ihre Form zu verändern, von diskoider Form zu Echinosphärozyten mit Pseudopodien (=Ausläufern) [132],[135]. Physiologischerweise durchströmen Thrombozyten die Blutgefäße, ohne dabei an deren Wände zu adhären [133],[135]. Bei Endothelschäden oder endothelialer Dysfunktion werden Matrixproteine wie zum Beispiel der von-Willebrand-Faktor freigesetzt, welche die Thrombozytenadhäsion an den Gefäßwänden fördern [134],[135]. Die Bildung von Thromboxan A_2 wird durch eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration durch Interaktion mit Agonisten wie ADP gefördert [135],[136],[137]. Dadurch kommt es zur Entleerung der thrombozytären

Granula sowie zur vermehrten Expression des Fibrinogenrezeptors GPIIb/IIIa, welcher maßgeblich an der stabilen Vernetzung von Thrombozyten untereinander beteiligt ist [136],[137]. Die bei der Atherosklerose elementare Schädigung der Gefäßwände wird durch Infiltration erhöhter LDL-Cholesterin-Mengen in die arterielle Gefäßwand und durch Schaumzellenbildung aus Makrophagen bedingt und aufrechterhalten [138]. Bereits in diesem Stadium adhären Thrombozyten an den Gefäßwänden [139]. Die Ausbildung stabiler atherosklerotischer Plaques wird zusätzlich getriggert durch die Thrombozytenaggregation [140]. Bei Plaqueruptur wird erneut subendotheliale Matrix freigelegt, was eine erneute und vermehrte Aggregation der Thrombozyten zur Folge hat [134]. Daraufhin kann es distal der Ruptur zu einer Thrombosierung des betroffenen Gefäßes mit akutem Verschluss und konsekutivem Myokardinfarkt kommen [141]. Diese Punkte verdeutlichen, dass die Thrombozytenaggregation bzw. deren Hemmung einen wichtigen Faktor bei der medikamentösen Therapie und Prophylaxe der atherosklerotischen Krankheitsbilder darstellt. Das klassische Medikament ist hier das „Herz-ASS“, Aspirin. Als COX1-, und COX2- Inhibitor (=Cyclooxygenase) wirkt es hierbei thrombozytenaggregationshemmend, und hemmt die Bildung von Thromboxan A₂ in Thrombozyten. Thromboxan A₂ ist ein Prostaglandin, welches in Thrombozyten gebildet wird. Es aktiviert die Thrombozytenaggregation mittels Thromboxan Rezeptoren, welche mit dem vom Endothel gebildeten Prostazyklin in Wechselwirkung treten [142]. Jedoch wirkt Aspirin nicht bei allen Patienten gleich effektiv auf Thrombozyten; so haben Patienten mit einer Stent-Thrombose in der Vorgeschichte ein höheres Risiko, dass die Wirkung von Aspirin auf deren Thrombozyten nicht so effektiv ist wie die der Patienten ohne Stent-Thrombose [143]. Patienten mit einer koronaren Herzerkrankung und einem Typ-2-Diabetes haben bei einmaliger Aspirineinnahme innerhalb von 24 Stunden bisweilen eine gesteigerte Thrombozytenaggregation [144]. Eine weitere Option der Thrombozytenaggregationshemmung stellen die P2Y₁₂-Rezeptor-Antagonisten dar, zu welchen Clopidogrel, Prasugrel, Ticagrelor und Cangrelor zählen. Sie blockieren selektiv die Bindung von ADP am ADP-Rezeptor P2Y₁₂ auf der Thrombozytenoberfläche [145]. Gerade nach einer PTCA und/oder nach Einsetzen eines intrakoronaren Stents (bare metal stent

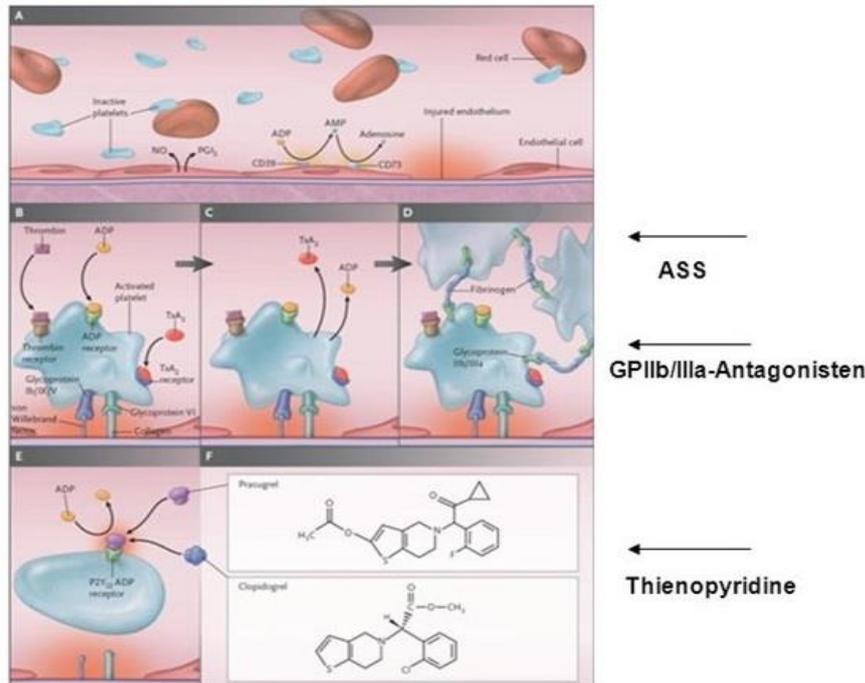


Abbildung 6: Angriffspunkte verschiedener Pharmaka während der Thrombozytenaggregation, -adhäsion [140]. Verschiedene Thrombozytenaggregationshemmer wie ASS oder Clopidogrel greifen in die Aggregation ein, während GPIIb/IIIa-Antagonisten die Vernetzung der Thrombozyten untereinander unterbinden. Aus: Bhatt DL. Intensifying platelet inhibition--navigating between Scylla and Charybdis. N Engl J Med. 2007 Nov 15;357(20):2078-81

(BMS) oder drug eluting stent (=DES)) verbessert die Kombination von Aspirin und einem P2Y₁₂-Rezeptor-Antagonisten das klinische Outcome, mit verminderten Mortalitätsraten durch Re-Stenosen aufgrund von akuten oder subakuten Stent-Thrombosen [146]. Clopidogrel und Prasugrel sind Prodrugs, sie werden in der Leber von Cytochrom-P450 zu aktiven Wirkstoffen überführt. Bei Vorliegen genetischer Polymorphismen kann es bei einem LOF (=Loss of function) von CYP2C19 (transformiert Clopidogrel in seine aktive Form) zu einem erhöhten Risiko postinterventioneller Ereignisse wie Stent-Thrombosen kommen [147]. Bei Patienten mit stabiler KHK nach dualer Plättchentherapie (Aspirin und Clopidogrel) ist die endotheliale Funktion durch erhöhte Restaktivität der Thrombozyten beeinträchtigt, was ein erhöhtes Risiko für weitere kardiovaskuläre Ereignisse birgt [148]. Die Vernetzung der Thrombozyten untereinander mittels GPIIb/IIIa-Rezeptoren kann durch dementsprechende GPIIb/IIIa-Hemmer wie Abciximab, Eptifibatid und Tirofiban gehemmt werden. Auch niedermolekulare Heparine sind zur Therapie und Prophylaxe nicht nur venöser Thrombembolien geeignet, sondern auch zur

Prophylaxe von atherothrombotischen Komplikationen bei akutem Koronarsyndrom, und lösen so unfraktioniertes Heparin in seiner Wirkung ab [149]. Bei allen diesen Arzneimittelgruppen ist gegen den protektiven Effekt bezüglich der Vermeidung einer Stentthrombose das durch sie erhöhte Blutungsrisiko abzuwägen.

1.6 Funktion der Monozyten in der Entstehung der Atherosklerose

Eine Vielzahl an Faktoren spielt eine Rolle bei der Entstehung der Atherosklerose. So ist ein fokaler Anstieg des Lipoproteingehaltes an bestimmten Regionen der Gefäßintima der Vorläufer für die Entstehung der sogenannten „fatty streaks“ [11]. Lipidreiche Partikel reichern sich dort nicht nur an, sondern können an Bestandteile der extrazellulären Gefäßwandmatrix binden, wodurch nicht nur die NO-Synthetase-Funktion eingeschränkt wird, sondern auch eine Oxidierung der Low-Density-Lipoproteins (LDL wird zu oxLDL) möglich wird [12]. Auch die erhöhte Thrombozytenaggregation in diesen Bereichen ist nachweislich maßgeblich an der Entstehung von Atheromen beteiligt. Monozyten stammen aus der myeloischen Reihe und machen ca. 6% der Leukozytenpopulation des Menschen aus. Sie können Zytokine sezernieren und besitzen die Fähigkeit zur Phagozytose [150]. Sie sind in der Lage, sich nicht nur zu Makrophagen oder dendritischen Zellen zu differenzieren, sondern auch zu Epithel-, Endothel- und Leberzellen [151]. Zirkulierende Monozyten im menschlichen Blut können in drei Gruppen eingeteilt werden, gemäß ihrer Oberflächenexpression von Lipopolysaccharid-(LPS)-CD14-Rezeptor und FcγIII-CD16-Rezeptor:

- klassische CD14⁺⁺ CD16⁻, (Hauptfraktion)
- intermediate CD14⁺⁺ CD16⁺
- nicht-klassische CD14⁺ CD16⁺⁺ Monozyten [152].

Vor allem die klassischen Monozyten sind für die Entstehung der Schaumzellen verantwortlich und generieren Sauerstoffradikale und Zytokine im Rahmen der Inflammation [153]. Das Vorkommen der Monozyten (vor allem der nicht

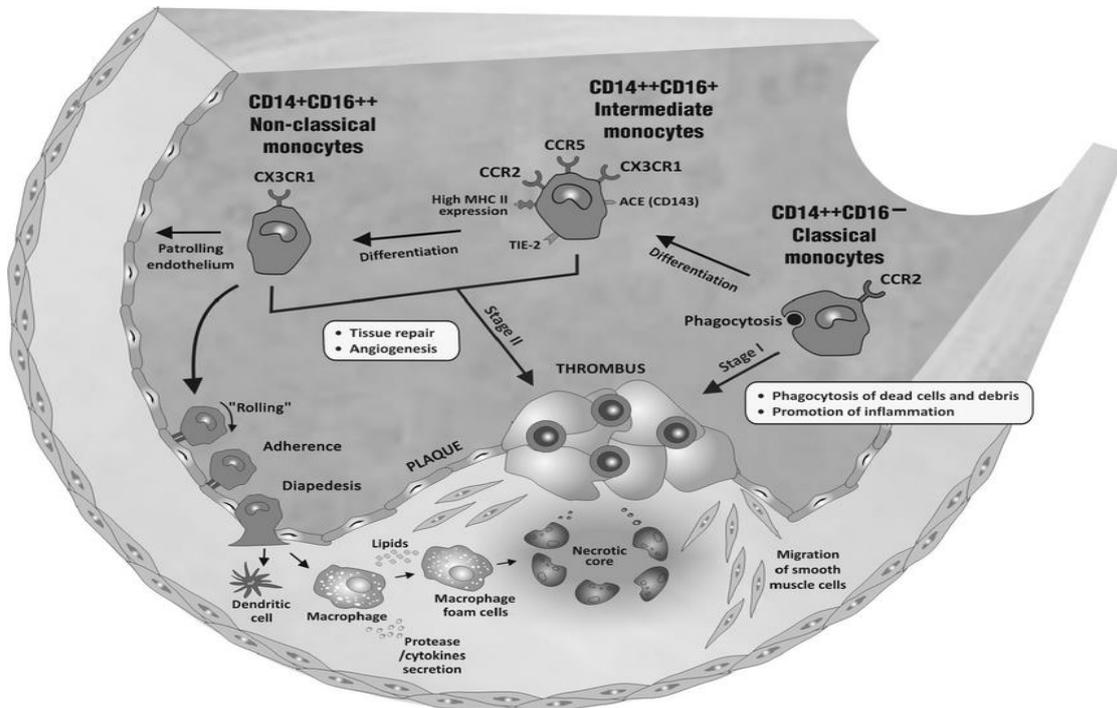


Abbildung 7: Monozyten-Subtypen und deren Rolle im akuten Koronargeschehen [155].

Sowohl klassische, nicht-klassische als auch intermediate-Monozyten sind an der Bildung eines Thrombus sowie der atherosklerotischen Plaques beteiligt. Klassische Monozyten können dabei direkt in die Thrombusentstehung eingehen, oder sich zu intermediate-Monozyten differenzieren. Diese wiederum gehen entweder direkt in den Aufbau eines Thrombus mit ein oder differenzieren sich weiter zu nicht-klassischen Monozyten; diese adhären zunächst am Gefäßendothel, nach erfolgter Diapedese erfolgt in der Intima bzw. Media die Bildung von Schaumzellen. Aus: Idzkowska E, Eljaszewicz A, Miklasz P, Musial WJ, Tycinska AM, Moniuszko M. The Role of Different Monocyte Subsets in the Pathogenesis of Atherosclerosis and Acute Coronary Syndromes. Scand J Immunol. 2015 Sep;82(3):163-73.

klassischen) korreliert positiv mit dem Körperfettanteil der Menschen und der Plaqueinstabilität sowohl bei stabiler als auch instabiler Angina pectoris [154],[155]. Der inflammatorische Prozess unterhalten durch Monozyten- bzw. Makrophagenaktivierung ist eine maßgebliche Grundlage bei der Entstehung von Atherosklerose und dem akuten Koronarsyndrom [156]. Zunächst sind die Monozyten noch zur mobilen Zirkulation im Blut fähig, sie verlieren diese Fähigkeit aber schnell, was mit verminderter CD11b/CD18-Expression einhergeht [157]. Die Entwicklung der Monozyten verläuft vom „klassischen“ Typ als unreife Form zum „nicht-klassischen“ Typ als reifste Form der Monozyten [158]. Dabei können letztere sich wiederum in zwei Arten

Makrophagen differenzieren. Hierbei handelt es sich einerseits um klassisch aktivierte Makrophagen (M1-Makrophagen) und alternativ aktivierte Makrophagen (M2-Makrophagen) [156]. M1-Zellen werden durch Zytokine wie INF γ und TNF von Th1-Helferlymphozyten aktiviert und so zur Produktion von IL-6, -10, -23, und reaktiven Sauerstoffspezies angeregt und besitzen zytotoxische und phagozytotische Eigenschaften [159]-[161]. M2-Zellen können durch Zytokine der Th2-Helferzellen wie IL-4, -10, -13 aktiviert werden [162]. Sie sind vor allem durch eine niedrige pro-inflammatorische Wirkung über IL-1, -6, -10 gekennzeichnet [160]. Die Progression atherosklerotischer Plaques wird sowohl von M1- als auch M2-Makrophagen vorangetrieben, M1-Zellen findet man aber vornehmlich an Stellen der Plaqueruptur, während man M2-Zellen vor allem im Bereich der Adventitia antreffen kann. Daher kann eine Verschiebung der M1:M2-Zell-Ratio zugunsten der M1-Zellen ein rascheres Voranschreiten der Atherosklerose bedeuten [163]. Resveratrol, ein Antioxidanz, kann die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen, eine erhöhte Inflammation und somit das Voranschreiten der Atherosklerose Gluthationspiegel-abhängig inhibieren [164]. Die Zahl der nicht klassischen Monozyten scheint deutlich erhöht bei Patienten, die ein ApoE4-Allel besitzen und somit genetisch an Hypercholesterinämie leiden [165]. Auch die Expression der Monozyten-Adhäsionsmoleküle wie CD11b und CD14 ist bei Hypercholesterinämie erhöht, was mit Beginn und Stadium der Atherosklerose korrelieren kann [166]. Patienten mit erhöhten LDL-Cholesterinspiegeln bzw. niedrigen HDL-Cholesterinspiegeln zeigen eine erhöhte Population der nicht-klassischen Monozyten, invers ist dies bei den klassischen Monozyten [167],[168]. Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz, Schlaganfällen und Diabetes mellitus weisen höhere Monozytenzahlen auf [169]. Das Vorkommen von CD16⁻ -Monozyten korreliert positiv mit der proinflammatorischen Wirkung, der Plaqueinstabilität und dem erhöhten kardiovaskulären Risiko, während CD16⁺ -Monozyten eine eher protektive und reparative Wirkung besitzen [170]. Erhöhte Lipoprotein-a (=Lp) Spiegel korrelieren stark positiv mit dem Auftreten der Atherosklerose. Bei diesen Patienten konnte eine erhöhte Anzahl von (intermediate) Monozyten nachgewiesen werden [171]. Während eines akuten Koronarsyndroms laufen stark erhöhte inflammatorische Prozesse ab, in denen

auch Monozytenaktivierung vorrangig stattfindet. Normalerweise findet diese im Rahmen der Infarktgeweberegeneration statt, kann jedoch, sofern anhaltend und exzessiv, schädigend auf das Herzkreislauf-System wirken und negative Auswirkungen auf die Vorwärtsleistung des Herzens haben [172]. Bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt ist in den ersten drei Post-Infarkttagen eine sehr große Monozytenpopulation messbar [173]; gerade klassische Monozyten scheinen hier bei Postinfarkt-Patienten die Inflammation zu unterstützen und somit auch eine nachfolgende eingeschränkte Herzpumpleistung zu bewirken [174]. Der molekulare Cross-Talk von Monozyten und Thrombozyten, zur sogenannten monocyte-platelet-aggregate-(MPA) Formation, ist ebenso elementar für die Entstehung atherosklerotischer Plaquebestandteile [175]. Medikamentöse Behandlung mit Aliskiren, ACE-Hemmern oder AT₁-Blockern können diese Effekte mindern, vermutlich durch eine verminderte Zahl an Monozyten [176].

1.7 Fragestellung der Dissertation

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Einfluss von Zytokinen der Cystein-Knot-Superfamilie in der koronaren Herzerkrankung und in der kalzifizierenden Aortenstenose zu bestimmen. Es werden hierzu FACS-Analysen von Thrombozyten und Monozyten aus dem Vollblut der jeweiligen Patienten untersucht. Retrospektiv werden die klinischen Parameter der Patienten wie Blutbild, Ergebnisse der klinischen Untersuchungen wie der Koronarangiographie und der transthorakalen Echokardiographie, Medikamentenanamnese, familiäre Vorbelastung sowie die kardiovaskulären Risikofaktoren mit einbezogen. Prospektiv wird nach Abschluss der Kohortenerhebung eine Follow-up Studie durchgeführt, mit dem Ziel, die molekularen Marker mit klinischen Endpunkten in Zusammenhang zu setzen und so eine Aussage über das klinische Outcome der Patienten und somit über das Risiko für erneute kardiovaskuläre Ereignisse zu treffen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patientenkollektiv

Es wurden 93 Patienten am Universitätsklinikum Tübingen im Rahmen einer klinischen Studie rekrutiert, um die Bedeutung der BMPs (BMP 2,4,7) und ihrer Interaktionspartner wie Gremlin 1 und 2 bei Patienten mit Aortenklappenstenose und koronarer Herzerkrankung darzustellen. Alle Patienten wurden entweder elektiv oder notfallmäßig einer Koronarangiographie unterzogen, gegebenenfalls mit anschließender Stentimplantation.

Eine weitere Subpopulation der Studie bilden Patienten mit hochgradiger Aortenstenose vor geplantem transfemoralem Aortenklappenersatz.

Eine koronare Herzerkrankung kann als stabile Angina Pectoris (SAP) oder als akutes Koronarsyndrom (ACS) symptomatisch werden. Das ACS äußert sich durch akuten Brustschmerz, Atemnot, Kaltschweißigkeit und gelegentlich auch einer Schocksymptomatik mit erhöhtem Puls, Hypotonie und reduzierter arterieller Sauerstoffsättigung.

Das ACS wird wie bereits oben dargestellt in folgende Gruppen unterteilt:

- Instabile Angina pectoris, mit neuer Symptomatik, neu aufgetretenen EKG-Veränderungen, keine myokardialen Nekrosemarker
- Akuter Myokardinfarkt, mit myokardialen Nekrosemarkern wie Troponin I ($>0,1\mu\text{g/l}$, Anstieg ca. 3h nach Beginn des Myokardinfarkts) oder Kreatinkinase CK (CK-Gesamt $>145\text{U/L}$ ♀/ $>170\text{U/L}$ ♂, CK-MB $>22\text{U/L}$ ♀/ 25U/L ♂, Anstieg ca. 2-4h nach Beginn des Myokardinfarkts)
- ST-Strecken-Elevations-Myokardinfarkt (STEMI)
- Nicht-ST-Strecken-Elevations-Myokardinfarkt (NSTEMI)

Patienten mit hochgradiger symptomatischer Aortenklappenstenose erhielten nach nicht-invasiver und invasiver Diagnostik dann einen interventionellen Aortenklappenersatz mittels TAVI, wenn die Indikation dazu zuvor im

interdisziplinären Heart Team bestehend aus Kollegen der Kardiologie, Herzchirurgie und Kardio-Anästhesie gestellt worden war.

Über die Gesamtdauer der Studie wurde zudem noch eine gesunde Kontrollgruppe mit 14 gesunden Probanden rekrutiert.

2.1.2 Studienprotokoll

Das Studienprotokoll ist durch die Ethikkommission der Eberhard-Karls Universität Tübingen genehmigt worden. Eine schriftliche Einverständniserklärung sowie ein Alter >18 Jahre waren Voraussetzung zur Teilnahme.

2.1.3 Geräte und Verbrauchsmaterial

1. Sarstedt S-Monovette CPDA, EDTA-Plasma
SARTEDET Aktiengesellschaft & Co., Deutschland
2. Venisystems Butterfly – 21
ABBOTT IRELAND, Sligo, Rep. of Irland
3. Multi- Adapter
SARTEDET Aktiengesellschaft & Co., Deutschland
4. Pipetten Eppendorf Reference
Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
5. Pipettenspitzen
Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
6. Polystyrene Round-Bottom Tube
Corning Scienc, Mexico
7. Zentrifuge HeraeusMultifuge 3S+
Georg Kästner Rottenbug Deutschland
8. BD FACS Calibur Flow Cytometer
BD Biosciences, Deutschland
9. BMP2 Polyclonal Antibody, FITC Conjugated, 100µg/ml
Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Deutschland
10. Rabbit Anti-BMP7 Polyclonal Antibody, Biotin Conjugated, 1µg/µl
Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Deutschland
11. Rabbit monoclonal antibody BMP4, 100µl
Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Deutschland
12. Gremlin 1 FITC-antibody, goat polyclonal
Santa Cruz Biotechnology, USA
13. Gremlin 2 FITC-antibody, goat polyclonal
Santa Cruz Biotechnology, USA
14. Flourescein Conjugated Streptavidin 1,0mg/ml
BIOTREND Chemikalien GmbH, Deutschland

15. Donkey Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor 488), 2mg/ml
Abcam, USA
16. PE Mouse Anti-Human CD42b
BD Pharmingen, Deutschland
17. Monoclonal anti-hCD14 Phycoerythin, 25µg/ml
R&D Systems, USA
18. Triton X-100, 0,1%
Sigma Aldrich, Steinheim
19. Paraformaldehyd 10% (PFA)
MERCK-Schuchardt, München
20. BD FACS Lysing solution
BD Biosciences, USA
21. Dulbeccos PBS
Life Technologies GmbH, Deutschland
22. Microsoft Windows 10 Home
Redmond, Vereinigte Staaten
23. Statistikprogramm SPSS 23
SPSS, Inc., Chicago, IL, Vereinigte Staaten

2.2 Methoden

2.2.1 Blutprobenverarbeitung der Kontroll- und Studiengruppen

Die Blutproben der gesunden Kontrollgruppe und die der Patienten wurden aus peripher-venösem Blut in CPDA-Röhrchen gewonnen, und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Bei den Patienten der Studiengruppe geschah dies periinterventionell während der Behandlung im Tübinger Herzkatheterlabor.

2.2.2 Vorbereitung der Substanzen für die Durchführung der Messung

Die Verwendung von BMP2-antibody, Gremlin1 + 2 antibody, CD42bPE, CD14PE, PBS und Triton X 0,1% wurde ohne vorherige Verdünnung vorgenommen.

Für alle anderen Substanzen, die für die Messung notwendig waren, wurden folgende Aufbereitungen oder Verdünnungen vorgenommen:

BMP4-antibody wurde 1:100 mit PBS-Lösung verdünnt; es wurde im Anschluss nur diese Verdünnung des Antikörpers benutzt.

BMP7-antibody wurde 1:20 mit PBS-Lösung verdünnt; es wurde im Anschluss nur diese Verdünnung des Antikörpers benutzt.

Als feste Salzkomponente geliefert wurde Streptavidin zunächst in 1ml Aqua dest. aufgelöst, und anschließend 1:20 mit PBS-Lösung verdünnt; es wurde im Anschluss nur diese Verdünnung des Sekundärantikörpers benutzt.

Alexa Fluor 488 wurde zunächst auf 1:10 mit PBS-Lösung verdünnt, man erhält also 200µg/ml; um auf die gewünschte Verdünnung von letztlich 1:400 zu kommen, war nur noch das Hinzugeben von 2,5µl der Erstverdünnung zum Überstand des FACS-Tubes, also 100µl, nötig.

Der Lysepuffer Lysing solution wurde 1:10 mit Aqua dest. verdünnt; es wurde im Anschluss nur diese Verdünnung des Lysepuffers verwendet.

Das PFA war in fester Form zunächst aufzulösen, 10g auf 100ml, so dass man eine 10% Lösung erhält. Diese wurde anschließend 1:10 mit Aqua dest. auf eine 1% Lösung verdünnt. Im Anschluss darauf wurde die 1% Lösung 50:50 mit PBS gemischt, sodass man das 0,5% PFA erhält, was man zum stoppen der Lösungen benötigt; es wurde im Anschluss nur diese Verdünnung verwendet.

2.2.3 Aufbereitung der Blutproben

Die Aufbereitung der Blutproben von sowohl Patienten-, als auch Kontrollkohorte erfolgte dem Versuchsaufbau folgend.

Für die Messung der CD14-positiven Zellen (v.a. Monozyten) wurden dem CPDA-Röhrchen 40µl Vollblut unverdünnt entnommen und direkt in die entsprechenden FACS-Tubes gefüllt.

Für die Messung der CD42bPE-positiven Zellen (v.a. Thrombozyten) wurde zunächst eine Zwischenverdünnung hergestellt; Man entnahm hierzu dem CPDA-Röhrchen 20µl Vollblut und verdünnte es auf 1:50 mit 980µl PBS-Lösung. Von dieser Verdünnung entnahm man wiederum 40µl verdünntes Blut und füllte es in die entsprechenden FACS-Tubes.

2.2.4 Verarbeitung der Blutproben mittels Durchflusszytometrie

Die Gruppierung der FACS-Tubes erfolgte einmal nach CD14-positiven Zellen (v.a. Monozyten) und CD42bPE-positiven Zellen (v.a. Thrombozyten). Diese zwei Gruppen wurden nochmals unterteilt, in permeabilisierte und nicht-permeabilisierte Zellen, was durch die Zugabe von 0,1% Triton X erfolgte oder eben nicht.

Für die Tubes, in denen die CD14-positiven Zellen gemessen wurden, wurde nach jeder Zugabe jeglicher Substanz ein kräftiges Vortexen durchgeführt aufgrund der erhöhten Konsistenz des Blutsubstrates mangels fehlender Verdünnung.

Anschließend wurden die Antikörper hinzugefügt, davon 5µl von Gremlin1-antibody, 5µl von Gremlin2-antibody, 2,5µl von BMP2-antibody (allesamt gelabelte Antikörper) sowie 1µl von BMP4-antibody und 10µl von BMP7-antibody (nicht-gelabelte Antikörper).

Der FACS-Tubes mit Zugabe der nicht-gelabelten Antikörper bedarf es danach einer Inkubation von 30min im Dunkeln bei Raumtemperatur.

Den FACS-Tubes mit Zugabe der gelabelten Antikörper wurden direkt noch die jeweiligen Thrombozyten- und Monozytenmarker hinzugeben, sowohl von CD14PE als auch CD42bPE jeweils 5µl. Auch diese Tubes wurden danach für 30min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach der Inkubationsphase können die FACS-Tubes, die die gelabelten Antikörper und Thrombozytenmarker CD42bPE enthalten, mit 300µl 0,5% PFA gestoppt werden und anschließend für maximal 2-3 Tage im Kühlschrank bei 2°C gelagert werden. Für die restlichen Tubes gestaltet sich die Arbeit zunächst biphasisch:

Zu den FACS-Tubes, die die gelabelten Antikörper mit Monozytenmarker CD14PE enthalten, werden nun 1000µl des verdünnten Lysepuffers gegeben, und anschließend für 5min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Tubes, die die nicht-gelabelten Antikörper mit sowohl Monozyten- als auch Thrombozytenmarker enthalten, wurden zunächst mit 1000µl PBS-Lösung gewaschen. Alle verbleibenden Tubes wurden im Anschluss darauf in der Zentrifuge 5min bei 1200rpm zentrifugiert und der daraus entstandene Überstand wurde abgekippt.

Die CD14PE-markierten Tubes der gelabelten Antikörper Gremlin 1,2 und BMP2 wurden danach mit 300µl PFA gestoppt und ebenfalls im Kühlschrank gelagert.

Die Tubes der Antikörper BMP4 und BMP7 wurden gelabelt: zu den BMP4-haltigen Tubes wurden 2,5µl des Sekundärantikörpers Alexa Fluor 488 hinzugefügt, und zu den BMP7-haltigen Tubes jeweils 5µl des Sekundärantikörpers Streptavidin. Im Folgenden wurden diese Tubes ebenfalls

entsprechend mit je 5µl CD14PE und CD42bPE markiert. Daraufhin folgte erneut eine Inkubationsphase von 30min im Dunkeln bei Raumtemperatur.

Zu den Tubes, die CD14PE-markiert waren, wurden 1000µl des Lysepuffers hinzugegeben mit dementsprechender Inkubation von 5min, und die CD42bPE-Tubes wurden erneut mit 1000µl PBS-Lösung gewaschen. Im Anschluss darauf wurden alle Tubes erneut für 5min bei 1200rpm zentrifugiert, der Überstand abgekippt. Auch hier erfolgte nun die Zugabe von je 300µl PFA zum Stoppen der Proben und anschließende Lagerung im Kühlschrank.

2.2.5 Funktionsweise und Durchführung der Durchflusszytometrie

Die Proben wurden spätestens zwei Tage nach Erstellung mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Dieses Verfahren der Zell-Vermessung erlaubt die genaue Analyse der Zellen bezüglich Form, Struktur, Färbung und Granularität, woraus sich wiederum spezielle Eigenschaften der Zellen ableiten lassen. Die Zellen strahlen ihrerseits optische Signale aus, nachdem sie einen Laserstrahl passieren. Das dabei entstehende Streulicht wird von einem Detektor verwertet; dies ermöglicht die Erfassung mehrerer hundert bis tausender Zellen pro Sekunde und somit qualitative und quantitative Aussagen über jede einzelne Zelle. Das Vorwärtsstreulicht FSC (Forward Scatter) gibt in Abhängigkeit vom Zellvolumen an, wie stark die Beugung des Lichts in einem flachen Winkel ist; das Seitwärtsstreulicht SSC (Sidewards Scatter) gibt in Abhängigkeit von der Zellgranularität die Brechung des Lichts im rechten Winkel an. Mit dem gestreuten Licht lassen sich auch Fluoreszenzfarben detektieren.

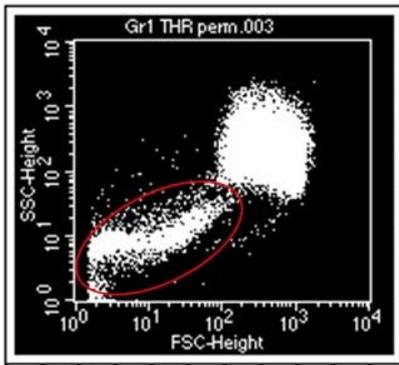
Wie auch in diesem Versuch sind diese Fluoreszenzfarbstoffe Markierungen von Antikörpern, die mit speziellen Oberflächenproteinen (CD = Cluster of differentiation) reagieren. Diese Antikörper tragen ein fluoreszierendes Molekül, welches aufleuchtet, wenn es vom Laser getroffen wird. Zur Untersuchung der wichtigen Thrombozyten und Monozyten für die Studie benötigt es hierfür die passenden Antikörper, die gegen die jeweils charakteristischen

Oberflächenproteine dieser Zellen gerichtet sind und an diese binden; für Thrombozyten wäre das also CD42b und für Monozyten CD14. Da wir nicht nur diese Zellen untersuchen, sondern auch nach Oberflächenproteinen der BMP- und Gremlinfamilie suchen, benötigt es zweierlei Färbungen der Zellen.

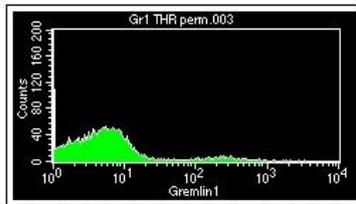
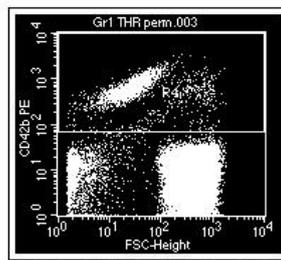
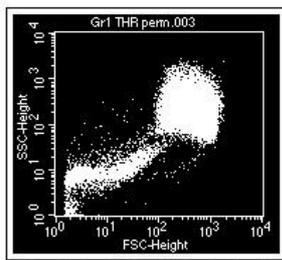
Zunächst die Markierung der Zellen und somit deren Demaskierung durch CD42b bzw. CD14, hierfür wurde PE (=Phycoerythrin) verwendet, welches rot leuchtet; und schließlich die zu untersuchenden Oberflächenproteine, BMP und Gremlin, jeweils an FITC (=Fluoreszein-Isothiocyanat) gekoppelt, welches grün leuchtet.

Eine Lyse, um die Erythrozyten zu zerstören, wurde nur für die Färbung der Monozyten vorgenommen, da diese verhältnismäßig weniger im peripheren Blutstrom vorhanden sind als Thrombozyten.

2.2.5.1. Analyse der Thrombozyten mittels Durchflusszytometrie

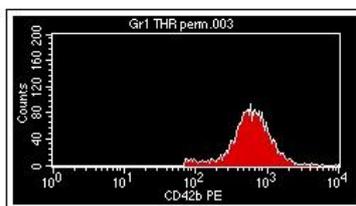


Anhand des Beispiels lässt sich der zu untersuchende Bereich erkennen (rote Markierung). Dieser zeigt die Überschneidung von sowohl FITC- als auch PE- Signalen und gibt somit an, wo und wie viele Thrombozyten die jeweiligen Oberflächenproteine BMP und Gremlin gebunden haben.



File: Gr1 THR perm.003 Log Data Units: Linear Values
 Panel: Untitled Acquisition Tube List Acquisition Date: 26-Oct-15
 Gate: G4 Gated Events: 10122
 Total Events: 146324 X Parameter: Gremlin1 (Log)

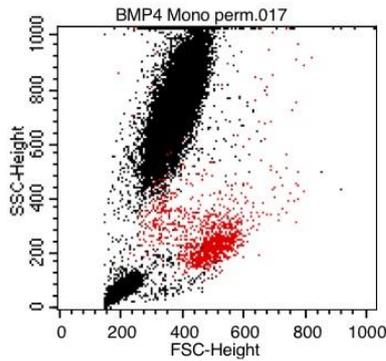
Events	% Gated	% Total	Mean	Median
10122	100.00	6.92	19.36	4.41



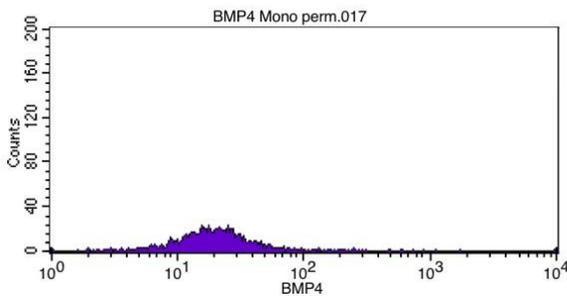
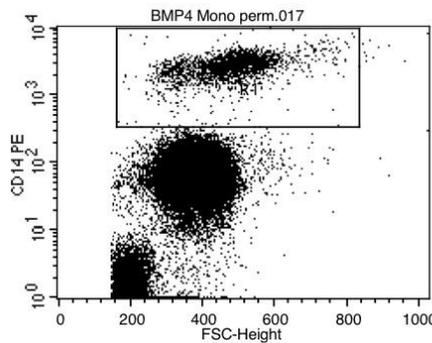
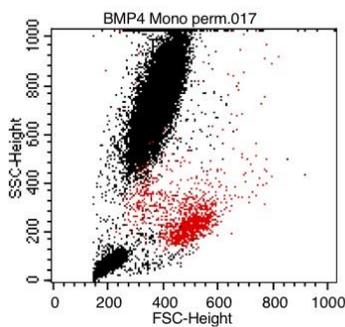
File: Gr1 THR perm.003 Log Data Units: Linear Values
 Panel: Untitled Acquisition Tube List Acquisition Date: 26-Oct-15
 Gate: G4 Gated Events: 10122
 Total Events: 146324 X Parameter: CD42b PE (Log)

Events	% Gated	% Total	Mean	Median
10122	100.00	6.92	652.31	567.42

2.2.5.2 Analyse der Monozyten mittels Durchflusszytometrie



Anhand des Beispiels lässt sich der zu untersuchende Bereich erkennen (rote Markierung). Dieser zeigt die Überschneidung von sowohl FITC- als auch PE-Signalen an und zeigt somit auf, wo und wie viele Monozyten wie stark die jeweiligen Oberflächenproteine BMP und Gremlin gebunden haben.



File: BMP4 Mono perm.017
 Sample ID: BMP4 Mono perm
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 26-Oct-15
 Gated Events: 2357
 X Parameter: BMP4 (Log)

Histogram Statistics

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Gate: G1
 Total Events: 36990

Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean
All	1	9910	2357	100.00	6.37	80.06	19.74

2.2.6 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung wurde mittels SPSS Statistik Software Version 23 (SPSS, Inc., Chicago, Illinois) vorgenommen. Kontinuierliche, normal verteilte Variablen wurden mittels t-Test verglichen und als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Kontinuierliche, nicht-normal verteilte Variablen wurden als Median und Interquartile range (IQR) dargestellt und mittels Mann-Whitney-Test verglichen. Kategorische Variablen wurden mittels Chi-Quadrat-Test analysiert und als absolute Zahlen und Prozentsätze angegeben. Für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde die ANOVA-Analyse verwendet, wobei die Post-Hoc-Analyse nach Bonferroni erfolgte. Korrelationen zweier Variablen wurden entweder mittels Spearmans-Rangkorrelationskoeffizient oder Pearson-Korrelationskoeffizient analysiert.

Unterschiede wurden als signifikant definiert bei einem p-Wert <0.05 , außer wenn anders angegeben. Für das Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen während des Nachverfolgungszeitraums erfolgte eine Kaplan-Meier-Analyse unter der Angabe des LogRanks.

3. Ergebnisse

3.1 Assoziationen der Gesamt- und Einzelkohorten mit demographischen Faktoren

Baseline Charakteristika der Patientenkohorte werden in Tabelle 2 aufgeführt (Gesamt n=93, SAP n=51, ACS n=30, Aortenstenose n=12).

Patienten mit Aortenstenose waren signifikant älter als ACS- und SAP-Patienten ($p < 0,001$ bei $82,7 \pm 4,2$ Jahren, SAP-Patienten $71,4 \pm 10,6$ Jahre, ACS-Patienten $66,3 \pm 13,0$ Jahre). Männliche Studienteilnehmer waren signifikant häufiger von einer SAP oder einem ACS betroffen als Frauen, Frauen hingegen waren öfter von einer Aortenklappenstenose betroffen ($p = 0,004$ bei $n = 31$ (70,5%) für männliche SAP-Patienten, $n = 14$ (66,7%) für weibliche Aortenstenosenpatienten). Anamnestisch erlitten Patienten mit SAP häufiger einen Myokardinfarkt, welcher mehr als 30 Tage zurückliegt, als ACS- oder Aortenstenosenpatienten ($p = 0,008$ bei $n = 15$ (34,9%), ACS-Patienten $n = 9$ (23,7%), Aortenstenosenpatienten $n = 0$). Auch wiesen SAP-Patienten häufiger bereits bekannte Koronarstenosen mit einer Stenose $> 50\%$ auf ($p < 0,001$, $n = 25$ (58,1%), ACS-Patienten $n = 10$ (26,3%), Aortenstenosen-Patienten $n = 2$ (9,5%)). Patienten mit ACS gaben innerhalb der 24 Stunden vor Intervention häufiger eine Ruheangina an ($p < 0,001$ bei $n = 22$ (57,9%), SAP-Patienten $n = 11$ (25,0%), Aortenstenosenpatienten $n = 0$). Eine signifikante Hyperlipidämie wiesen vor allem SAP-Patienten auf ($p = 0,004$ bei $n = 23$ (52,3%), ACS-Patienten $n = 17$ (44,7%), Aortenstenosenpatienten $n = 2$ (9,5%)). Eine vorhandene positive Familienanamnese bezüglich kardiovaskulärer Erkrankungen war signifikant bei den SAP-Patienten häufiger ($p = 0,050$ bei $n = 10$ (23,7%), ACS-Patienten $n = 9$ (22,7%), Aortenstenosenpatienten $n = 0$). Vorhofflimmern war häufiger bei Aortenstenosenpatienten als bei SAP- oder ACS-Patienten ($p = 0,012$ bei $n = 10$ (47,6%), SAP $n = 8$ (18,2%), ACS $n = 6$ (15,8%)). Der CRP-Wert war bei Aortenstenosenpatienten signifikant höher als bei SAP- und ACS-Patienten ($9,9 \pm 7,3$ mg/dl bei $p < 0,001$, $0,54 \pm 0,80$ mg/dl bei SAP-Patienten, $2,5 \pm 4,0$ mg/dl bei ACS-Patienten). Die Gesamt-CK war bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom höher als bei Patienten mit stabiler Angina pectoris oder

Aortenklappenstenose ($330,4 \pm 455,3$ U/L bei $p=0,003$, $103,3 \pm 67,5$ U/L bei SAP-Patienten, $133,5 \pm 132,6$ U/L bei Aortenstenosenpatienten). Patienten mit Aortenstenose wiesen signifikant höhere Kreatininwerte auf als SAP- oder ACS-Patienten ($1,7 \pm 0,65$ mg/dl bei $p=0,003$, $0,96 \pm 0,54$ mg/dl bei SAP-Patienten, $0,95 \pm 0,25$ mg/dl bei ACS-Patienten). Patienten mit stabiler Angina pectoris waren bei Aufnahme häufiger Statin-vorbehandelt ($p=0,007$ bei $n=30$ (78,9%), ACS-Patienten $n=15$ (48,4%), Aortenstenosenpatienten $n=5$ (33,3%)).

Tabelle 2: Baseline characteristics des Patientenkollektivs. Aufgeführt sind die relevanten Risikofaktoren, anamnestische Faktoren sowie Laborwerte und Medikation, jeweils aufgeteilt nach den drei Kohorten SAP, ACS und Aortenstenose. Signifikante Zusammenhänge sind mit jeweiligem p-Wert hervorgehoben.

Legende: mit *-versehene Charakteristika bedeuten: Mean-Wert \pm Standardabweichung. N=Anzahl, SAP=stabile Angina pectoris, ACS=akutes Koronarsyndrom, KHK=Koronare Herzerkrankung, TTE=transthorakales Echo, Kardiovask. Dekomp=Kardiovaskuläre Dekompensation, LVEDD=Left ventricular end-diastolic diameter, MI=Myokardinfarkt, PTCA=Perkutane Transluminale Koronar-Angioplastie, Bek.=Bekannt, Sign.=Signifikant, CV=Kardiovaskulär, CRP=C-reaktives Protein, CK=Kreatinkinase, LDL=Low-density lipoprotein, AT1=Angiotensin1, ACE=Angiotensin-Converting-Enzyme, OAD=orales Antidiabetikum, Peri=Periinterventionell.

Characteristics	Total	SAP	ACS	Aortenstenose	p-Wert
	N =93	N =51	N =30	N =12	
Demographische Daten					
Alter*	71,8 \pm 12,12	71,4 \pm 10,6	66,3 \pm 13,0	82,7 \pm 4,2	<0,001
Geschlecht – nr (%)					
Männlich	66 (64,1)	31 (70,5)	28 (73,7)	7 (33,3)	0,004

Weiblich	37 (39,5)	13 (29,5)	10 (26,3)	14 (66,7)	
Herzkatheterlabor –					
n(%)					
Ejektionsfraktion im TTE*	0,8 ± 1,0	0,7 ± 0,9	0,8 ± 1,0	1,1 ± 1,2	0,298
Grace Score*	126,5 ± 34,1	116,0 ± 27,1	120,8 ± 34,3	159,1 ± 27,6	<0,001
Kardiovaskul. Dekomp.	9 (9,4)	2 (4,5)	3 (7,9)	4 (28,6)	0,025
KHK-Typ					
Keine	9 (9,3)	2 (4,5)	5 (13,2)	2 (13,3)	0,021
Ein-Gefäß-KHK	12 (12,4)	5 (11,4)	6 (15,8)	1 (6,7)	
Zwei-Gefäß-KHK	27 (27,8)	8 (18,2)	10 (26,3)	9 (60,0)	
Drei-Gefäß-KHK	49 (50,5)	29 (65,9)	17 (44,7)	3 (20,0)	
Echobefunde					
LVEDD*	47,3 ± 8,3	48,8 ± 10,5	45,7 ± 6,3	47,3 ± 7,7	0,563
Sign. Aortenstenose - n(%)	10 (9,7)	0	0	10 (47,6)	<0,001
CV-Anamnese – n (%)					
MI älter als 30d	24 (23,5)	15 (34,9)	9 (23,7)	0	0,008
Bek. Stenose 50%	37 (36,3)	25 (58,1)	10 (26,3)	2 (9,5)	<0,001

Frühere PTCA	57 (55,3)	31 (70,5)	16 (42,1)	10 (47,6)	0,026
Ruheangina in 24h	33 (32,0)	11 (25,0)	22 (57,9)	0	<0,001
CV-Risikofaktoren – n					
(%)					
Hypertonie	78 (75,7)	33 (75,0)	31 (81,6)	14 (66,7)	0,436
Diabetes mellitus	31 (30,1)	16 (36,4)	11 (28,9)	4 (19,0)	0,356
Hyperlipidämie	42 (40,8)	23 (52,3)	17 (44,7)	2 (9,5)	0,004
Nikotinabusus	20 (19,4)	11 (25,0)	9 (23,7)	0	0,041
Positive Familienanamnese	19 (18,4)	10 (23,7)	9 (22,7)	0	0,050
Vorhofflimmern	24 (23,3)	8(18,2)	6 (15,8)	10 (47,6)	0,012
Niereninsuffizienz	6 (5,8)	3 (6,8)	1 (2,6)	2 (9,5)	0,520
Laborparameter					
Troponin I Aufnahme*	1,6 ± 5,3	0,02 ± 0,01	2,6 ± 6,6	0,06 ± 0,05	0,246
CRP Aufnahme*	3,6 ± 5,7	0,54 ± 0,80	2,5 ± 4,0	9,9 ± 7,3	<0,001
Gesamt-CK*	198,0 ± 309,4	103,3 ± 67,5	330,4 ± 455,3	133,5 ± 132,6	0,003
Kreatinin*	1,0 ± 0,51	0,96 ± 0,54	0,95 ± 0,25	1,7 ± 0,65	0,003

Cholesterin*	180,4 ± 40,7	177,3 ± 42,3	190,8 ± 36,3	175,1 ± 42,3	0,449
LDL-Cholesterin*	111,7 ± 42,0	107,7 ± 44,3	124,5 ± 39,9	106,9 ± 38,2	0,355
Thrombozytenzahl*	225092,7 ± 84868,2	214428,6 ± 59616,3	229378,0 ± 91221,0	238666,7 ± 113426,8	0,527
Medikation – n (%)					
(1=Aufnahme					
2=Entlassung)					
Aggregationshemmer1					
Keine	57 (67,1)	21 (55,3)	27 (84,4)	9 (60,0)	
Clopidogrel	16 (18,8)	9 (23,7)	3 (9,4)	4 (26,7)	0,117
Prasugrel	5 (5,9)	3 (7,9)	2 (6,2)	0	
Ticagrelor	7 (8,2)	5 (13,2)	0	2 (13,3)	
ASS 1	61 (72,6)	28 (73,7)	20 (64,5)	13 (86,7)	0,282
Statin±Ezetrol 1					
Keine	30 (35,7)	7 (18,4)	15 (48,4)	8 (53,3)	
Statin	50 (59,5)	30 (78,9)	15 (48,4)	5 (33,3)	0,007
Ezetrol	3 (3,6)	1 (2,6)	0	2 (13,3)	
Statin+Ezetrol	1 (1,2)	0	1 (3,2)	0	

Beta-Blocker 1	61 (72,6)	30 (78,9)	18 (58,1)	13 (86,7)	0,062
AT1-Blocker 1	21 (25,0)	13 (34,2)	4 (12,9)	4 (26,7)	0,125
ACE-Hemmer 1	52 (61,9)	22 (57,9)	21 (67,7)	9 (60,0)	0,694
Kalziumkanalantagon.1	20 (23,8)	11 (28,9)	5 (16,1)	4 (26,7)	0,443
Diuretika 1	44 (52,4)	18 (47,4)	12 (38,7)	14 (93,3)	0,002
Insulin±OAD 1					
Keine	68 (80,0)	29 (74,4)	26 (83,9)	13 (86,7)	
Insulin	6 (7,1)	1 (2,6)	3 (9,7)	2 (13,3)	0,133
Orales Antidiabetikum	9 (10,6)	8 (20,5)	1 (3,2)	0	
Insulin+OAD	2 (2,4)	1 (2,6)	1 (3,2)	0	
Aggregationshemmer 2					
Keine	14 (13,6)	7 (15,9)	7 (18,4)	0	
Clopidogrel	47 (45,6)	18 (40,9)	8 (21,1)	21 (100)	<0,001
Prasugrel	19 (18,4)	7 (15,9)	12 (31,6)	0	
Ticagrelor	23 (22,3)	12 (27,3)	11 (28,9)	0	
ASS 2	83 (80,6)	40 (90,9)	35 (92,1)	8 (38,1)	<0,001
Statin±Ezetrol 2					
Keine	16 (15,5)	4 (9,1)	6 (15,8)	6 (28,6)	
Statin	83 (80,6)	39 (88,6)	31 (81,6)	13 (61,9)	0,096
Ezetrol	3 (2,9)	1 (2,3)	0	2 (9,5)	
Statin+Ezetrol	1 (1,0)	0	1 (2,6)	0	

Beta-Blocker 2	87 (84,5)	38 (86,4)	33 (86,8)	16 (76,2)	0,501
AT1-Blocker 2	24 (23,3)	13 (29,5)	9 (23,7)	2 (9,5)	0,203
ACE-Hemmer 2	62 (60,2)	27 (61,4)	26 (68,4)	9 (42,9)	0,155
Kalziumkanalantagon.2	28 (27,2)	14 (31,8)	8 (21,1)	6 (28,6)	0,543
Diuretika 2	62 (60,2)	24 (54,5)	21 (55,3)	17 (81,0)	0,093
Insulin±OAD 2					
Keine	80 (78,4)	32 (74,4)	32 (84,2)	16 (76,2)	
Insulin	5 (4,9)	2 (4,7)	2 (5,3)	1 (4,8)	0,843
Orales Antidiabetikum	15 (14,7)	8 (18,6)	3 (7,9)	4 (19,0)	
Insulin+OAD	2 (2,0)	1 (2,3)	1 (2,6)	0	
Multiplate					
periinterventionell					
Peri Multiplate ADP*	30,5 ± 22,0	32,0 ± 20,5	35,6 ± 24,6	18,5 ± 15,0	0,013
Peri Multiplate Collagen*	48,9 ± 27,1	51,9 ± 26,5	54,7 ± 26,1	32,7 ± 24,5	0,007

3.2 Korrelationsmatrix der Patientenkollektive

Im Folgenden wurden die Kohorten aufgeteilt: Zunächst in die Gesamtkohorte, dann in die SAP-Gruppe, ACS- und Aortenstenosengruppe.

3.2.1 Korrelationsmatrix der Gesamtkohorte

Es wird in Tabelle 3 zunächst die Korrelationsmatrix der Kohorten aus SAP, ACS und Aortenstenose betrachtet.

Tabelle 3: Korrelationsmatrix-Analyse der Gesamtkohorte. Befunde der Untersuchungen im TTE, Herzkatheterlabor, sowie anamnestische Punkte, kardiovaskuläre Risikofaktoren, Laborparameter und Aufnahmemedikation wurden mit der Markerexprimierung verglichen. Negative Faktoren geben inverse Zusammenhänge an.
Legende: *-Markierung: $p \leq 0,05$, **-Markierung: $p \leq 0,01$. BMP=Bone Morphogenetic Protein, Mo=Monozyten, Thr=Thrombozyten, P=Permeabilisiert, NP=nicht-permeabilisiert, Gr=Gremlin, LVEDD=Left ventricular end-diastolic diameter, MI=Myokardinfarkt, CRP=C-reaktives Protein, LDL=Low-density lipoprotein, ACE=Angiotensin-Converting-Enzyme, Aldosteron-Antago.=Aldosteron-Antagonist, 1=Aufnahmemedikation.

	BMP2MoP	BMP2MoNP	BMP7MoNP	Gr1ThrP	Gr1ThrNP	Gr1MoP	Gr1MonNP	Gr2ThrP	Gr2ThrNP	Gr2MonP	Gr2MonNP
Aortenstenose	0,016	-0,011	0,102	0,279**	0,281**	0,197*	0,266**	0,147	0,045	0,194	0,223*
LVEDD	-0,037	0,087	-0,109	0,118	0	0,067	0,333*	0,007	0,006	-0,025	0,173
MI älter als 30d	0,134	0,268**	-0,017	-0,128	0,259**	0,209*	-0,183	0,215*	-0,126	-0,165	-0,069
Hypertonie	-0,158	0,016	-0,112	-0,106	-0,046	-0,187	-0,109	-0,147	-0,058	0,215*	-0,174
Hyperlipidämie	-0,169	-0,057	-0,121	0,205*	-0,143	0,236*	0,215*	0,225*	-0,15	0,255**	0,276**
Vorhofflimmern	0,052	0,016	0,04	0,200*	0,353**	0,313**	0,294**	0,298**	0,213*	0,290**	0,242*
Troponin I Aufnahme	0,114	0,107	0,376**	-0,06	0,296*	0,039	0,077	0,320*	0,377*	-0,019	0,054
CRP	-0,013	-0,063	0,097	0,299**	0,335**	0,249*	0,175	0,312**	0,158	0,226*	0,366**
Kreatinin	-0,147	-0,177	-0,087	0,034	0,052	0,021	0,373**	-0,022	0,247*	-0,005	0,153
Cholesterin	-0,072	-0,079	0,316**	0,248*	-0,092	-0,192	-0,155	-0,166	-0,224	-0,188	-0,238
LDL-Cholesterin	-0,064	-0,094	0,240*	-0,226	-0,068	-0,146	-0,129	-0,097	-0,145	-0,106	-0,187
Thrombozyten	-0,105	-0,042	0,288**	-0,06	0,261**	-0,192	-0,04	0,268**	0,256*	-0,178	-0,084
Statin±Ezetrol 1	0,353**	0,311**	-0,07	-0,2	-0,173	-0,128	-0,128	-0,174	-0,101	-0,165	-0,127
ASS 1	-0,189	-0,154	-0,034	0,102	-0,155	-0,101	0,037	0,269*	-0,213	-0,067	-0,115
beta-Blocker 1	0,255*	-0,217	0,101	0,058	0,134	0,129	0,063	-0,022	-0,058	0,046	-0,029
ACE-Hemmer 1	0,289*	0,202	0,13	0,071	-0,101	-0,165	0,026	-0,158	0,257*	0,015	0,074
Aldosteron-Antago. 1	0,241*	0,294**	-0,06	-0,162	0,065	0,096	-0,166	0,13	0,174	-0,156	-0,06

3.2.1.1. Korrelationen von Gremlin-1-Expression auf Thrombozyten

Das Vorliegen einer Aortenstenose korreliert signifikant mit thrombozytärer Gremlin1-Exprimierung ($r=0,281$, $p \leq 0,01$ bei permeabilisierten Zellen, $r=0,197$, $p \leq 0,05$ bei nicht-permeabilisierten Zellen). Anamnestisch vorhandene Myokardinfarkte, welche länger als 30 Tage zurückliegen, korrelieren invers mit

thrombozytären Vorkommen von Gremlin1 ($r=-0,259$, $p\leq 0,01$ bei permeabilisierten Zellen, $r=-0,209$, $p\leq 0,05$ bei nicht-permeabilisierten Zellen). Hyperlipidämie als kardiovaskulärer Risikofaktor korreliert invers mit Gremlin1-Vorkommen auf Thrombozyten ($r=-0,236$, $p\leq 0,05$ bei nicht-permeabilisierten Zellen). Vorhofflimmern korreliert signifikant mit erhöhter Gremlin1-Expression auf Thrombozyten ($r=0,353$, $p\leq 0,01$ bei permeabilisierten Zellen, $r=0,313$, $p\leq 0,01$ bei nicht-permeabilisierten Zellen). Die Höhe des Troponin-I Wertes korreliert signifikant mit thrombozytärer Gremlin1-Expression ($r=0,296$, $p\leq 0,05$ bei permeabilisierten Zellen). Ein erhöhter CRP-Wert korreliert signifikant mit thrombozytärer ($r=0,335$, $p\leq 0,01$ bei permeabilisierten Zellen, $r=0,249$, $p\leq 0,05$ bei nicht-permeabilisierten Zellen) Gremlin1-Expression. Die Zahl der Thrombozyten korreliert invers mit thrombozytärer Expression von Gremlin1 ($r=-0,261$, $p\leq 0,01$ bei permeabilisierten Zellen). Die übrigen Parameter zeigten keine relevanten Korrelationen.

3.2.1.2 Korrelationen von Gremlin1-Expression auf Monozyten

Eine vorhandene Aortenstenose als Risikofaktor korreliert signifikant mit monozytärer Gremlin1-Expression ($r=0,279$, $p\leq 0,01$ bei nicht-permeabilisierten Zellen, $r=0,266$, $p\leq 0,01$ bei permeabilisierten Zellen). Der Left-ventricular end-diastolic diameter (LVEDD) korreliert signifikant mit monozytären Gremlin1-Vorkommen ($r=0,333$, $p\leq 0,05$ bei permeabilisierten Zellen). Das Vorhandensein von Hyperlipidämie korreliert jeweils invers signifikant mit den Expressionen von Gremlin1 auf Monozyten ($r=-0,205$, $p\leq 0,05$ bei nicht-permeabilisierten Zellen, $r=-0,215$, $p\leq 0,05$ bei permeabilisierten Zellen). Nachgewiesenes Vorhofflimmern korreliert signifikant mit Gremlin1-Vorkommen auf Monozyten ($r=0,200$, $p\leq 0,05$ bei nicht-permeabilisierten Zellen, $r=0,294$, $p\leq 0,01$ bei permeabilisierten Zellen). Die Höhe des CRP-Wertes korreliert signifikant mit der Expression von Gremlin1 ($r=0,299$, $p\leq 0,01$ bei nicht-permeabilisierten Zellen). Die Höhe des Kreatinin-Wertes korreliert signifikant mit monozytärer Gremlin1-Vorkommen ($r=0,373$, $p\leq 0,01$ bei permeabilisierten Zellen). Der Gesamt-Cholesterin Wert korreliert invers mit Gremlin1-Expression ($r=-0,248$, $p\leq 0,05$). Die anderen Parameter ergaben keine signifikanten Korrelationen mit monozytärer Gremlin1-Expression.

3.2.1.3 Korrelationen von Gremlin2-Expression auf Thrombozyten

Myokardinfarkte in der Anamnese, welche länger als 30 Tage zurückliegen, korrelieren signifikant mit thrombozytärer Expressierung von Gremlin2 ($r=-0,215$, $p\leq 0,05$ bei permeabilisierten Zellen). Hyperlipidämie als kardiovaskulärer Risikofaktor korreliert signifikant invers mit Gremlin2-Vorkommen auf Thrombozyten ($r=-0,225$, $p\leq 0,05$ bei permeabilisierten Zellen). Vorhofflimmern korreliert signifikant mit erhöhten Gremlin2-Expressierungen auf Thrombozyten ($r=0,298$, $p\leq 0,01$ bei permeabilisierten Zellen, $r=0,213$, $p\leq 0,05$ bei nicht-permeabilisierten Zellen). Die Höhe des Troponin I-Wertes bei Aufnahme korreliert signifikant mit thrombozytärer Gremlin2-Expressierung ($r=0,320$, $p\leq 0,05$ bei permeabilisierten Zellen, $r=0,377$, $p\leq 0,05$ bei nicht-permeabilisierten Zellen). Der CRP-Wert korreliert signifikant mit Gremlin2-Vorkommen auf Thrombozyten ($r=0,312$, $p\leq 0,01$ bei permeabilisierten Zellen). Die Höhe des Kreatinin-Wertes korreliert signifikant mit thrombozytärer Gremlin2-Expression ($r=0,247$, $p\leq 0,05$ bei nicht-permeabilisierten Zellen). Die Expressierung von Gremlin 2 auf Thrombozyten ($r=-0,268$, $p\leq 0,05$ bei permeabilisierten Zellen, $r=-0,256$, $p\leq 0,05$ bei nicht-permeabilisierten Zellen) korreliert signifikant invers mit der Zahl der Thrombozyten. Die Einnahme von ASS (Aspirin) bei Aufnahme korreliert signifikant invers mit thrombozytärer Gremlin2-Expression ($r=-0,269$, $p\leq 0,05$ bei permeabilisierten Zellen), die Einnahme von ACE-Hemmern bei Aufnahme korreliert invers signifikant mit Gremlin2-Vorkommen auf Thrombozyten ($r=-0,257$, $p\leq 0,05$ bei nicht-permeabilisierten Zellen). Die übrigen Parameter zeigen keine relevanten signifikanten Korrelationen.

3.2.1.4 Korrelationen von Gremlin2-Expression auf Monozyten

Eine Aortenstenose als Risikofaktor korreliert signifikant mit monozytärer Gremlin2-Expression ($r=0,223$, $p\leq 0,05$, nicht-permeabilisierter Zellen). Der kardiovaskuläre Risikofaktor Hypertonie korreliert invers signifikant mit monozytären Gremlin2-Vorkommen ($r=-0,215$, $p\leq 0,05$ bei permeabilisierten Zellen). Hyperlipidämie als weiterer Risikofaktor korreliert signifikant invers mit Gremlin2-Expressierung auf Monozyten ($r=-0,255$, $p\leq 0,01$ bei permeabilisierten Zellen, $r=-0,276$, $p\leq 0,01$ bei nicht-permeabilisierten Zellen). Nachgewiesenes

Vorhofflimmern korreliert signifikant mit monozytären Gremlin2-Vorkommen ($r=0,290$, $p\leq 0,01$ bei permeabilisierten Zellen, $r=0,242$, $p\leq 0,05$ bei nicht-permeabilisierten Zellen). Erhöhte CRP-Werte korrelieren signifikant mit monozytärer ($r=0,226$, $p\leq 0,05$ bei permeabilisierten Zellen und $r=0,366$, $p\leq 0,05$ bei nicht-permeabilisierten Zellen) Gremlin2-Expression. Für die anderen Parameter ergaben sich keine signifikanten Korrelationen in Bezug auf monozytäre Gremlin2-Expression.

3.2.1.5 Korrelationen von BMP2-Expression auf Monozyten

Myokardinfarkte, die älter als 30 Tage sind, korrelieren signifikant mit monozytären BMP2-Vorkommen ($r=0,268$, $p\leq 0,01$ bei nicht-permeabilisierten Zellen). Die Einnahme eines Cholesterinsenkenden-Medikamentes bei Aufnahme korreliert signifikant invers mit BMP2-Expression auf Monozyten ($r=-0,353$, $p\leq 0,01$ bei permeabilisierten Zellen, $r=-0,311$, $p\leq 0,01$ bei nicht-permeabilisierten Zellen). Beta-Blocker-Einnahme bei Krankenhausaufnahme korreliert signifikant invers mit monozytären BMP2-Vorkommen ($r=-0,255$, $p\leq 0,05$ bei permeabilisierten Zellen), ACE-Hemmer-Einnahme bei Aufnahme korreliert ebenso signifikant ($r=0,289$, $p\leq 0,05$ bei permeabilisierten Zellen). Monozytäre BMP2-Expression korreliert signifikant invers mit der Einnahme von Aldosteron-Antagonisten bei Aufnahme ($r=-0,241$, $p\leq 0,05$ bei permeabilisierten Zellen, $r=-0,294$, $p\leq 0,01$ bei nicht-permeabilisierten Zellen). Für die anderen Parameter ergaben sich keine relevanten Korrelationen.

3.2.1.6 Korrelationen von BMP7-Expression auf Monozyten

Der Troponin-I-Wert bei Aufnahme korreliert signifikant mit monozytärer BMP7-Expression ($r=0,376$, $p\leq 0,01$ bei nicht-permeabilisierten Zellen). Der Gesamt-Cholesterin-Wert korreliert signifikant invers bei nicht-permeabilisierten Monozyten mit BMP7-Vorkommen ($r=-0,316$, $p\leq 0,01$), ebenso wie die Höhe des LDL-Cholesterin-Wertes signifikant invers mit BMP7-Exprimierung auf Monozyten korreliert ($r=-0,240$, $p\leq 0,05$ bei nicht-permeabilisierten Zellen). Die Zahl der Thrombozyten korreliert signifikant invers mit monozytärer Expression von BMP7 ($r=-0,288$, $p\leq 0,01$ bei nicht-permeabilisierten Zellen). Für die

anderen Parameter ergaben sich keine signifikanten Ergebnisse.

3.2.1.7 Korrelationen von BMP4-Expression auf Monozyten und Thrombozyten

Für BMP4 ergaben sich weder für Monozyten noch Thrombozyten bei allen Parametern statistisch signifikante Zusammenhänge.

3.2.2 Korrelationsmatrix der SAP-Kohorte

Mit Tabelle 4 wird die Korrelationsmatrix der SAP-Kohorte (stabile Angina Pectoris) untersucht. Es werden hier Signifikanzen überprüft, inwiefern die elf Marker, die vorher als statistisch signifikant demaskiert wurden, mit den gleichzeitig statistisch signifikant relevanten Kriterien der Echobefunde, Laborparameter, Herzkatheterlaboruntersuchung, kardiovaskulären Risiken etc. korrelieren.

Tabelle 4: Korrelationsmatrix-Analyse der Kohorte mit SAP. Befunde der Untersuchungen im TTE, sowie anamnestische Punkte, kardiovaskuläre Risikofaktoren, Laborparameter und Aufnahmemedikation wurden mit der Markerexprimierung verglichen. Negative Faktoren geben inverse Zusammenhänge an.

Legende: *-Markierung: $p \leq 0,05$, **-Markierung: $p \leq 0,01$. BMP=Bone Morphogenetic Protein, Mo=Monozyten, Thr=Thrombozyten, P=Permeabilisiert, NP=nicht-permeabilisiert, Gr=Gremlin, LVEDD=Left ventricular end-diastolic diameter, MI=Myokardinfarkt, CRP=C-reaktives Protein, Max.=Maximalwert, 1=Aufnahmemedikation.

	BMP2MoP	BMP2MoNP	BMP7MoNP	Gr1ThrP	Gr1ThrNP	Gr1MoP	Gr1MonNP	Gr2ThrP	Gr2ThrNP	Gr2MonP	Gr2MonNP
LVEDD	0,18	0,353	0,096	0,345	0,331	0,255	0,329	0,634**	0,665**	0,598**	0,429
MI älter als 30d	0,081	0,348*	0	-0,028	-0,169	-0,083	-0,075	-0,181	-0,094	0,047	0,075
Hypertonie	0,383*-	-0,147	-0,114	0,068	0,093	-0,076	0,076	-0,072	-0,006	-0,006	-0,002
Vorhofflimmern	0,055	0,103	0,074	0,209	0,367*	0,195	0,299*	0,311*	0,195	0,162	0,065
CRP	0,209	0,168	0,252	-0,055	0,229	0,374*	-0,091	0,14	-0,105	0,051	-0,025
Troponin I Max.	0,154	0,108	-0,011	0,081	0,334	0,543*	0,286	0,531	0,509	0,081	0,111
Kreatinin	-0,07	-0,019	-0,065	-0,035	-0,132	0,305*	0,733**	-0,116	0,632**	0,019	0,463**
Triglyceride	-0,061	-0,147	0,439**	-0,068	-0,247	-0,22	-0,004	-0,145	-0,116	0,057	0,143
Thrombozyten	0,134	0,185	-0,112	-0,106	-0,051	-0,114	0,044	0,316*-	-0,184	-0,154	-0,035
ASS 1	0,071	0,093	0,071	0,104	0,420**-	-0,202	0,128	0,332*-	-0,153	0,071	0,065

3.2.2.1 Korrelationen von Gremlin1-Expression auf Thrombozyten

Hatten Patienten Vorhofflimmern, so korreliert dies signifikant mit thrombozytärer Gremlin1-Expression ($r=0,367$, $p\leq 0,05$ bei permeabilisierten Zellen). Der CRP-Wert und der maximale Troponin-I-Wert während des Krankenhausaufenthalts korrelieren jeweils signifikant mit thrombozytärer Gremlin1-Expression ($r=0,374$, $p\leq 0,05$ bei nicht-permeabilisierten Zellen für CRP, $r=0,543$, $p\leq 0,05$ bei nicht-permeabilisierten Zellen für Troponin). Die Höhe des Kreatinin-Wertes korreliert signifikant mit Gremlin1-Expression auf Thrombozyten ($r=0,305$, $p\leq 0,05$ bei nicht-permeabilisierten Zellen). Waren Patienten bei Krankenhausaufnahme bereits mit ASS-Medikation versorgt, so korreliert dies signifikant invers mit thrombozytären Gremlin1-Vorkommen ($r=-0,420$, $p\leq 0,01$ bei permeabilisierten Zellen). Für die anderen Parameter ergaben sich in dieser Konstellation keine weiteren signifikanten Ergebnisse.

3.2.2.2 Korrelationen von Gremlin1-Expression auf Monozyten

Das Vorhandensein von Vorhofflimmern als kardiovaskulärer Risikofaktor korreliert signifikant mit monozytärer Gremlin1-Expression ($r=0,299$, $p\leq 0,05$ bei permeabilisierten Zellen). Die Höhe des Kreatinin-Wertes korreliert signifikant mit Gremlin1-Vorkommen auf Monozyten ($r=0,733$, $p\leq 0,01$ bei permeabilisierten Zellen). Die anderen Parameter lieferten in dieser Konstellation keine relevanten Ergebnisse.

3.2.2.3 Korrelationen von Gremlin2-Expression auf Thrombozyten

Der Left-ventricular end-diastolic diameter (LVEDD) korreliert signifikant mit Gremlin2-Expression auf Thrombozyten ($r=0,634$, $p\leq 0,01$ bei permeabilisierten Zellen, $r=0,665$, $p\leq 0,01$ bei nicht-permeabilisierten Zellen). Vorhofflimmern als anamnestischer Parameter korreliert signifikant mit Gremlin2-Vorkommen auf Thrombozyten ($r=0,311$, $p\leq 0,05$ bei permeabilisierten Zellen). Die Höhe des Kreatinin-Wertes korreliert signifikant mit Gremlin2-Expression auf Thrombozyten ($r=0,632$, $p\leq 0,01$ bei nicht-permeabilisierten Zellen). War die Zahl der Thrombozyten erhöht, so korreliert dies invers signifikant mit thrombozytärer Gremlin2-Expression ($r=-0,316$, $p\leq 0,05$ bei permeabilisierten

Zellen). Waren Patienten bei Krankenhausaufnahme bereits mit ASS-Medikation versorgt, so korreliert dies signifikant invers mit thrombozytären Gremlin2-Vorkommen ($r=-0,322$, $p\leq 0,05$ bei permeabilisierten Zellen). Die anderen Parameter liefern keine signifikanten Ergebnisse.

3.2.2.4 Korrelationen von Gremlin2-Expression auf Monozyten

Der Left-ventricular end-diastolic diameter (LVEDD) korreliert signifikant mit Gremlin2-Expression auf Monozyten ($r=0,598$, $p\leq 0,01$ bei permeabilisierten Zellen). Die Höhe des Kreatinin-Wertes korreliert signifikant mit monozytären Gremlin2-Vorkommen ($r=0,463$, $p\leq 0,01$ bei nicht-permeabilisierten Zellen). Für die anderen Parameter ergaben sich keine relevanten Ergebnisse.

3.2.2.5 Korrelationen von BMP2-Expression auf Monozyten

Wiesen Patienten in ihrer kardiovaskulären Vorgeschichte einen Myokardinfarkt auf, welcher länger als 30 Tage zurückliegt, so korreliert dies signifikant mit monozytären BMP2-Vorkommen ($r=0,348$, $p\leq 0,05$ bei nicht-permeabilisierten Zellen). Bei Patienten mit Hypertonie als kardiovaskulärem Risikofaktor ergab sich eine signifikant inverse Korrelation mit monozytärer BMP2-Expression ($r=-0,383$, $p\leq 0,05$ bei permeabilisierten Zellen). Für die restlichen Parameter ergaben sich keine weiteren signifikanten Korrelationen.

3.2.2.6 Korrelationen von BMP7-Expression auf Monozyten

Der Triglycerid-Wert korreliert signifikant mit monozytären BMP7-Vorkommen ($r=0,439$, $p\leq 0,01$ bei nicht-permeabilisierten Zellen). Die anderen Parameter ergaben keine signifikanten Ergebnisse.

3.2.2.7 Korrelationen von BMP4-Expression auf Monozyten und Thrombozyten

Für BMP4 ergaben sich weder für Monozyten noch Thrombozyten bei allen Parametern statistisch signifikante Zusammenhänge.

3.2.3 Korrelationsmatrix der ACS-Kohorte

Des Weiteren wird nun die Kohorte der Patienten mit akutem Koronarsyndrom näher untersucht, inwiefern Kofaktoren und Risikofaktoren mit den einzelnen Markern korrelieren.

Tabelle 5: Korrelationsmatrix-Analyse der Kohorte mit ACS. Befunde der Untersuchungen im TTE, sowie kardiovaskuläre Risikofaktoren, Laborparameter und Aufnahmemedikation wurden mit der Markerexprimierung verglichen. Negative Faktoren geben inverse Zusammenhänge an.

Legende: *-Markierung: $p \leq 0,05$, **-Markierung: $p \leq 0,01$. BMP=Bone Morphogenetic Protein, Mo=Monozyten, Thr=Thrombozyten, P=Permeabilisiert, NP=nicht-permeabilisiert, Gr=Gremlin, LVEDD=Left ventricular end-diastolic diameter, Aldosteron-Antago.=Aldosteron-Antagonist, 1=Aufnahmemedikation.

	BMP2MoP	BMP2MoNP	BMP7MoNP	Gr1ThrP	Gr1ThrNP	Gr1MoP	Gr1MonNP	Gr2ThrP	Gr2ThrNP	Gr2MonP	Gr2MonNP
LVEDD	-0,018	0,132	0,095	0,559*	0,512*	0,208	0,758**	0,635**	-0,128	0,186	0,327
Hypertonie	0,098	0,166	-0,118	-0,307	0,226	-0,019	-0,304	0	0,052	0,394*-	-0,304
Hyperlipidämie	-0,158	-0,115	-0,052	-0,264	-0,01	-0,025	0,330*-	-0,112	0,03	0,386*-	0,427**-
Troponin Aufnahme	0,039	0,057	0,528**	-0,066	0,441*	0,009	0,163	0,315	0,398*	0,001	0,034
Statin±Ezetrol 1	0,423*-	0,516**-	0,027	-0,129	0,156	0,157	-0,167	0,029	0,08	-0,101	-0,113
ASS 1	0,428*-	0,372*-	-0,102	-0,051	-0,004	0,02	-0,236	-0,18	-0,212	0,380*-	-0,228
Aldosteron-Antago. 1	0,432*-	0,386*-	-0,228	-0,271	-0,108	-0,062	-0,355	-0,124	0	0,293	0,371*-

3.2.3.1 Korrelationen von Gremlin1-Expression auf Thrombozyten

Der LVEDD korreliert signifikant mit thrombozytärer Gremlin1-Expression ($r=0,512$, $p \leq 0,05$ bei permeabilisierten Zellen). Der Troponin-I-Wert bei Krankenhausaufnahme korreliert signifikant mit thrombozytären Gremlin1-Vorkommen ($r=0,441$, $p \leq 0,05$ bei permeabilisierten Zellen). Für die restlichen Parameter ergaben sich keine relevanten Ergebnisse.

3.2.3.2 Korrelationen von Gremlin1-Expression auf Monozyten

Der LVEDD korreliert signifikant mit Gremlin1-Vorkommen auf Monozyten ($r=0,758$, $p \leq 0,01$ bei permeabilisierten, $r=0,559$, $p \leq 0,05$ bei nicht-permeabilisierten Zellen). War bei Patienten eine Hyperlipidämie bekannt, so korreliert dies invers signifikant mit monozytärer Gremlin1-Exprimierung ($r=-0,330$, $p \leq 0,05$ bei permeabilisierten Zellen). Die restlichen Parameter liefern keine relevanten Korrelationen.

3.2.3.3 Korrelationen von Gremlin2-Expression auf Thrombozyten

Der Left-ventricular end-diastolic diameter (LVEDD) korreliert signifikant mit thrombozytären Gremlin2-Vorkommen ($r=0,635$, $p\leq 0,01$ bei permeabilisierten Zellen). Der Troponin-I-Wert bei Krankenhausaufnahme korreliert signifikant mit Gremlin2-Expression auf Thrombozyten ($r=0,398$, $p\leq 0,05$ bei nicht-permeabilisierten Zellen). Für die restlichen Parameter ergaben sich keine signifikanten Ergebnisse.

3.2.3.4 Korrelationen von Gremlin2-Expression auf Monozyten

Wiesen Patienten als Risikofaktor eine arterielle Hypertonie auf, so korreliert dies signifikant invers mit monozytärer Gremlin2-Expression ($r=-0,394$, $p\leq 0,05$ bei permeabilisierten Zellen). War bei Patienten eine Hyperlipidämie bekannt, so korreliert dies invers signifikant mit monozytärer Gremlin2-Exprimierung ($r=-0,386$, $p\leq 0,05$ für permeabilisierte, $r=-0,427$, $p\leq 0,01$ für nicht-permeabilisierte Zellen). Des Weiteren korreliert die Einnahme bei Aufnahme von ASS signifikant invers mit monozytärer Gremlin2-Expression ($r=-0,380$, $p\leq 0,05$ bei permeabilisierten Zellen). Aldosteron-Antagonisten-Einnahme zum Aufnahmezeitpunkt korreliert signifikant invers mit Gremlin2-Vorkommen auf Monozyten ($r=-0,371$, $p\leq 0,05$ bei nicht-permeabilisierten Zellen). Die restlichen Parameter liefern keine signifikanten Korrelationen.

3.2.3.5 Korrelationen von BMP2-Expression auf Monozyten

Cholesterinsenkende-Medikamenteneinnahme zum Aufnahmezeitpunkt (zum Beispiel Statine und/oder Ezetrol) korreliert dabei signifikant invers mit monozytärer BMP2-Expression ($r=-0,423$, $p\leq 0,05$ bei permeabilisierten, $r=-0,516$, $p\leq 0,01$ bei nicht-permeabilisierten Zellen). Des Weiteren korreliert die Einnahme bei Aufnahme von ASS signifikant invers mit monozytärer BMP2-Exprimierung ($r=-0,428$, $p\leq 0,05$ bei permeabilisierten, $r=-0,372$, $p\leq 0,05$ bei nicht-permeabilisierten Zellen). Aldosteron-Antagonisten-Einnahme zum Aufnahmezeitpunkt korreliert signifikant invers mit BMP2-Vorkommen auf Monozyten ($r=-0,432$, $p\leq 0,05$ bei permeabilisierten, $r=-0,386$, $p\leq 0,05$ bei nicht-permeabilisierten Zellen). Die restlichen Parameter ergaben keine signifikanten

Korrelationen.

3.2.3.6 Korrelationen von BMP7-Expression auf Monozyten

Die Höhe des Troponin-I-Wertes bei Aufnahme korreliert signifikant mit dem Vorkommen von BMP7 auf Monozyten ($r=0,528$, $p\leq 0,01$ bei nicht-permeabilisierten Zellen). Die restlichen Konstellationen waren nicht signifikant.

3.2.3.7 Korrelationen von BMP4-Expression auf Monozyten und Thrombozyten

Für BMP4 ergaben sich weder für Monozyten noch Thrombozyten bei allen Parametern statistisch signifikante Zusammenhänge.

3.2.4 Korrelationsmatrix der Aortenstenosen-Kohorte

Zuletzt werden noch die Patienten mit Aortenklappenstenosen untersucht. Betrachtet werden die statistisch signifikanten kardiovaskulären Risikofaktoren, Medikamentenanamnese und Laborparameter im direkten Vergleich mit den statistisch signifikanten Markern.

Tabelle 6: Korrelationsmatrix-Analyse der Kohorte mit Aortenstenose. Befunde der kardiovaskulären Risikofaktoren, Laborparameter und Aufnahmemedikation wurden mit der Markerexpression verglichen. Negative Faktoren geben inverse Zusammenhänge an. Legende: *-Markierung: $p \leq 0,05$, **-Markierung: $p \leq 0,01$. BMP=Bone Morphogenetic Protein, Mo=Monozyten, Thr=Thrombozyten, P=Permeabilisiert, NP=nicht-permeabilisiert, Gr=Gremlin, Max.=Maximalwert, LDL=Low-density lipoprotein, ACE=Angiotensin-converting enzyme, 1=Aufnahmemedikation.

	BMP2MoP	BMP2MoNP	BMP7MoNP	Gr1ThrP	Gr1ThrNP	Gr1MoP	Gr1MonNP	Gr2ThrP	Gr2ThrNP	Gr2MonP	Gr2MonNP
Hyperlipidämie	-0,107	0,188	-0,087	0,455*	-0,027	-0,402	0,375	-0,321	-0,321	-0,134	-0,08
Vorhofflimmern	0,205	0,189	-0,052	0,063	0,079	0,315	0,039	0,252	0,268	0,472*	0,236
Troponin Aufnahme	0,938**	0,839*	0,542	0,133	0,041	0,251	0,106	0,494	0,789*	0,803*	0,676
Troponin Max.	0,432	0,199	0,480*	-0,067	0,373	0,186	-0,098	0,419	0,592**	0,401	0,072
Cholesterin	0,03	-0,149	0,585*-	0,541*-	-0,298	-0,435	-0,453	-0,455	-0,443	-0,363	-0,448
LDL-Cholesterin	0,02	-0,164	-0,475	0,580*-	-0,25	-0,412	-0,503	-0,401	-0,343	-0,279	-0,439
Thrombozyten	-0,305	-0,16	0,487*-	-0,162	0,550**-	-0,308	-0,183	0,473*-	0,497*-	-0,401	-0,186
Statin±Ezetrol 1	0,668**-	-0,446	-0,228	-0,077	-0,464	0,798**-	-0,063	0,670**-	0,563*-	0,745**-	-0,501
beta-Blocker 1	0,590*-	-0,499	0,152	-0,272	0,045	-0,272	-0,136	-0,318	-0,454	-0,499	-0,363
ACE-Hemmer 1	0,252	0,22	-0,351	0,535*	0,063	-0,189	0,630*	-0,22	-0,252	0,031	0

3.2.4.1 Korrelationen von Gremlin1-Expression auf Thrombozyten

Die Zahl der Thrombozyten korreliert signifikant invers mit thrombozytärer Gremlin1-Expression ($r = -0,550$, $p \leq 0,01$ bei permeabilisierten Zellen). Die Einnahme von Cholesterinsenkeuren bei Krankenhausaufnahme (Statine und/oder Ezetrol) korreliert signifikant invers mit thrombozytären Gremlin1-Vorkommen ($r = -0,798$, $p \leq 0,01$ bei nicht-permeabilisierten Zellen). Für die restlichen Parameter ergaben sich keine relevanten Korrelationen.

3.2.4.2 Korrelationen von Gremlin1-Expression auf Monozyten

Hyperlipidämie als Risikofaktor korreliert signifikant mit monozytärer Gremlin1-Expression ($r = 0,455$, $p \leq 0,05$ bei nicht-permeabilisierten Zellen). Der Gesamt-

Cholesterin Wert korreliert signifikant invers mit monozytären Gremlin1-Vorkommen ($r=-0,541$, $p\leq 0,05$ bei nicht-permeabilisierten Zellen), ebenso wie der LDL-Cholesterin-Wert signifikant invers mit monozytärer Gremlin1-Expression korreliert ($r=-0,580$, $p\leq 0,05$ bei nicht-permeabilisierten Zellen). Die Einnahme von ACE-Hemmern zum Aufnahmezeitpunkt korreliert signifikant mit monozytärer Gremlin1-Expression ($r=0,535$, $p\leq 0,05$ bei nicht-permeabilisierten, $r=0,630$, $p\leq 0,05$ bei permeabilisierten Zellen). Für die anderen Parameter ergaben sich keine weiteren signifikanten Zusammenhänge.

3.2.4.3 Korrelationen von Gremlin2-Expression auf Thrombozyten

Die Höhe des Troponin-I-Wertes bei Krankenhausaufnahme korreliert signifikant mit thrombozytärer Gremlin2-Expression ($r=0,789$, $p\leq 0,05$ bei nicht-permeabilisierten Zellen), der maximale Troponin-I-Wert während des Krankenhausaufenthaltes korreliert ebenfalls signifikant mit thrombozytärer Gremlin2-Expression ($r=0,592$, $p\leq 0,01$ bei nicht-permeabilisierten Zellen). Die Zahl der Thrombozyten korreliert signifikant invers mit thrombozytärer Gremlin2-Vorkommen ($r=-0,473$, $p\leq 0,05$ bei permeabilisierten, $r=-0,497$, $p\leq 0,05$ bei nicht-permeabilisierten Zellen). Die Einnahme bei Krankenhausaufnahme von Cholesterinsenken (Statine und/oder Ezetrol) korreliert signifikant invers mit Gremlin2-Vorkommen auf Thrombozyten ($r=-0,670$, $p\leq 0,01$ bei permeabilisierten, $r=-0,563$, $p\leq 0,05$ bei nicht-permeabilisierten Zellen). Für die anderen Parameter ergaben sich keine relevanten Zusammenhänge.

3.2.4.4 Korrelationen von Gremlin2-Expression auf Monozyten

Vorhandenes Vorhofflimmern korreliert signifikant mit monozytärer Gremlin2-Expression ($r=0,472$, $p\leq 0,05$ bei permeabilisierten Zellen). Der Troponin-I-Wert bei Krankenhausaufnahme korreliert signifikant mit monozytärer Gremlin2-Expression ($r=0,803$, $p\leq 0,05$ bei permeabilisierten Zellen). Die Einnahme von Medikamenten zu Cholesterinsenkung (Statine oder Ezetrol) korreliert signifikant invers mit Gremlin2-Vorkommen auf Monozyten ($r=-0,745$, $p\leq 0,01$ bei permeabilisierten Zellen). Die anderen Parameter ergaben keine relevanten Korrelationen.

3.2.4.5 Korrelationen von BMP2-Expression auf Monozyten

War der Troponin-I-Wert bei Krankenhausaufnahme erhöht, so korreliert dies signifikant mit monozytären Vorkommen von BMP2 ($r=0,938$, $p\leq 0,01$ bei permeabilisierten, $r=0,839$, $p\leq 0,05$ bei nicht-permeabilisierten Zellen). Die Einnahme von Medikamenten zu Cholesterinsenkung (Statine oder Ezetrol) korreliert signifikant invers mit BMP2-Expression auf Monozyten ($r=-0,668$, $p\leq 0,01$ bei permeabilisierten Zellen). Fanden sich beta-Blocker in der Aufnahmemedikation, so korreliert dies signifikant invers mit monozytären BMP2-Vorkommen ($r=-0,590$, $p\leq 0,05$ bei permeabilisierten Zellen). Die anderen Parameter liefern keine relevanten Ergebnisse.

3.2.4.6 Korrelationen von BMP7-Expression auf Monozyten

Der Maximale Troponin-I-Wert während des Krankenhausaufenthaltes korreliert ebenfalls signifikant mit monozytärer BMP7-Expression ($r=0,480$, $p\leq 0,05$ bei nicht-permeabilisierten Zellen). Der Gesamt-Cholesterin Wert korreliert signifikant invers mit monozytären BMP7-Vorkommen ($r=-0,585$, $p\leq 0,05$ bei nicht-permeabilisierten Zellen). War die Zahl der Thrombozyten erhöht, so korreliert dies signifikant invers mit BMP7-Exprimierung auf Monozyten ($r=-0,487$, $p\leq 0,05$ bei nicht-permeabilisierten Zellen). Die anderen Parameter ergaben keine signifikanten Ergebnisse.

3.2.4.7 Korrelationen von BMP4-Expression auf Monozyten und Thrombozyten

Für BMP4 ergaben sich weder für Monozyten noch Thrombozyten bei allen Parametern statistisch signifikante Zusammenhänge.

3.2.5 Zusammenfassung der Korrelationsmatrix-Tabellen

Die einzelnen Kohorten werden bezüglich der Risikofaktoren, Vorerkrankungen, Laborwerte und Medikation hinsichtlich thrombozytärer und monozytärer Expression von Gremlin1, Gremlin2, BMP2, BMP4 und BMP7 verglichen.

3.2.5.1 Zusammenfassung für Gremlin1

Für SAP-Patienten konnten folgende Aussagen getroffen werden:

Vorhofflimmern und erhöhte Troponin-Werte gingen mit erhöhter thrombozytärer Gremlin1-Expression einher. Erhöhte Kreatinin-Werte gingen mit erhöhter thrombozytärer und monozytärer Gremlin1-Expression einher, wohingegen niedrige thrombozytäre Gremlin1-Expression bei ASS-Einnahme zu finden war. Für ACS-Patienten galten folgende Aussagen: Ein erhöhter LVEDD ging mit erhöhter monozytärer und ein erhöhter Troponin-Wert mit erhöhter thrombozytärer Gremlin1-Expression einher. Für Patienten mit Aortenklappenstenose gilt: Hyperlipidämie, ACE-Hemmer-Einnahme und niedrige LDL-Cholesterin-Werte gingen mit erhöhter monozytärer Gremlin1-Expression einher; erhöhte Thrombozytenzahlen und Cholesterinsenker-Einnahme gingen mit niedriger thrombozytärer Gremlin1-Expression einher.

3.2.5.2 Zusammenfassung für Gremlin2

Bei SAP-Patienten wurden folgende Ergebnisse gefunden: ein erhöhter LVEDD und erhöhter Kreatinin-Wert gingen mit erhöhter thrombozytärer und monozytärer Gremlin2-Expression einher. Vorhofflimmern ging mit erhöhter thrombozytärer Gremlin2-Expression einher. Erhöhte Thrombozytenzahlen und ASS-Einnahme gingen mit niedrigen thrombozytären Gremlin2-Vorkommen einher. Bei ACS-Patienten wurden folgende Aussagen getroffen: bei erhöhtem LVEDD wurden erhöhte thrombozytäre Gremlin2-Vorkommen gefunden. Arterielle Hypertonie, ASS-Einnahme und Hyperlipidämie gingen mit niedriger monozytärer Gremlin2-Expression einher. Erhöhte Troponin-I-Werte gingen mit erhöhten thrombozytären Gremlin2-Vorkommen einher. Bei Patienten mit Aortenstenose konnte folgendes festgestellt werden:

Vorhofflimmern und erhöhte Troponin-I-Werte gingen mit erhöhten monozytären Gremlin2-Vorkommen einher. Erhöhte Thrombozytenzahlen gingen mit niedriger monozytärer Gremlin2-Expression einher. Cholesterinsenkende Medikamenteneinnahme ging mit niedrigen thrombozytären und monozytären Gremlin2-Vorkommen einher.

3.2.5.3 Zusammenfassung für BMP2

Für SAP-Patienten konnten folgende Aussagen getroffen werden: arterielle Hypertonie ging mit niedriger BMP2-Expression auf Monozyten einher. Bei ACS-Patienten gilt: Cholesterinsenkende Medikamenteneinnahme und ASS-Einnahme gingen mit niedriger monozytärer BMP2-Expression einher. Für die Patienten mit Aortenstenose gilt folgendes: erhöhte Troponin-I-Werte gingen mit erhöhten BMP2-Vorkommen auf Monozyten einher. Cholesterinsenkende Medikamente sowie Beta-blocker-Einnahme gingen mit niedrigen monozytären Vorkommen von BMP2 einher.

3.2.5.4 Zusammenfassung für BMP4

Für BMP4 ergaben sich keinerlei statistisch signifikante Korrelationen.

3.2.5.5 Zusammenfassung für BMP7

Ein erhöhter Troponin-I-Wert ging mit erhöhten monozytären BMP7-Vorkommen bei ACS-Patienten einher. Erhöhte Thrombozytenzahlen gingen mit niedriger monozytärer BMP7-Expression bei Patienten mit Aortenklappenstenose einher.

3.3 Signifikante Marker innerhalb der Kohorten

Für die FACS-Analysen wurden insgesamt fünf Marker verwendet, BMP2, BMP4, BMP7, Gremlin1 und Gremlin2. Sie wurden auf Thrombozyten und Monozyten, jeweils permeabilisiert und nicht-permeabilisiert, untersucht.

Im Folgenden wird graphisch dargestellt, dass vor allem folgende Kombinationen in der Gesamtkohorte statistisch signifikant waren: BMP2 auf Monozyten, BMP7 auf Monozyten, Gremlin 1 auf Thrombozyten und Monozyten, und Gremlin 2 auf Thrombozyten und Monozyten. Danach wurden Unterschiede zwischen den Einzelkohorten untersucht.

BMP2:

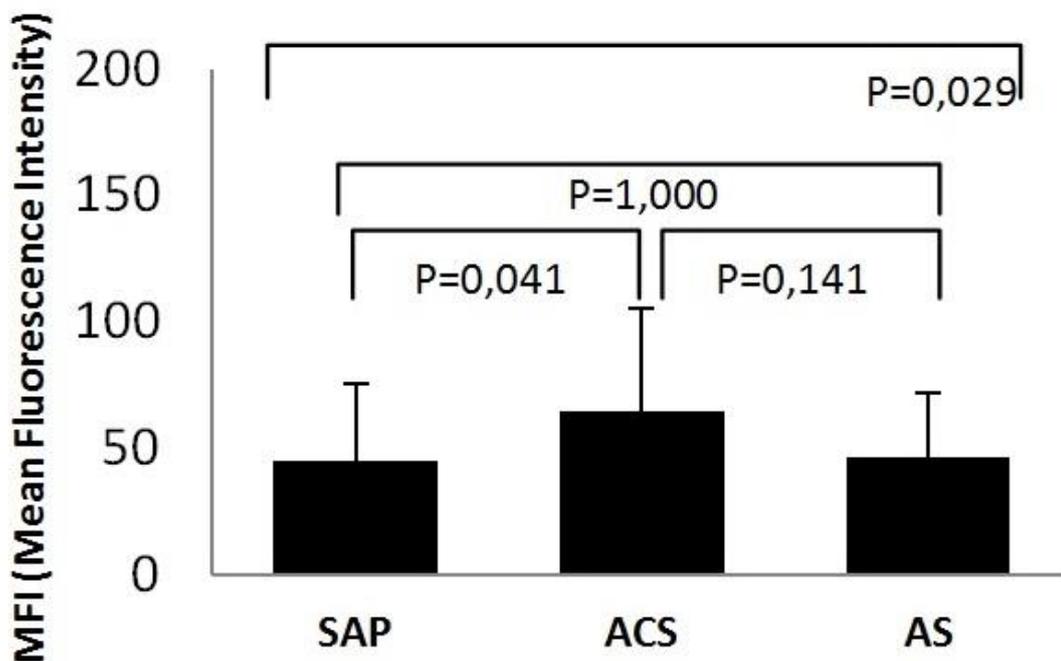


Abbildung 8: BMP2-Expression auf permeabilisierten Monozyten im Kohortenvergleich. Als diagnostischer Parameter wurde der MFI (Mean Fluorescence Intensity) der durchflusszytometrischen Bestimmung zur Darstellung der Expression von BMP2 verwendet. Es gilt: SAP n=51, ACS n=30, Aortenstenosen n=12. Zusammenhänge wurden mittels p-Werte angegeben. Legende: SAP=Stabile Angina pectoris, ACS=akutes Koronarsyndrom, AS=Aortenstenosen, BMP2=Bone morphogenetic protein 2, MFI=Mean Fluorescence Intensity.

Die Unterschiede der MFI-Werte für BMP2-Expression auf permeabilisierten Monozyten zwischen der SAP- (Mean-Wert=45,2) und ACS-Kohorte (Mean-Wert=65) sind signifikant ($p=0,041$); insgesamt unterscheiden sich die MFI-

Werte von SAP-, ACS- und Aortenstenosen-Kohorte (Mean-Wert=46,4) signifikant voneinander ($p=0,029$). Die Unterschiede zwischen ACS- und Aortenstenosen-Kohorte sowie SAP- und Aortenstenosenkohorte sind nicht statistisch signifikant.

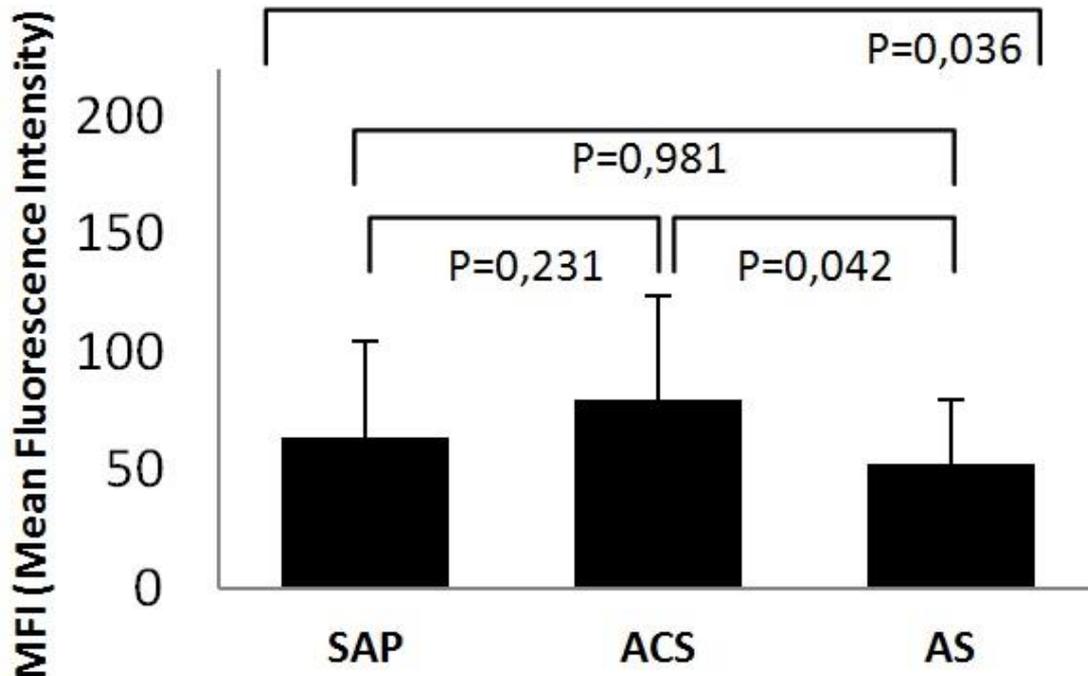


Abbildung 9: BMP2-Expression auf nicht-permeabilisierten Monozyten im Kohortenvergleich. Als diagnostischer Parameter wurde der MFI (Mean Fluorescence Intensity) der durchflusszytometrischen Bestimmung zur Darstellung der Expression von BMP2 verwendet. Es gilt: SAP $n=51$, ACS $n=30$, Aortenstenosen $n=12$. Zusammenhänge wurden mittels p -Werte angegeben. Legende: SAP=Stabile Angina pectoris, ACS=akutes Koronarsyndrom, AS=Aortenstenosen, BMP2=Bone morphogenetic protein 2, MFI=Mean Fluorescence Intensity.

Die MFI-Werte von BMP2-Expression auf nicht-permeabilisierten Monozyten unterscheiden sich zwischen der ACS- (Mean-Wert=80,2) und Aortenstenosen-Kohorte (Mean-Wert=53,1) signifikant ($p=0,042$). Insgesamt unterscheiden sich die MFI-Werte zwischen SAP-Kohorte (Mean-Wert=63,7), ACS- und Aortenstenosenkohorte signifikant ($p=0,036$). Die Unterschiede der MFI

zwischen SAP- und ACS-Kohorte bzw. SAP- und Aortenstenosenkohorte sind nicht statistisch signifikant.

BMP7:

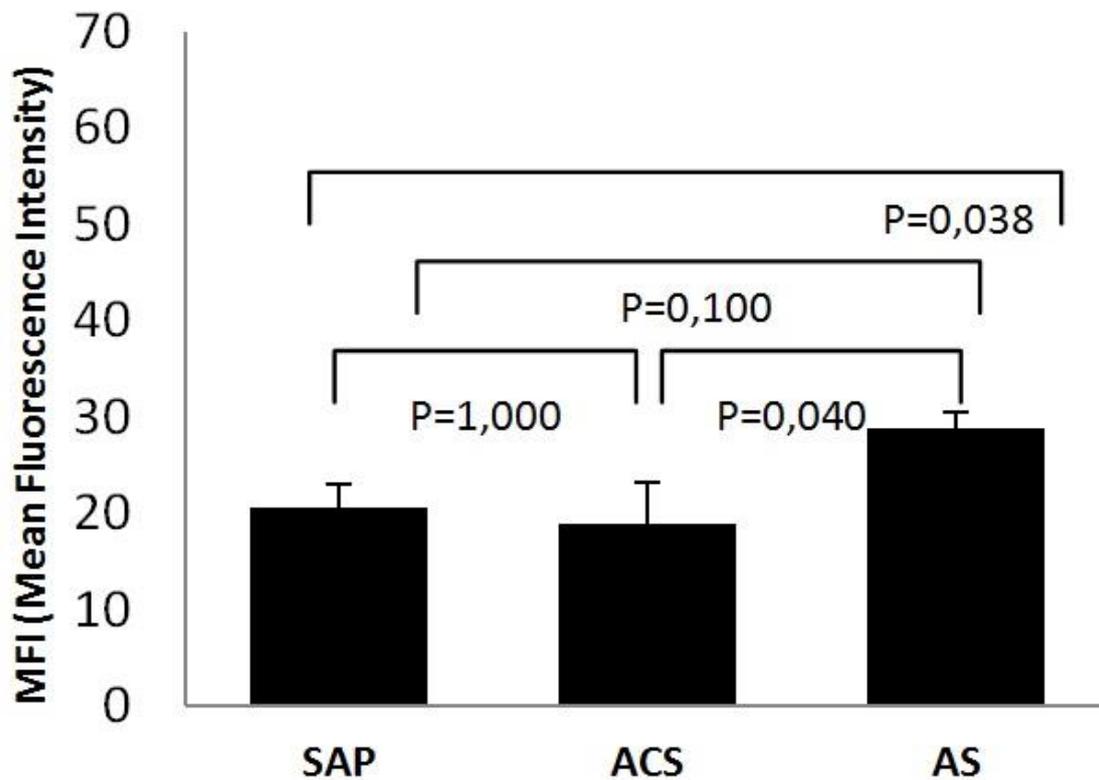


Abbildung 10: BMP7-Expression auf nicht-permeabilisierten Monozyten im Kohortenvergleich. Als diagnostischer Parameter wurde der MFI (Mean Fluorescence Intensity) der durchflusszytometrischen Bestimmung zur Darstellung der Expression von BMP7 verwendet. Es gilt: SAP n=51, ACS n=30, Aortenstenosen n=12. Zusammenhänge wurden mittels p-Werte angegeben. Legende: SAP=Stabile Angina pectoris, ACS=akutes Koronarsyndrom, AS=Aortenstenosen, BMP7=Bone morphogenetic protein 7, MFI=Mean Fluorescence Intensity.

Die ACS- (Mean-Wert=18,9) und Aortenstenosen-Kohorte (Mean-Wert=28,8) unterscheiden sich hinsichtlich ihrer BMP7-Expression auf nicht-permeabilisierten Monozyten signifikant voneinander ($p=0,04$). Ebenso unterscheiden sich insgesamt alle MFI-Werte der SAP-Kohorte (Mean-Wert=20,6), ACS- und Aortenstenosen-Kohorte signifikant voneinander ($p=0,038$). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen SAP- und ACS-Kohorte bzw. SAP- und Aortenstenosen-Kohorte sind nicht erueierbar.

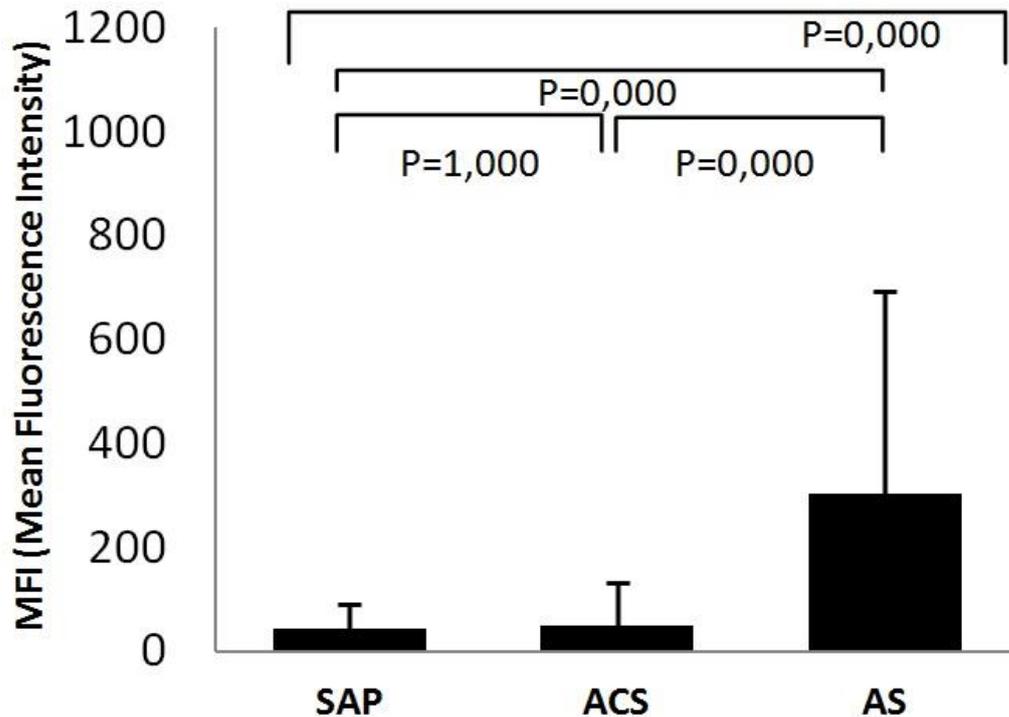
Gremlin 1:

Abbildung 11: Gremlin1-Expression auf permeabilisierten Thrombozyten im Kohortenvergleich. Als diagnostischer Parameter wurde der MFI (Mean Fluorescence Intensity) der durchflusszytometrischen Bestimmung zur Darstellung der Expression von Gremlin1 verwendet. Es gilt: SAP n=51, ACS n=30, Aortenstenosen n=12. Zusammenhänge wurden mittels p-Werte angegeben. Legende: SAP=Stabile Angina pectoris, ACS=akutes Koronarsyndrom, AS=Aortenstenosen, MFI=Mean Fluorescence Intensity.

Die MFI-Werte der SAP- (Mean-Wert=41,5) und Aortenstenosen-Kohorte (Mean-Wert=302) unterscheiden sich signifikant voneinander ($p=0,000$). Der Unterschied der MFI-Werte der ACS- (Mean-Wert=49,6) und Aortenstenosen-Kohorte ist ebenfalls statistisch hoch signifikant ($p=0,000$). Die MFI-Werte im Vergleich aller drei Kohorten unterscheiden sich ebenfalls signifikant ($p=0,000$). Der Unterschied der Expression von Gremlin1 auf Thrombozyten ist nicht signifikant zwischen SAP- und ACS-Kohorte.

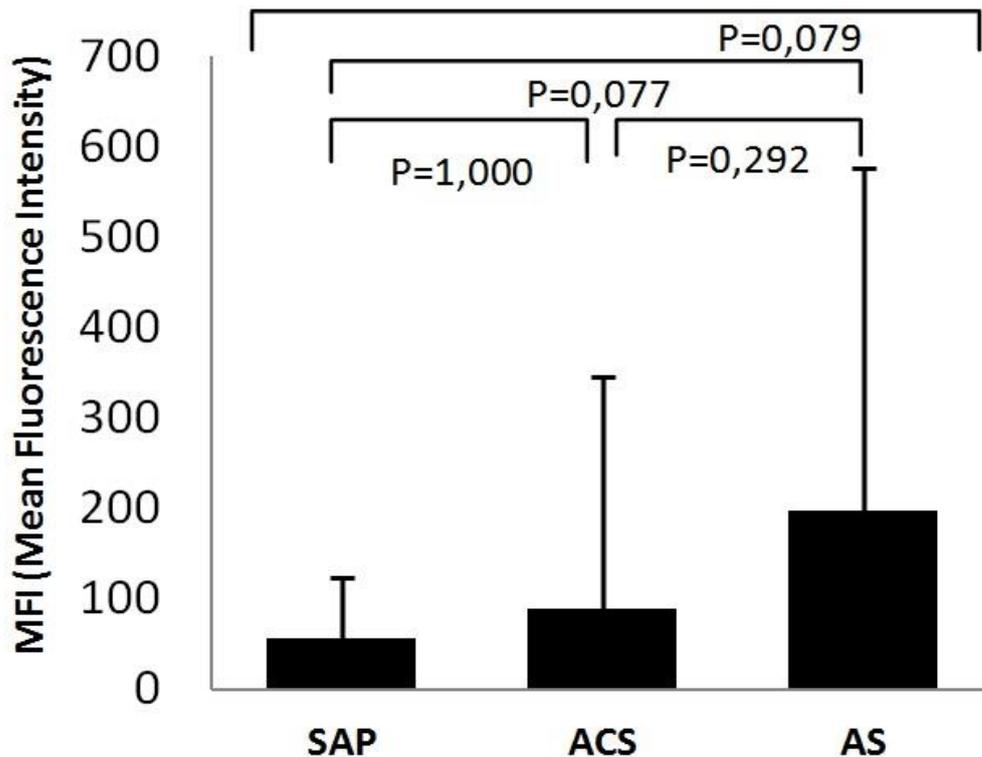


Abbildung 12: Gremlin1-Expression auf nicht-permeabilisierten Thrombozyten im Kohortenvergleich. Als diagnostischer Parameter wurde der MFI (Mean Fluorescence Intensity) der durchflusszytometrischen Bestimmung zur Darstellung der Expression von Gremlin1 verwendet. Es gilt: SAP n=51, ACS n=30, Aortenstenosen n=12. Zusammenhänge wurden mittels p-Werte angegeben. Legende: SAP=Stabile Angina pectoris, ACS=akutes Koronarsyndrom, AS=Aortenstenosen, MFI=Mean Fluorescence Intensity.

Die MFI-Werte der SAP- (Mean-Wert=55,8) und Aortenstenosen-Kohorte (Mean-Wert=196,7) unterscheiden sich (schwach) signifikant voneinander ($p=0,077$), ebenso wie die Gremlin1-Expressionen der SAP-, ACS- (Mean-Wert=89,5) und Aortenstenosen-Kohorten insgesamt voneinander ($p=0,079$). Die Unterschiede zwischen den MFI der SAP- und ACS-Kohorte bzw. ACS- und Aortenstenosen-Kohorte sind nicht statistisch signifikant.

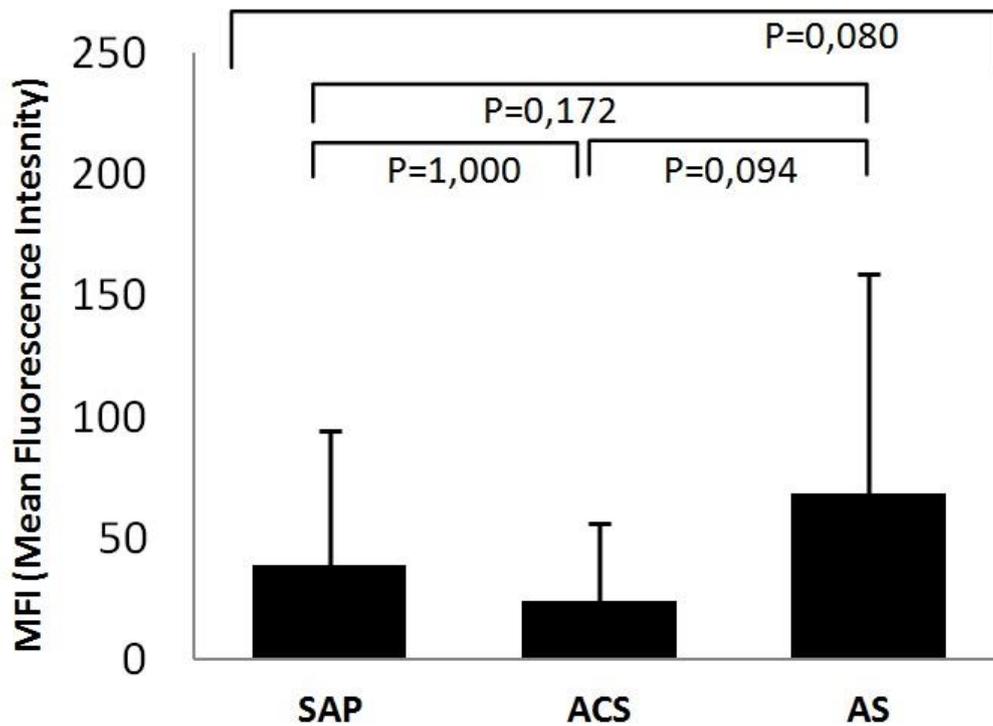


Abbildung 13: Gremlin1-Expression auf permeabilisierten Monozyten im Kohortenvergleich. Als diagnostischer Parameter wurde der MFI (Mean Fluorescence Intensity) der durchflusszytometrischen Bestimmung zur Darstellung der Expression von Gremlin1 verwendet. Es gilt: SAP $n=51$, ACS $n=30$, Aortenstenosen $n=12$. Zusammenhänge wurden mittels p -Werte angegeben. Legende: SAP=Stabile Angina pectoris, ACS=akutes Koronarsyndrom, AS=Aortenstenosen, MFI=Mean Fluorescence Intensity.

Die MFI-Werte der ACS- (Mean-Wert=24) und Aortenstenosen-Kohorte (Mean-Wert=68,6) unterscheiden sich (schwach) signifikant voneinander ($p=0,094$), ebenso wie die Unterschiede der MFI zwischen SAP- (Mean-Wert=39), ACS- und Aortenstenosen-Kohorte insgesamt statistisch signifikant sind ($p=0,080$). Die MFI-Unterschiede zwischen SAP- und ACS-Kohorte bzw. SAP- und Aortenstenosen-Kohorten sind nicht statistisch signifikant.

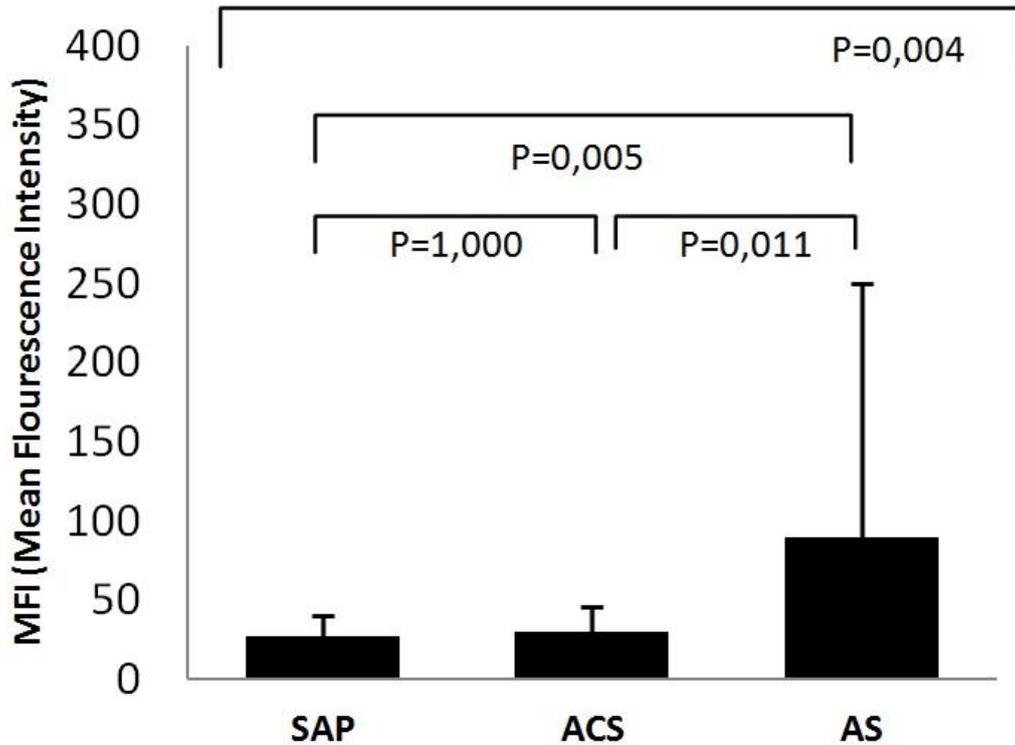


Abbildung 14: Gremlin1-Expression auf nicht-permeabilisierten Monozyten im Kohortenvergleich. Als diagnostischer Parameter wurde der MFI (Mean Fluorescence Intensity) der durchflusszytometrischen Bestimmung zur Darstellung der Expression von Gremlin1 verwendet. Es gilt: SAP n=51, ACS n=30, Aortenstenosen n=12. Zusammenhänge wurden mittels p-Werte angegeben. Legende: SAP=Stabile Angina pectoris, ACS=akutes Koronarsyndrom, AS=Aortenstenosen, MFI=Mean Fluorescence Intensity.

Die Unterschiede der MFI-Werte zwischen ACS- (Mean-Wert=29,9) und Aortenstenosenkohorte (Mean-Wert=89,8) sind (schwach) signifikant ($p=0,011$). SAP- (Mean-Wert=27,3) und Aortenstenosenkohorte unterscheiden sich hinsichtlich der MFI-Werte hoch signifikant ($p=0,005$), ebenso wie alle drei Kohorten im Vergleich untereinander ($p=0,004$). Der Unterschied der MFI-Werte zwischen ACS- und SAP-Kohorte ist nicht statistisch signifikant.

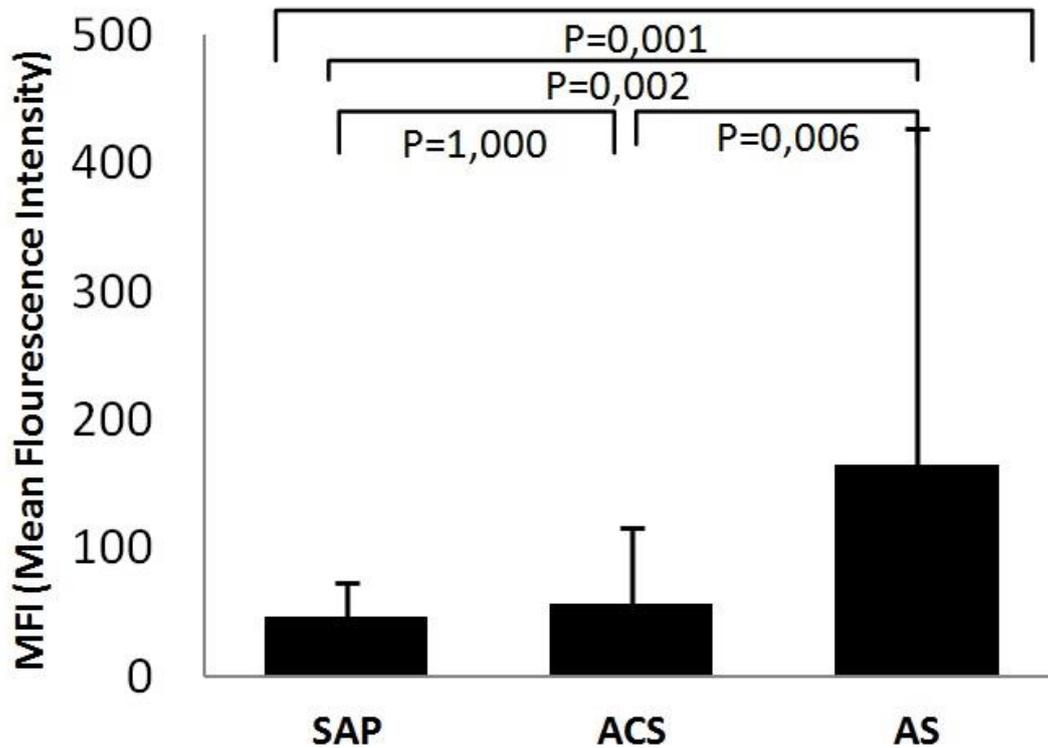
Gremlin 2:

Abbildung 15: Gremlin2-Expression auf permeabilisierten Thrombozyten im Kohortenvergleich. Als diagnostischer Parameter wurde der MFI (Mean Fluorescence Intensity) der durchflusszytometrischen Bestimmung zur Darstellung der Expression von Gremlin2 verwendet. Es gilt: SAP n=51, ACS n=30, Aortenstenosen n=12. Zusammenhänge wurden mittels p-Werte angegeben. Legende: SAP=Stabile Angina pectoris, ACS=akutes Koronarsyndrom, AS=Aortenstenosen, MFI=Mean Fluorescence Intensity.

Die MFI-Werte der Gremlin2-Expression der SAP- (Mean-Wert=46,2) und Aortenstenosenkohorte (Mean-Wert=164,3) unterscheiden sich signifikant ($p=0,002$). Auch sind die Unterschiede der MFI-Werte der ACS- (Mean-Wert=56,4) und Aortenstenosenkohorte statistisch signifikant ($p=0,006$), ebenso wie die Unterschiede der MFI-Werte der drei Kohorten insgesamt untereinander ($p=0,001$). Lediglich der Unterschied der Gremlin2-Expression der SAP- und ACS-Kohorte ist nicht statistisch signifikant.

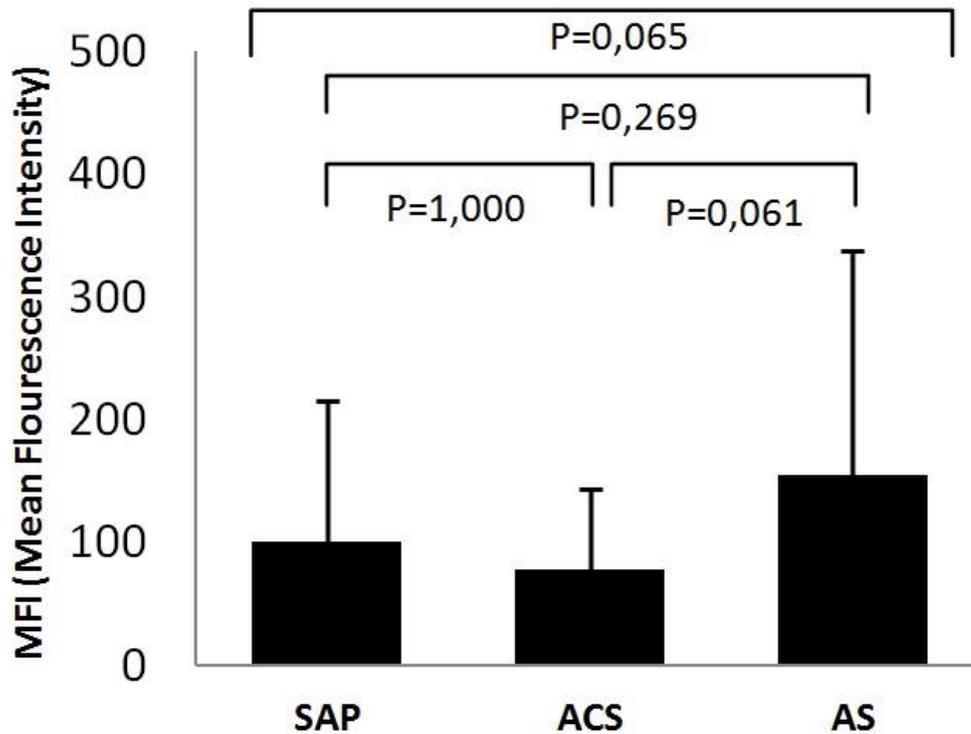


Abbildung 16: Gremlin2-Expression auf nicht-permeabilisierten Thrombozyten im Kohortenvergleich. Als diagnostischer Parameter wurde der MFI (Mean Fluorescence Intensity) der durchflusszytometrischen Bestimmung zur Darstellung der Expression von Gremlin2 verwendet. Es gilt: SAP n=51, ACS n=30, Aortenstenosen n=12. Zusammenhänge wurden mittels p-Werte angegeben. Legende: SAP=Stabile Angina pectoris, ACS=akutes Koronarsyndrom, AS=Aortenstenosen, MFI=Mean Fluorescence Intensity.

Die MFI-Werte als Marker für Gremlin2-Expression auf nicht-permeabilisierten Thrombozyten unterscheiden sich (schwach) signifikant zwischen der SAP- (Mean-Wert=100,8) und Aortenstenosenkohorte (Mean-Wert=154,7, $p=0,065$). Ebenso unterscheiden sich MFI-Werte der ACS- (Mean-Wert=78,3) und Aortenstenosenkohorte signifikant ($p=0,061$). Sowohl die Unterschiede der MFI-Werte der SAP- und Aortenstenosenkohorte als auch die Unterschiede aller drei Kohorten untereinander sind nicht statistisch signifikant.

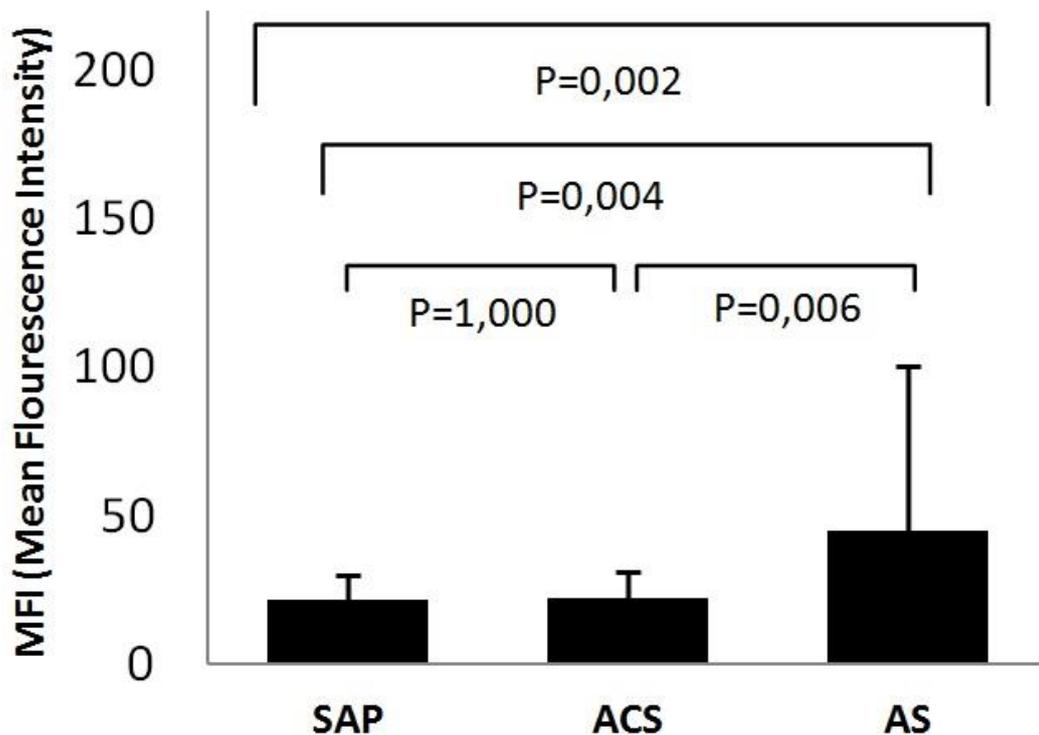


Abbildung 17: Gremlin2-Expression auf permeabilisierten Monozyten im Kohortenvergleich. Als diagnostischer Parameter wurde der MFI (Mean Fluorescence Intensity) der durchflusszytometrischen Bestimmung zur Darstellung der Expression von Gremlin2 verwendet. Es gilt: SAP n=51, ACS n=30, Aortenstenosen n=12. Zusammenhänge wurden mittels p-Werte angegeben. Legende: SAP=Stabile Angina pectoris, ACS=akutes Koronarsyndrom, AS=Aortenstenosen, MFI=Mean Fluorescence Intensity.

Die MFI-Werte als Ausdruck der Gremlin2-Exprimierung auf permeabilisierten Monozyten unterscheiden sich signifikant ($p=0,004$) bei den SAP- (Mean-Wert=21,5) und Aortenstenosenkohorten (Mean-Wert=44,7). Auch die Unterschiede zwischen ACS- (Mean-Wert =21,9) und Aortenstenosenkohorte sind hochsignifikant ($p=0,006$), ebenso wie die Unterschiede der MFI-Werte innerhalb aller drei Kohorten im Vergleich ($p=0,002$). Lediglich die Unterschiede zwischen SAP- und ACS-Kohorte sind nicht statistisch signifikant.

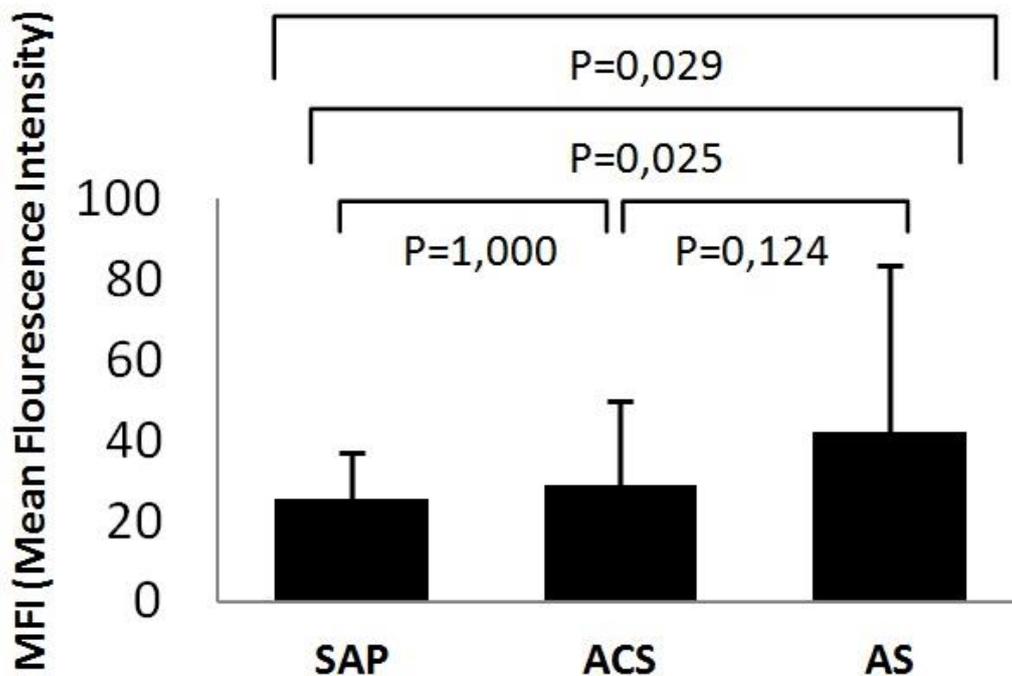


Abbildung 18: Gremlin2-Expression auf nicht-permeabilisierten Monozyten im Kohortenvergleich. Als diagnostischer Parameter wurde der MFI (Mean Fluorescence Intensity) der durchflusszytometrischen Bestimmung zur Darstellung der Expression von Gremlin2 verwendet. Es gilt: SAP n=51, ACS n=30, Aortenstenosen n=12. Zusammenhänge wurden mittels p-Werte angegeben. Legende: SAP=Stabile Angina pectoris, ACS=akutes Koronarsyndrom, AS=Aortenstenosen, MFI=Mean Fluorescence Intensity.

Die MFI-Werte verdeutlichen Gremlin2-Exprimierungen auf nicht-permeabilisierten Monozyten; die Unterschiede dieser Werte zwischen SAP- (Mean-Wert=25,2) und Aortenstenosenkohorte (Mean-Wert=42,1) sind signifikant ($p=0,025$). Auch die Unterschiede der MFI-Werte zwischen SAP-, ACS- (Mean-Wert=28,7) und Aortenstenosenkohorte im Vergleich sind statistisch signifikant ($p=0,029$). Unterschiede zwischen SAP- und ACS-Kohorte, ebenso wie die Unterschiede der MFI-Werte der ACS- und Aortenstenosenkohorte sind nicht statistisch signifikant.

3.4 Follow up der Studie mit Analyse der periinterventionellen Baseline characteristics und klinischem Verlauf mit Kaplan-Meier-Analysen der Überlebensfunktionen und Messendpunkte

3.4.1 Baseline characteristics im Verlauf

Nachfolgend werden die Charakteristika der Patienten periinterventionell sowie während des Krankenhausaufenthaltes geschildert (Gesamt n=93, SAP n=51, ACS n=30, Aortenstenose n=12).

Patienten mit Aortenklappenstenose wiesen häufiger einen kardial dekompensierten Zustand im Herzkatheterlabor auf ($p=0,025$ bei $n=4(28,6\%)$, $n=2(4,5\%)$ bei SAP-Patienten, $n=3(7,9\%)$ bei ACS-Patienten). Vor allem Patienten mit stabiler Angina pectoris waren von einer Drei-Gefäß-KHK betroffen ($p=0,021$ bei $n=29(65,9\%)$, ACS-Patienten $n=17(4,7\%)$, Aortenstenosenpatienten $n=3(20,0\%)$). Der CRP-Wert war bei Aortenstenosenpatienten signifikant höher als bei SAP- und ACS-Patienten ($9,9\pm 7,3$ mg/dl bei $p<0,001$, $0,54\pm 0,80$ mg/dl bei SAP-Patienten, $2,5\pm 4,0$ mg/dl bei ACS-Patienten). Die Gesamt-CK war bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom höher als bei Patienten mit stabiler Angina pectoris oder Aortenklappenstenose ($330,4\pm 455,3$ U/L bei $p=0,003$, $103,3\pm 67,5$ U/L bei SAP-Patienten, $133,5\pm 132,6$ U/L bei Aortenstenosenpatienten). Patienten mit Aortenstenose wiesen signifikant höhere Kreatininwerte auf als SAP- oder ACS-Patienten ($1,7\pm 0,65$ mg/dl bei $p=0,003$, $0,96\pm 0,54$ mg/dl bei SAP-Patienten, $0,95\pm 0,25$ mg/dl bei ACS-Patienten). Patienten mit Aortenstenose erhielten als Entlassmedikation von den Aggregationshemmern vor allem Clopidogrel ($n=21(100\%)$ bei $p<0,001$), ebenso wie SAP-Patienten ($n=18(40,9\%)$ bei $p<0,001$). ASS in der Entlassmedikation erhielten häufiger Patienten mit stabiler Angina pectoris ($n=40(90,9\%)$ bei $p<0,001$) wie ACS- ($n=35(92,1\%)$) oder Aortenstenosenpatienten ($n=8(38,1\%)$). Die area under the curve (=AUC) des periinterventionell durchgeführten Multiplate-Tests hat für ADP bei ACS-Patienten höhere Werte ergeben ($35,6\pm 24,6$ bei $p=0,013$) wie für SAP- ($32,0\pm 20,5$) oder Aortenstenosenpatienten ($18,5\pm 15,0$). Ebenso war die AUC

erhöht bei ACS-Patienten beim Collagen-Test ($54,7 \pm 26,1$ bei $p=0,007$), im Vergleich zu SAP- ($51,9 \pm 26,5$) und Aortenstenosenpatienten ($32,7 \pm 24,5$).

Tabelle 7: Baseline characteristics zu den Befunden periinterventionell und im Verlauf des stationären Aufenthalts.

In Tabelle 2 wurden die Charakteristika der Patienten bei Aufnahme dargestellt, hier sind die Verlaufs-, Interventionsfaktoren sowie Entlassmedikation dargestellt. Legende: mit *-versehene Charakteristika bedeuten: Mean-Wert \pm Standardabweichung. N=Anzahl, SAP=stabile Angina pectoris, ACS=akutes Koronarsyndrom, KHK=Koronare Herzerkrankung, TTE=transthorakales Echo, Kardiovask. Dekomp=Kardiovaskuläre Dekompensation, LVEDD=Left ventricular end-diastolic diameter, MI=Myokardinfarkt, CV=Kardiovaskulär, CRP=C-reaktives Protein, CK=Kreatinkinase, LDL=Low-density lipoprotein, AT1=Angiotensin1, ACE=Angiotensin-Converting Enzyme, OAD=orales Antidiabetikum, Peri=Periinterventionell.

Characteristics	Total	SAP	ACS	Aortenstenose	p-Wert
	N =93	N =51	N =30	N =12	
Herzkatheterlabor –					
n(%)					
Ejektionsfraktion im TTE*	$0,8 \pm 1,0$	$0,7 \pm 0,9$	$0,8 \pm 1,0$	$1,1 \pm 1,2$	0,298
Grace Score*	$126,5 \pm 34,1$	$116,0 \pm 27,1$	$120,8 \pm 34,3$	$159,1 \pm 27,6$	<0,001
Kardiovaskul. Dekomp.	9 (9,4)	2 (4,5)	3 (7,9)	4 (28,6)	0,025
KHK-Typ					
Keine	9 (9,3)	2 (4,5)	5 (13,2)	2 (13,3)	
Ein-Gefäß-KHK	12 (12,4)	5 (11,4)	6 (15,8)	1 (6,7)	0,021
Zwei-Gefäß-KHK	27 (27,8)	8 (18,2)	10 (26,3)	9 (60,0)	
Drei-Gefäß-KHK	49 (50,5)	29 (65,9)	17 (44,7)	3 (20,0)	
TTE-Befunde					

LVEDD*	47,3 ± 8,3	48,8 ±10,5	45,7 ± 6,3	47,3 ± 7,7	0,563
Sign. Aortenstenose - n(%)	10 (9,7)	0	0	10 (47,6)	<0,001
Laborparameter - Maximalwerte					
Gesamt-CK*	198,0 ± 309,4	103,3 ± 67,5	330,4 ± 455,3	133,5 ± 132,6	0,003
Kreatinin*	1,0 ± 0,51	0,96 ± 0,54	0,95 ± 0,25	1,7 ± 0,65	0,003
Cholesterin*	180,4 ± 40,7	177,3 ± 42,3	190,8 ± 36,3	175,1 ± 42,3	0,449
LDL-Cholesterin*	111,7 ± 42,0	107,7 ± 44,3	124,5 ± 39,9	106,9 ± 38,2	0,355
Thrombozytenzahl*	225092,7 ± 84868,2	214428,6 ± 59616,3	229378,0 ± 91221,0	238666,7 ± 113426,8	0,527
Entlassmedikation - n(%)					
Aggregationshemmer					
Keine	14 (13,6)	7 (15,9)	7 (18,4)	0	
Clopidogrel	47 (45,6)	18 (40,9)	8 (21,1)	21 (100)	<0,001
Prasugrel	19 (18,4)	7 (15,9)	12 (31,6)	0	
Ticagrelor	23 (22,3)	12 (27,3)	11 (28,9)	0	

ASS	83 (80,6)	40 (90,9)	35 (92,1)	8 (38,1)	<0,001
Statin±Ezetrol					
Keine	16 (15,5)	4 (9,1)	6 (15,8)	6 (28,6)	
Statin	83 (80,6)	39 (88,6)	31 (81,6)	13 (61,9)	0,096
Ezetrol	3 (2,9)	1 (2,3)	0	2 (9,5)	
Statin+Ezetrol	1 (1,0)	0	1 (2,6)	0	
Beta-Blocker	87 (84,5)	38 (86,4)	33 (86,8)	16 (76,2)	0,501
AT1-Blocker	24 (23,3)	13 (29,5)	9 (23,7)	2 (9,5)	0,203
ACE-Hemmer	62 (60,2)	27 (61,4)	26 (68,4)	9 (42,9)	0,155
Kalziumkanalantagon.	28 (27,2)	14 (31,8)	8 (21,1)	6 (28,6)	0,543
Diuretika	62 (60,2)	24 (54,5)	21 (55,3)	17 (81,0)	0,093
Insulin±OAD					
Keine	80 (78,4)	32 (74,4)	32 (84,2)	16 (76,2)	
Insulin	5 (4,9)	2 (4,7)	2 (5,3)	1 (4,8)	0,843
Orales Antidiabetikum	15 (14,7)	8 (18,6)	3 (7,9)	4 (19,0)	
Insulin+OAD	2 (2,0)	1 (2,3)	1 (2,6)	0	
Multiplate					
periinterventionell					
Peri Multiplate ADP*	30,5 ± 22,0	32,0 ± 20,5	35,6 ± 24,6	18,5 ± 15,0	0,013
Peri Multiplate	48,9 ± 27,1	51,9 ±	54,7 ± 26,1	32,7 ± 24,5	0,007
Collagen*		26,5			

3.4.2 Kaplan-Meier-Kurven mit klinischem Endpunkt

Die Patienten mit MFI-Werten unterhalb des Median der jeweiligen Marker-Expression wurden mit den Patienten verglichen, die eine Expression des jeweiligen Markers oberhalb des Medians aufwiesen. Als kombinierter klinischer Endpunkt wurde innerhalb der 150 Tage nach Herzkatheter oder TAVI die Rehospitalisierung wegen dekompensierter Herzinsuffizienz, Verschlechterung der LVEF (Linksventrikulären Ejektionsfraktion) um mindestens 10% oder erneutes kardiovaskuläres Ereignis mit Indikation zur erneuten Koronarintervention gewählt. Nachfolgend wird dieses Follow-up dargestellt (Gesamt n=93, SAP n=51, ACS n=30, Aortenstenosen n=12), zunächst für Gremlin1-Expression auf Thrombozyten: Patienten, deren MFI unterhalb des Medians lag (n=27), hatten ein schlechteres Outcome als Patienten, deren MFI oberhalb des Medians lag (n=32, p=0,098) (Abb. 19).

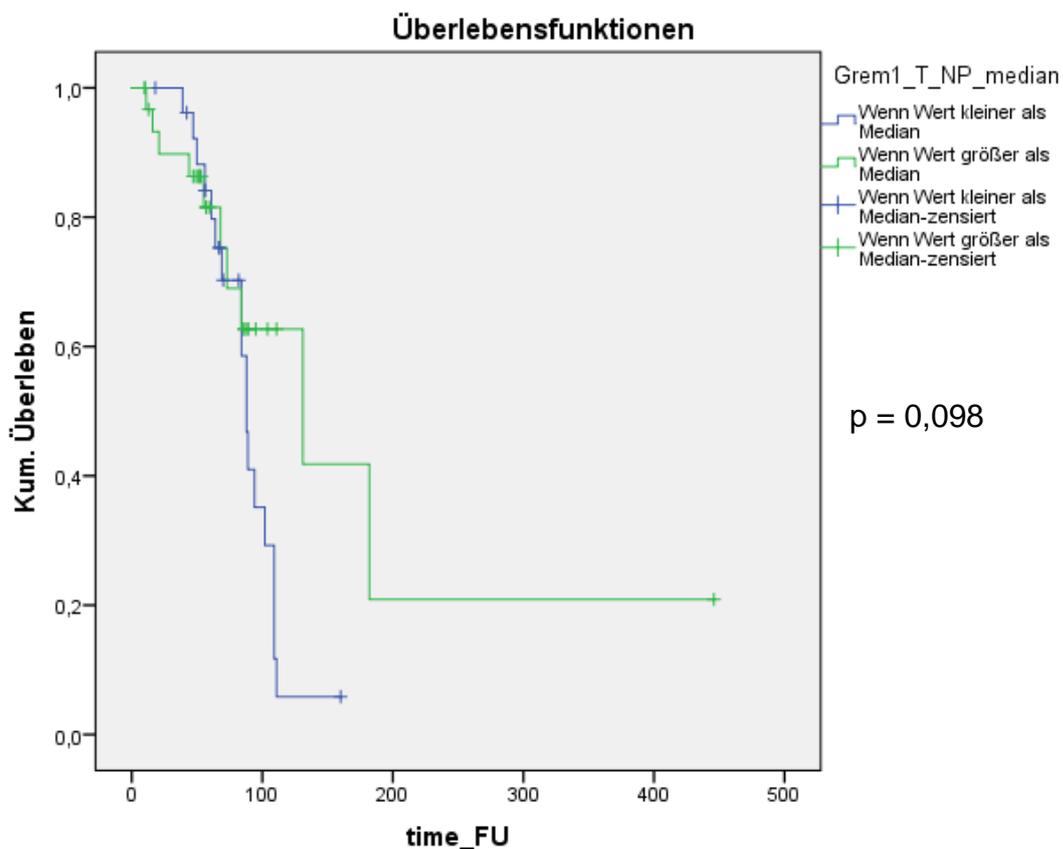


Abbildung 19: Follow-up Analyse mit Erreichen des kombinierten klinischen Endpunktes bei Patienten mit Gremlin-1 Expression auf Thrombozyten. Patienten, deren MFI bei der Markerkonstellation nicht-permeabilisierter, Gremlin1-markierter Thrombozyten oberhalb des Median-Wertes lag (grüne Linie), wiesen ein besseres Outcome auf, als Patienten, deren MFI-Wert unterhalb des Medians lag (blaue Linie). Dies ging mit späterer/weniger Rehospitalisierung aufgrund erneut notwendiger Herzkatheteruntersuchung einher. Der p-Wert gibt dabei die statistische Signifikanz an. Legende: FU=Follow-up, Kum.=Kumulatives, Grem1=Gremlin1, T=Thrombozyten, NP=Nicht-permeabilisiert.

Gremlin1-Expression in Thrombozyten: Patienten, deren MFI oberhalb des Medians lag (n=14), hatten ein statistisch signifikant besseres Outcome als Patienten, deren MFI unterhalb des Medians lag (n=45, p=0,013) (Abb.20).

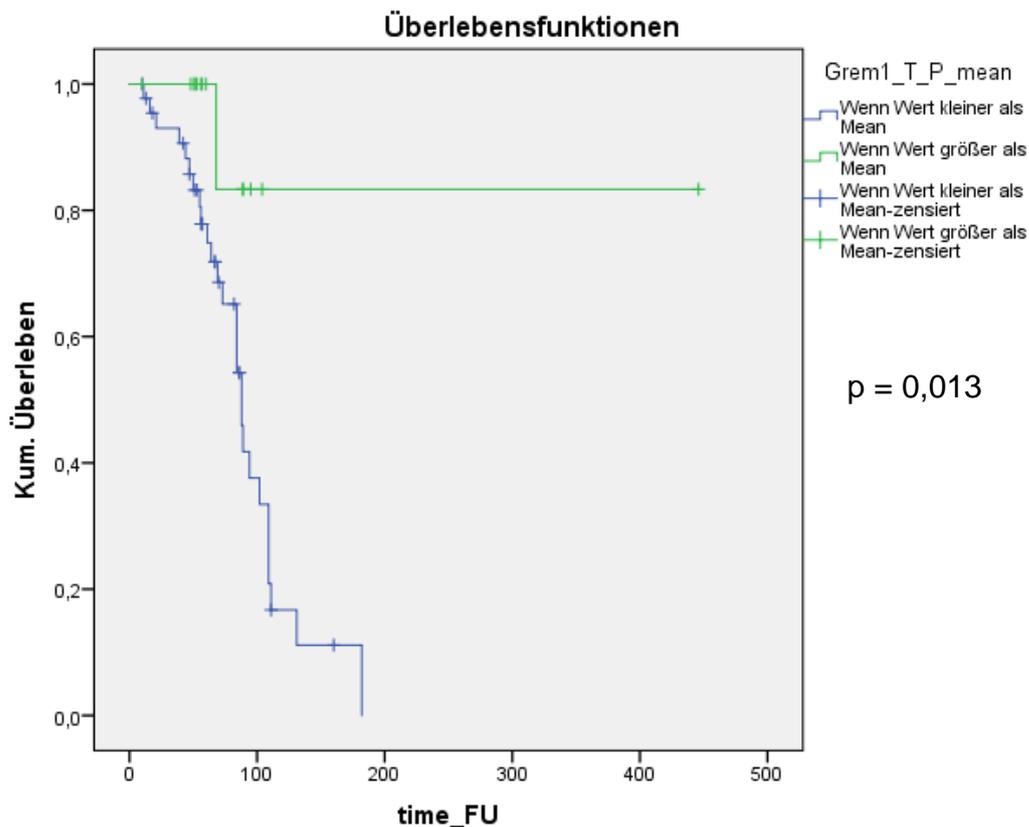


Abbildung 20: Follow-up Analyse mit Erreichen des kombinierten klinischen Endpunktes bei Patienten mit Gremlin1-Expression in Thrombozyten. Patienten, deren MFI bei der Markerkonstellation permeabilisierter, Gremlin1-markierter Thrombozyten oberhalb des Median-Wertes lag (grüne Linie), wiesen ein besseres Outcome auf, als Patienten, deren MFI-Wert unterhalb des Medians lag (blaue Linie). Dies ging mit späterer/weniger Rehospitalisierung aufgrund erneut notwendiger Herzkatheteruntersuchung einher. Der p-Wert gibt dabei die statistische Signifikanz an. Legende: FU=Follow-up, Kum.=Kumulatives, Grem1=Gremlin1, T=Thrombozyten, P=Permeabilisiert.

Patienten, deren Monozyten permeabilisiert wurden, und die eine Expression von Gremlin1 in den Monozyten oberhalb des Medians aufwiesen (n=36), hatten ein statistisch signifikant besseres Outcome ($p=0,001$) als Patienten mit einem MFI-Wert kleiner als der Median (n=23). Diese Patienten erreichten den kombinierten Endpunkt signifikant schneller (Abb.21).

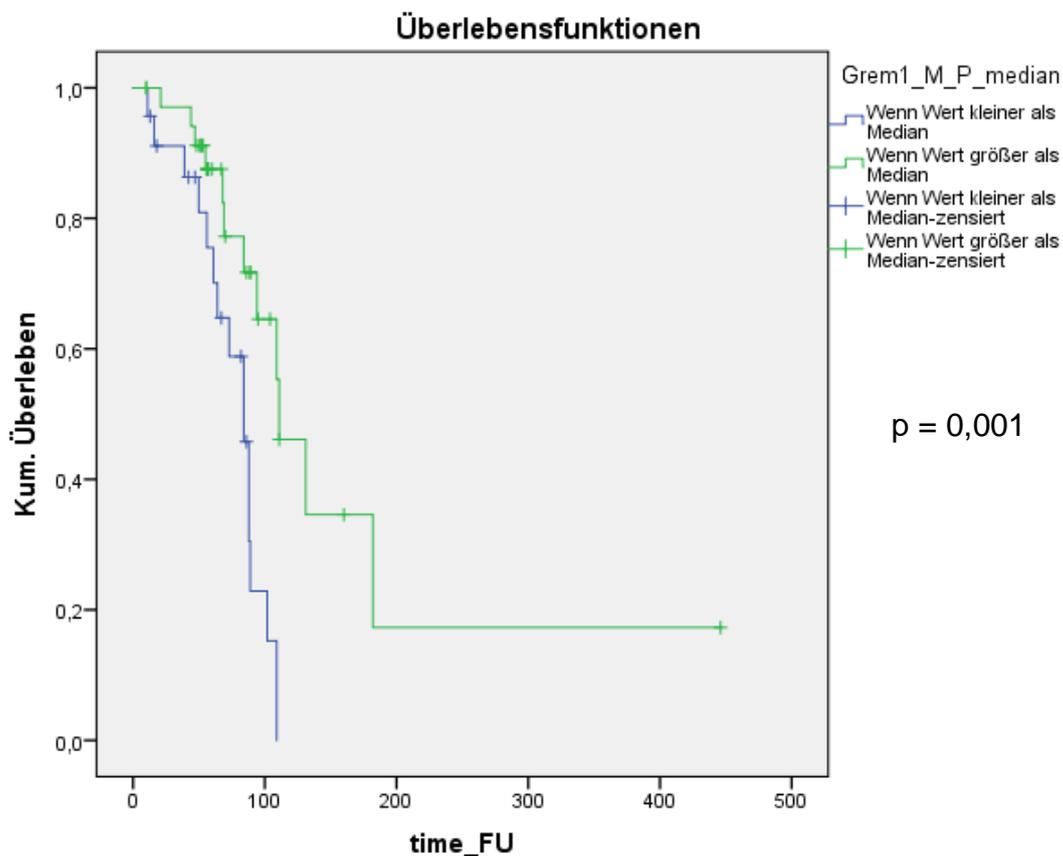


Abbildung 21: Gremlin1-Expression in Monozyten, Erreichen des kombinierten klinischen Endpunktes. Patienten, deren MFI bei der Markerkonstellation permeabilisierter, Gremlin1-markierter Monozyten oberhalb des Median-Wertes lag (grüne Linie), wiesen ein besseres Outcome auf, als Patienten, deren MFI-Wert unterhalb des Medians lag (blaue Linie). Dies ging mit späterer/weniger Rehospitalisierung aufgrund erneut notwendiger Herzkatheteruntersuchung einher. Der p-Wert gibt dabei die statistische Signifikanz an. Legende: FU=Follow-up, Kum.=Kumulatives, Grem1=Gremlin1, M=Monozyten, P=Permeabilisiert.

Lag der MFI-Wert der Patienten bei Gremlin2-markierten, permeabilisierten Monozyten oberhalb des Medians (n=36), so hatten diese Patienten eine signifikant bessere Prognose ($p=0,018$) als Patienten, deren MFI-Wert unterhalb des Medians lag (n=23, Abb.22).

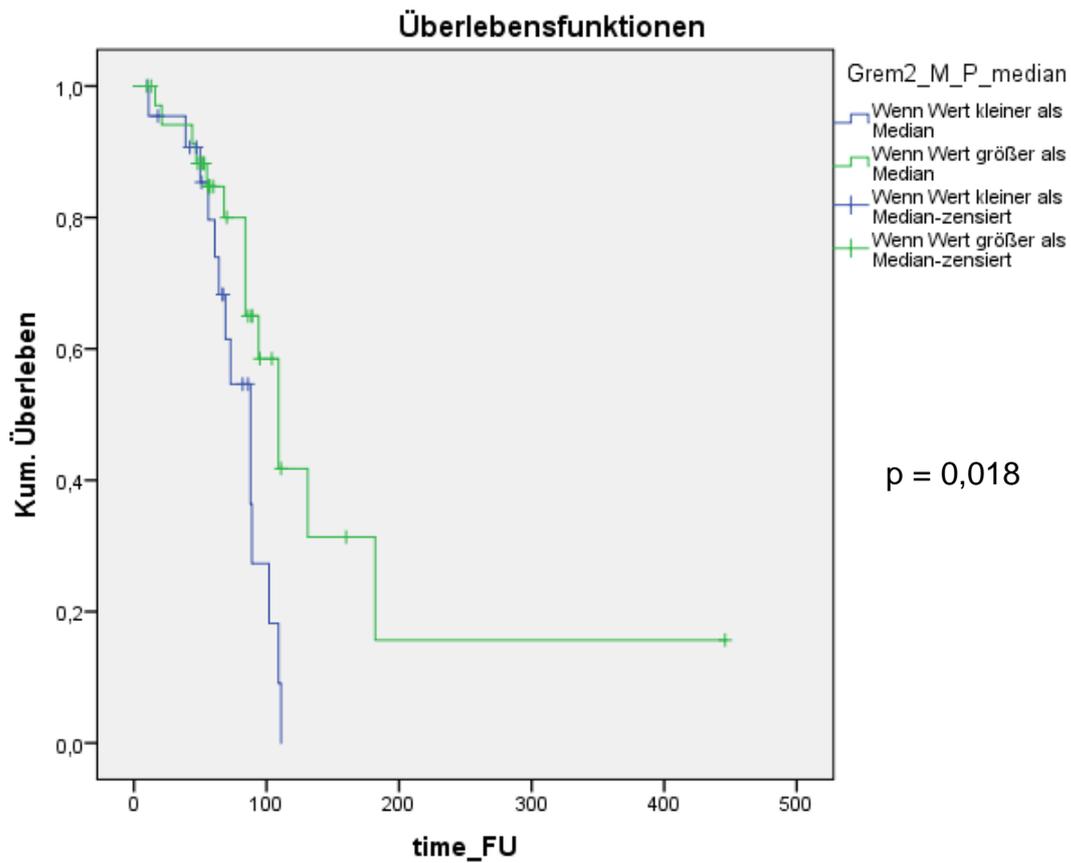


Abbildung 22: Follow-up Analyse mit Erreichen des kombinierten klinischen Endpunktes mit Gremlin2-Expression in Monozyten. Patienten, deren MFI bei der Markerkonstellation permeabilisierter, Gremlin2-markierter Monozyten oberhalb des Median-Wertes lag (grüne Linie), wiesen ein besseres Outcome auf, als Patienten, deren MFI-Wert unterhalb des Medians lag (blaue Linie). Dies ging mit späterer/weniger Rehospitalisierung aufgrund erneut notwendiger Herzkatheteruntersuchung einher. Der p-Wert gibt dabei die statistische Signifikanz an. Legende: FU=Follow-up, Kum.=Kumulatives, Grem2=Gremlin2, M=Monozyten, P=Permeabilisiert.

Lag der MFI-Wert von nicht-permeabilisierten Monozyten, welche mit Gremlin2-markiert wurden, oberhalb des Medians (n=32), so hatten diese Patienten ein signifikant besseres Outcome (p=0,025), als Patienten, deren MFI-Wert kleiner als der Median war (n=27) (Abb.23).

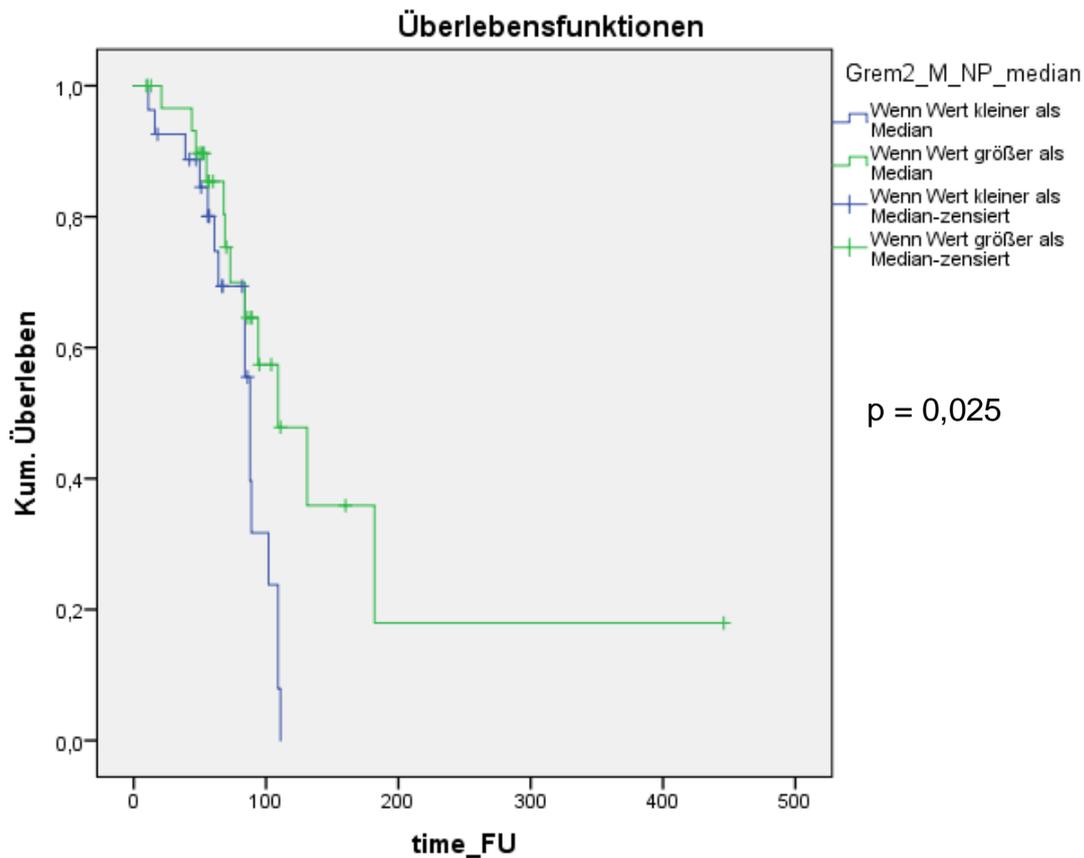


Abbildung 23: Follow-up Analyse mit Erreichen des kombinierten klinischen Endpunktes bei Patienten mit Gremlin2-Expression auf Monozyten. Patienten, deren MFI bei der Markerkonstellation nicht-permeabilisierter, Gremlin2-markierter Monozyten oberhalb des Median-Wertes lag (grüne Linie), wiesen ein besseres Outcome auf, als Patienten, deren MFI-Wert unterhalb des Medians lag (blaue Linie). Dies ging mit späterer/weniger Rehospitalisierung aufgrund erneut notwendiger Herzkatheteruntersuchung einher. Der p-Wert gibt dabei die statistische Signifikanz an. Legende: FU=Follow-up, Kum.=Kumulatives, Grem2=Gremlin2, M=Monozyten, NP=Nicht-Permeabilisiert.

Allgemein gilt für alle genannten Markerkonstellationen: Gremlin1 und Gremlin2 markierte Zellen (Thrombozyten und Monozyten) zeigen statistisch signifikante Zusammenhänge; liegt der MFI-Wert der Patienten oberhalb des jeweiligen Medians, so ist die Prognose für diese Patienten bezüglich erneuter Herzkatheterintervention oder kardialer Dekompensation deutlich besser, als bei Patienten, deren MFI-Wert unterhalb des Medians liegt.

4. Diskussion

4.1. Die wichtigsten Aussagen der Studie in der Übersicht

Die Analyse der Kohortendaten mit Variablen wie Alter, kardiovaskulärer Anamnese und Risikofaktoren, Laborparametern und Medikamenteneinnahme kam zu folgenden signifikanten Unterschieden zwischen den einzelnen Subkohorten SAP, ACS und Aortenklappenstenose: Parameter wie Alter und Geschlecht sind signifikant unterschiedlich. Vor allem Patienten mit stabiler Angina pectoris weisen kardiovaskuläre Risikofaktoren auf und hatten einen Myokardinfarkt, der länger als 30 Tage zurückliegt. Patienten mit akutem Koronarsyndrom hatten eine deutliche höhere monozytäre Expression von BMP2 als Patienten mit SAP. Die Expression von BMP7 auf Monozyten und Gremlin1 und Gremlin2 auf Thrombozyten und Monozyten war deutlich höher bei Patienten mit Aortenstenose als bei Patienten mit SAP oder ACS. Waren kardiale Nekrosemarker wie Troponin I bei ACS-Patienten erhöht, so wiesen diese Patienten eine erhöhte Expression von Gremlin1 und Gremlin2 auf Thrombozyten, sowie BMP7 auf Monozyten auf. Bei Patienten mit Aortenstenose war Troponin I erhöht bei erhöhter Expression von Gremlin2 auf Thrombozyten und Monozyten, sowie BMP2 auf Monozyten. In der Kaplan Meier Analyse erreichten signifikant mehr Patienten mit Gremlin1- und Gremlin2-Expression unterhalb des Medians früher den klinisch kombinierten Endpunkt (Rehospitalisierung).

4.2 Wichtigste Ergebnisse für die SAP-Kohorte

Patienten mit SAP zeigten geringfügig erhöhte Gremlin1-Expression in Monozyten; dies korreliert mit dem kardialen Nekrosemarker Troponin I als klinischem Parameter und erhöhtem kardiovaskulären Risiko [181].

4.3 Wichtigste Ergebnisse für die ACS-Kohorte

Der MFI von BMP2 auf (permeabilisierten) Monozyten war vor allem erhöht bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom wie bereits von Nakagawa et al. beschrieben [89]. Der MFI von BMP2 auch auf nicht permeabilisierten Monozyten war vor allem bei gleicher Kohorte erhöht, was die Arbeit von Quiyang et al. zeigt [177]. Erhöhte BMP2-Expression hat folglich im akuten Myokardgeschehen einen entscheidenden Einfluss [179]. Generell wird im Myokardgewebe postinfarktös eine erhöhte BMP2-Expression deutlich, welche die Regeneration des Gewebes auch nach dem Infarkt herunterreguliert und somit danach nachweisbar bleibt [180]. Sanders et al. berichten über eine Up-Regulation von Gremlin2 nach einem Myokardinfarkt als Limitation der im Infarktgewebe ablaufenden Inflammation [179]. Patienten mit ACS zeigen bei erhöhten Troponin-Werten erhöhte BMP7-, Gremlin1- und Gremlin2-Expression in Thrombozyten und Monozyten und wiesen somit ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko auf [181].

4.4 Wichtigste Ergebnisse für die Aortenstenosen-Kohorte

Das Vorkommen von BMP7 auf Monozyten ist bei Aortenklappenstenosen erhöht und unterscheidet sich signifikant von der Expression bei Patienten mit ACS; dessen inhibitorische Rolle in den Vorgängen der Atherosklerose wie Muskelzellproliferation und -differenzierung sind bereits durch Dorai et al. beschrieben worden [67], sorgen also vor allem bei chronischen Vorgängen wie Aortenklappenstenose für eine Down-Regulation der Inflammation. Der MFI von Gremlin1 bzw. Gremlin2 sowohl auf Thrombozyten als auch auf Monozyten war bei Patienten mit Aortenklappenstenose erhöht. Eine Erhöhung der Gremlins andererseits kann höchstens Rückschlüsse darüber zulassen, dass bei dem Vorgang die Marker, welche die Inflammation und somit das Fortschreiten der

Klappenkalzifizierung vorantreiben, durch deren Inhibitoren wie Gremlin gestoppt werden sollen, als Gegenregulationsmaßnahme des Körpers [178]; Dieselben Patienten zeigen bei erhöhten Troponin-Werten erhöhte BMP2-, Gremlin2-Expression in Thrombozyten und Monozyten. BMP2-, und Gremlin2-Expression korrelieren hier mit der Höhe des Troponin I-Wertes und somit mit dem Risiko für kardiale Nekrosen [181].

4.5 Analyse der Kaplan-Meier-Kurven

Patienten mit Gremlin1- und Gremlin2-Expressionswerten oberhalb des Medians haben eine bessere klinische Prognose, wenn es um Rehospitalisierung wegen Herzinsuffizienz, Verschlechterung der LV-Funktion oder erneute Koronarintervention geht. Bereits Sanders et al. wiesen eine protektive Wirkung von Gremlin2 nach [179]; Müller et al. statuierten, dass Gremlin1 den Progress der Atherosklerose und somit deren Krankheitsbilder mildern kann [126]. Negative Effekte bezüglich Outcome konnten jedoch für die BMPs nicht statistisch signifikant nachgewiesen werden.

4.6 Limitationen der Studie

Die Ergebnisse dieser Studie beruhen auf FACS-Analysen; Immunhistologie und ELISA-Verfahren können noch weitere Aufschlüsse darüber geben, wie sich das Verhalten von BMPs und Gremlin auf CD14- und CD42b-positiven Zellen präsentiert und wie sich die Ausschüttung der Marker aus diesen Zellen nach einem kardialen Ereignis und nach Intervention im Blut verhält. Bei der statistischen Analyse konnten häufig nur dann signifikante Ergebnisse festgestellt werden, wenn man die Gruppe der Aortenstenosenpatienten mit einbezog, nicht bei KHK-Patienten allein; auch der Vergleich der kranken Patienten mit der Kontrollgruppe der gesunden Probanden ließ keine signifikanten Unterschiede (Gesund vs. Krank) erkennen. Dies lag an der vor allem kleinen ACS-Kohorte, welche in weiterführenden Studien größer gewählt werden sollte. Für den Vergleich von Medikamenten mit der Expression von BMPs oder Gremlin wurde die Aufnahmemedikation herangezogen; hier muss

bedacht werden, dass Patienten formal diese Medikation erhielten, aber nicht exakt nachgewiesen werden kann, ob Patienten der Medikation auch gewissenhaft nachgekommen sind. Für die Follow-up Ergebnisse gilt, dass die Endpunkte prädiktiv gewählt wurden; nur für einen Endpunkt konnten Aussagen getroffen werden. Um für die weiteren Endpunkte wie erneuter Myokardinfarkt, Stent-Thrombose oder Tod ebenfalls Aussagen treffen zu können, müssen mehr Patienten rekrutiert werden. Diese Studie ist eine Beobachtungsstudie; es sind noch weitere Studien nötig, um zu untersuchen, ob die Ergebnisse klinisch relevant sind.

4.7 Klinische Bedeutung der Ergebnisse

Die Messungen sollten den Zusammenhang von molekularen Vorgängen und daraus resultierenden klinischen Folgerungen verdeutlichen und ferner aufzeigen, wie sich die Zellpopulationen Thrombozyten/Monozyten im Verhältnis zu den gemessenen Markern BMP2, BMP4, BMP7, Gremlin1 und Gremlin2 zur Klinik und zum Outcome der Patienten verhalten und ob sich daraus ein Zusammenhang ergibt, welcher Patienten als Hochrisiko-Patienten einordnen lässt. Anhand der Ergebnisse kann man für die klinische Bedeutung der Messungen folgende Aussagen treffen: BMP4 ist zur klinischen Evaluation der Patienten oder Kontrolle nicht geeignet. Nur die monozytären Messungen für BMP2 und BMP7 ergaben signifikante Unterschiede, jedoch nicht für die Follow-up Analysen. Hier war nur die Expression von Gremlin1 und Gremlin2 zur Identifizierung von Hochrisiko-Patienten interessant. Endgültige Aussagen zum Einfluss von BMP2, BMP7, Gremlin1 und Gremlin2 auf Endpunkte wie Tod, kardiovaskulärer Tod, kardiovaskuläres Ereignis, erneuter Herzinfarkt, apoplektischer Insult etc. sollten in größeren Kohorten und einem längeren Follow-up Zeitraum reevaluiert werden. Aus dieser Studie lässt sich derzeit nur für die fünf signifikanten Markerkonstellationen (Gremlin1, Thrombozyten, permeabilisiert und nicht-permeabilisiert, Gremlin1 Monozyten permeabilisiert, Gremlin2, Monozyten, permeabilisiert und nicht-permeabilisiert) ein Nutzen der routinemäßigen Messung bei Patienten in der Klinik eruieren. BMP2 könnte ein

Target für neue therapeutische Strategien sein bei Patienten mit ACS; Gremlin1, Gremlin2 und BMP7 könnten ein Target sein bei Patienten mit Aortenklappenstenose. Deshalb könnte die Bestimmung von BMP2, BMP7, Gremlin1 und Gremlin2 in der klinischen Routine zur Risikostratifizierung bei Patienten mit ACS (BMP2) und Aortenklappenstenose (BMP7, Gremlin1, Gremlin2) hilfreich sein.

4.8 Schlussfolgerungen

Die hier dargestellten Ergebnisse lassen eine Vielzahl an Rückschlüssen zu. Die statistisch signifikant dargestellten Markerkonstellationen zeigen Folgendes: erhöhte BMP2-Vorkommen in oder auf CD14-positiven Zellen (vor allem Monozyten) waren vor allem bei ACS-Patienten feststellbar. BMP7-Vorkommen auf Monozyten waren erhöht bei Patienten mit Aortenklappenstenosen, ebenso wie Gremlin1- und Gremlin2-Vorkommen. BMP7- und Gremlin1-Vorkommen korrelieren mit der Höhe der Cholesterin-Blutwerte, und besitzen somit klinische Relevanz, da erhöhte Cholesterinwerte pathognomonisch für atherosklerotisch-assoziierte Krankheitsbilder stehen [9]. Auch die Anzahl der Thrombozyten und somit die Möglichkeit zur Thrombozytenaggregation war umso geringer, je höher die BMP7-, und Gremlin-Vorkommen waren. Diese statistischen Zusammenhänge werden durch die Erkenntnisse der Multiplate-Analysen unterstützt; auch hier ist eine deutliche Relevanz vorhanden, da Thrombozytenaggregation ebenfalls wichtig ist in der Atherombildung [130]. Die Höhe kardialer Nekrosemarker wie Troponin korrelierte bei ACS-Patienten mit der Höhe der BMP7- und Gremlin-Expression, was ebenfalls klinische Relevanz hat; auch die Höhe der Herzinsuffizienzmarker wie BNP korrelierte bei KHK-Patienten mit der Höhe der BMP2-, BMP7- und Gremlin-Vorkommen. Die unterschiedlichen Aussagen bei BMP7 lassen die Frage offen, in welchen Aspekten dieser Marker wirklich protektive Auswirkungen haben kann. BMP2-Expression zeigt gehäuft negativen Einfluss auf klinische Parameter, doch auch hier gab es wenige Ausnahmen; hier sollten ebenfalls noch weitere Studien durchgeführt werden, um zu klären, in welchen Bereichen BMP2 weniger

protektiv wirkt. Prognostisch wichtig und statistisch signifikant für das klinische Outcome der Patienten war aber vor allem die Expression von Gremlin1 und Gremlin2. Dementsprechend müssen für künftige Studien weitere Untersuchungen unternommen werden, um festzustellen, inwiefern die Gremlin1- und Gremlin2-Exprimierung auf Zellen bzw. intrazellulär protektiv auf die kardiovaskuläre Gesundheit der Patienten wirkt, wie es bereits vorbeschrieben wurde [127],[128]. Des Weiteren bleibt in dieser Studie die Rolle von BMP4 größtenteils ungeklärt, dies erfordert ebenfalls weitere Forschungsarbeiten.

Die wichtigsten Aussagen der Studie werden nochmals aufgeführt:

1. BMP2-Vorkommen auf und in Monozyten waren vor allem bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom mit erhöhter Inflammation feststellbar.
2. BMP7-, Gremlin1- und Gremlin2-Vorkommen waren vor allem bei Patienten mit Aortenklappenstenose signifikant erhöht.
3. Viele Untersuchungen bezüglich Laborparametern, Echokardiographiebefunden, Risikofaktoren und Medikamentenanamnese können den Einfluss von BMP2 und Gremlin1/Gremlin2 auf atherosklerotische Prozesse bestätigen, jedoch gibt es vereinzelt widersprüchliche Ergebnisse, welche es noch genauer zu evaluieren gilt in fortführenden Studien.

4. Das klinische Outcome bezüglich Rehospitalisierungs-Rate war umso besser, je mehr Gremlin1- und Gremlin2-Expression diese Patienten aufwiesen.

5. Zusammenfassung

Nach heutigem Stand der Wissenschaft sind die Kenntnisse über molekulare Eigenschaften der Bone Morphogenetic Proteins und ihrer Antagonisten Gremlin1 und Gremlin2 bezüglich ihrer Rolle bei kardiovaskulären Erkrankungen lückenhaft. Ziel der Dissertation war es, herauszufinden, inwiefern die Expressions-Höhe dieser Marker auf Monozyten und Thrombozyten bei Patienten mit SAP, ACS und Aortenstenose mit verschiedenen klinischen Parametern und der kardiovaskulären Prognose dieser Patienten zusammenhängt. Es wurden insgesamt 93 Patienten untersucht, die sich entweder elektiv oder notfallmäßig einer Herzkatheteruntersuchung bzw. –intervention unterzogen aufgrund einer koronaren Herzerkrankung oder Aortenklappenstenose. Mittels FACS-Analysen wurde die Expression von BMPs und Gremlins auf bzw. in CD42b- (vor allem Thrombozyten) und CD14- (vor allem Monozyten) positiven Zellen untersucht und deren Assoziation mit klinischen Markern (Alter, Geschlecht, Risikofaktoren: Hyperlipidämie, art. Hypertonie, Diabetes mellitus, Laborrisikowerten: LDL-Cholesterin, Troponin I, BNP, CRP, residuale Thrombozytenfunktion) untersucht. Insgesamt waren die BMP2-Vorkommen auf Monozyten bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom erhöht, und die BMP7-, Gremlin1- und Gremlin2-Vorkommen bei Patienten mit Aortenklappenstenose erhöht. Des Weiteren ließ sich ein Zusammenhang zwischen erhöhter BMP2- bzw. niedriger BMP7- und Gremlin-Expression und erhöhter kardialer Risikofaktoren feststellen. Außerdem war ein besseres klinisches Outcome bei Patienten mit höherer Gremlin1- und Gremlin2-Exprimierung feststellbar.

Daher könnten vor allem Gremlin1 und Gremlin2 als Biomarker zur Risikostratifizierung für kardiovaskuläre Ereignisse herangezogen werden, für die anderen Marker konnte kein Einfluss auf die weitere klinische Prognose festgestellt werden. Zudem könnten sich aus den vorliegenden Ergebnissen neue Therapiemöglichkeiten ergeben, etwa durch Beeinflussung der BMP2-Expression oder der Gremlin-Expression zur kardioprotektiven Therapie.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Bethesda: NHLBI morbidity and mortality chartbook. National Heart, Lung, and Blood Institute, May 2002.
- [2] Statistisches Bundesamt – Todesursachen in Deutschland.
- [3] Lopez AD, et al. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2015 Dec 5:2287-323.
- [4] Wang JC, Bennett M. Aging and atherosclerosis: mechanisms, functional consequences, and potential therapeutics for cellular senescence. *Circ Res*. 2012 Jul 6;111(2):245-59.
- [5] Mozaffarian D, et al. Executive Summary: Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2016 Jan 26;133(4):447-54.
- [6] Assmann G, Schulte H. The Prospective Cardiovascular Münster (PROCAM) study: prevalence of hyperlipidemia in persons with hypertension and/or diabetes mellitus and the relationship to coronary heart disease. *Am Heart J*. 1988 Dec;116(6 Pt 2):1713-24.
- [7] Böhm I. et al. Molekulare Bildgebung der Apoptose bei kardio-vaskulären Erkrankungen. *Fortschr Röntgenstr RöFo* 2007; 179: 780-789.
- [8] R. Ross, J. Glomset, and L. Harker. Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol*. 1977 Mar; 86(3): 675–684.
- [9] Jesus A Araujo and Andre E Nel. Particulate matter and atherosclerosis: role of particle size, composition and oxidative stress. *Part Fibre Toxicol*. 2009; 6: 24.
- [10] Yanwen Qin and Guo-Ping Shi. Cysteinyl cathepsins and mast cell proteases in the pathogenesis and therapeutics of cardiovascular diseases. *Pharmacol Ther*. 2011 Sep; 131(3): 338–350.
- [11] Satoki Homma, et al. Histological Changes and Risk Factor Associations in Type 2 Atherosclerotic Lesions (Fatty Streaks) in Young Adults. *Atherosclerosis*. 2011 Nov; 219(1): 184–190.
- [12] Herbert Renz-Polster, Steffen Krautzig, 2008, *Basislehrbuch Innere Medizin*. 5. Auflage, S. 61-63, Elsevier, München.

- [13] Kwang Kon Koh, et al. Combination therapy for treatment or prevention of atherosclerosis: Focus on the lipid-RAAS interaction. *Atherosclerosis*. 2010 Apr; 209(2): 307–313.
- [14] Breyne J, et al. Atherosclerotic-like process in aortic stenosis: activation of the tissue factor-thrombin pathway and potential role through osteopontin alteration. *Atherosclerosis*. 2010 Dec;213(2):369-76.
- [15] Nkomo VT, Gardin JM, Skelton TN, Gottdiener JS, Scott CG, Enriquez-Sarano M. Burden of valvular heart diseases: A population-based study. *Lancet*. 2006;368:1005–1011.
- [16] Qian J, Chen Z, Ge J, Ma J, Chang S, Fan B, Liu X, Ge L. Relationship between aortic valve calcification and the severity of coronary atherosclerotic disease. *J Heart Valve Dis*. 2010;19:466–470.
- [17] Freeman RV, Otto CM. Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies. *Circulation*. 2005 Jun 21;111(24):3316-26.
- [18] Tutar E, Ekici F, Atalay S, Nacar N. The prevalence of bicuspid aortic valve in newborns by echocardiographic screening. *Am Heart J*. 2005 Sep;150(3):513-5.
- [19] Rajamannan NM, Subramaniam M, Rickard D, Stock SR, Donovan J, Springett M, Orszulak T, Fullerton DA, Tajik AJ, Bonow RO, Spelsberg T. Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype. *Circulation*. 2003 May 6;107(17):2181-4.
- [20] Takahashi K, Satoh M, Takahashi Y, Osaki T, Nasu T, Tamada M, Okabayashi H, Nakamura M, Morino Y. Dysregulation of ossification related microRNAs in circulating osteogenic progenitor cells obtained from patients with aortic stenosis. *Clin Sci (Lond)*. 2016 Apr 14. pii: CS20160094.
- [21] Akat K, Borggreffe M, Kaden JJ. Aortic valve calcification: basic science to clinical practice. *Heart*. 2009 Apr;95(8):616-23.
- [22] Rosenhek R. Aortic stenosis: disease severity, progression, timing of intervention, and role in monitoring transcatheter valve implantation. In: Otto CM, editor. *The Practice of Clinical Echocardiography*. 4th. Elsevier/Saunders; 2012. pp. 425–449.
- [23] Baumgartner H, Hung J, Bermejo J, Chambers JB, Evangelista A, Griffin BP, Jung B, Otto CM, Pellikka PA, Quiñones M; EAE/ASE. Echocardiographic assessment of valve stenosis: EAE/ASE recommendations for clinical practice. *Eur J Echocardiogr*. 2009 Jan;10(1):1-25.

- [24] Ozkan A, Kapadia S, Tuzcu M, Marwick TH. Assessment of left ventricular function in aortic stenosis. *Nat Rev Cardiol.* 2011 Jun 14;8(9):494-501.
- [25] García-Villarreal O, Heredia-Delgado JA, Ramírez-González B, Saldaña-Becerra MA, González-Alanis MÁ, García-Guevara MI, Sánchez-Sánchez LM. Left ventricular adaptive response after surgery of aortic valve replacement for severe valvular stenosis. *Gac Med Mex.* 2016 Mar-Apr;152(2):191-5.
- [26] R.A. Nishimura, C.M. Otto, R.O. Bonow, ACC/AHA Task Force Members, et al. 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation,* 129 (2014), pp. e521–e643
- [27] Eggebrecht H, Mehta RH. Transcatheter aortic valve implantation (TAVI) in Germany 2008-2014: on its way to standard therapy for aortic valve stenosis in the elderly? *EuroIntervention.* 2016 Jan 22;11(9):1029-33.
- [28] Möllmann H, Bestehorn K, Bestehorn M, Papoutsis K, Fleck E, Ertl G, Kuck KH, Hamm C. In-hospital outcome of transcatheter vs. surgical aortic valve replacement in patients with aortic valve stenosis: complete dataset of patients treated in 2013 in Germany. *Clin Res Cardiol.* 2016 Jan 30.
- [29] Stewart RA, Kerr AJ, Whalley GA, et al. Left ventricular systolic and diastolic function assessed by tissue Doppler imaging and outcome in asymptomatic aortic stenosis. *Eur Heart J.* 2010;31:2216–22.
- [30] Rosenhek R, Klaar U, Schemper M, et al. Mild and moderate aortic stenosis. Natural history and risk stratification by echocardiography. *Eur Heart J.* 2004;25:199–205.
- [31] Otto CM, Pearlman AS. Doppler echocardiography in adults with symptomatic aortic stenosis. Diagnostic utility and cost-effectiveness. *Arch Intern Med.* 1988 Dec;148(12):2553-60.
- [32] Lancellotti P, Donal E, Magne J, Moonen M, O'Connor K, Daubert JC, Pierard LA. Risk stratification in asymptomatic moderate to severe aortic stenosis: the importance of the valvular, arterial and ventricular interplay. *Heart.* 2010 Sep;96(17):1364-71.
- [33] Rosenhek R, Binder T, Porenta G, Lang I, Christ G, Schemper M, Maurer G, Baumgartner H. Predictors of outcome in severe, asymptomatic aortic stenosis. *N Engl J Med.* 2000; 343: 611–617.
- [34] Möllmann H, Bestehorn K, Bestehorn M, Papoutsis K, Fleck E, Ertl G, Kuck KH, Hamm C. In-hospital outcome of transcatheter vs. surgical aortic valve replacement in patients with aortic valve stenosis: complete dataset of patients treated in 2013 in Germany. *Clin Res Cardiol.* 2016 Jan 30.

[35] Eggebrecht H, Mehta RH. Transcatheter aortic valve implantation (TAVI) in Germany 2008-2014: on its way to standard therapy for aortic valve stenosis in the elderly? *EuroIntervention*. 2016 Jan 22;11(9):1029-33.

[36] Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M, De Simone G, Ferguson TB, Flegal K, Ford E, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern S, Ho M, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lackland D, Lisabeth L, Marelli A, McDermott M, Meigs J, Mozaffarian D, Nichol G, O'Donnell C, Roger V, Rosamond W, Sacco R, Sorlie P, Stafford R, Steinberger J, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Wong N, Wylie-Rosett J, Hong Y; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. 2009 Jan 27;119(3):480-6.

[37] Capewell S, Ford ES, Croft JB, Critchley JA, Greenlund KJ, Labarthe DR. Cardiovascular risk factor trends and potential for reducing coronary heart disease mortality in the United States of America. *Bull World Health Organ*. 2010 Feb;88(2):120-30.

[38] Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999 Jan 14;340(2):115-26.

[39] Spertus JA, Jones P, McDonell M, Fan V, Fihn SD. Health status predicts long-term outcome in patients with coronary disease. *Circulation* 2002; 106:43-9.

[40] Parker JD, Parker JO. Stable angina pectoris: the medical management of symptomatic myocardial ischemia. *Can J Cardiol*. 2012 Mar-Apr;28(2 Suppl):S70-80.

[41] Davis TM, Coleman RL, Holman RR; UKPDS Group. Prognostic significance of silent myocardial infarction in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus: United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) 79. *Circulation*. 2013 Mar 5;127(9):980-7.

[42] Norbert Suttrop, Manfred Dietel, Martin Zeitz, 2009, *Harrisons Innere Medizin*. 17. Auflage, S. 1882, Lehmanns Media (Verlag), Berlin.

[43] Gorlin R, Brachfeld N, Macleod C, Bopp P. Effect of nitroglycerin on the coronary circulation in patients with coronary artery disease or increased left ventricular work. *Circulation*. 1959 May;19(5):705-18.

[44] Kauffmann et al., 2006, *Radiologie*, 4. Auflage, S.197, Urban & Fischer München/Jena.

[45] Büll, Schicha, Biersack, Knapp, Reiners, Schober, 2001, *Nuklearmedizin*, S.213f, Thieme, Stuttgart.

- [46] Kones R. Primary prevention of coronary heart disease: integration of new data, evolving views, revised goals, and role of rosuvastatin in management. A comprehensive survey. *Drug Des Devel Ther.* 2011;5:325-80.
- [47] Januszek R. Paraoxonase-1 and Simvastatin Treatment in Patients with Stable Coronary Artery Disease. *Int J Vasc Med.* 2016;2016:6312478
- [48] Mega JL, Stitziel NO, Smith JG, Chasman DI, Caulfield MJ, Devlin JJ, Nordio F, Hyde CL, Cannon CP, Sacks FM, Poulter NR, Sever PS, Ridker PM, Braunwald E, Melander O, Kathiresan S, Sabatine MS. Genetic risk, coronary heart disease events, and the clinical benefit of statin therapy: an analysis of primary and secondary prevention trials. *Lancet.* 2015 Jun 6;385(9984):2264-71.
- [49] Sutcliffe P, Connock M, Gurung T, Freeman K, Johnson S, Kandala NB, Grove A, Gurung B, Morrow S, Clarke A. Aspirin for prophylactic use in the primary prevention of cardiovascular disease and cancer: a systematic review and overview of reviews. *Health Technol Assess.* 2013 Sep;17(43):1-253.
- [50] Lafeber M, Spiering W, Visseren FL, Grobbee DE. Multifactorial Prevention of Cardiovascular Disease in Patients with Hypertension: the Cardiovascular Polypill. *Curr Hypertens Rep.* 2016 Apr;18(5):40.
- [51] Gillette M, Morneau K, Hoang V, Virani S, Jneid H. Antiplatelet Management for Coronary Heart Disease: Advances and Challenges. *Curr Atheroscler Rep.* 2016 Jun;18(6):35.
- [52] D'Ascenzo F, Moretti C, Bianco M, Bernardi A, Taha S, Cerrato E, Omedè P, Montefusco A, Frangieh AH, Lee CW, Campo G, Chieffo A, Quadri G, Pavani M, Zoccai GB, Gaita F, Park SJ, Colombo A, Templin C, Lüscher TF, Stone GW. Meta-Analysis of the Duration of Dual Antiplatelet Therapy in Patients Treated With Second-Generation Drug-Eluting Stents. *Am J Cardiol.* 2016 Jun 1;117(11):1714-23.
- [53] Park KL, Goldberg RJ, Anderson FA, López-Sendón J, Montalescot G, Brieger D, Eagle KA, Wyman A, Gore JM; Global Registry of Acute Coronary Events Investigators. Beta-blocker use in ST-segment elevation myocardial infarction in the reperfusion era (GRACE). *Am J Med.* 2014 Jun;127(6):503-11.
- [54] Yang JH, Hahn JY, Song YB, Choi SH, Choi JH, Lee SH, Kim JH, Ahn YK, Jeong MH, Choi DJ, Park JS, Kim YJ, Park HS, Han KR, Rha SW, Gwon HC. Association of beta-blocker therapy at discharge with clinical outcomes in patients with ST-segment elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention. *JACC Cardiovasc Interv.* 2014 Jun;7(6):592-601.
- [55] Stephan Windecker, Philippe Kolh, Fernando Alfonso, Jean-Philippe Collet, Jochen Cremer, Volkmar Falk, Gerasimos Filippatos, Christian Hamm, Stuart J. Head, Peter Jüni, A. Pieter Kappetein, Adnan Kastrati, Juhani Knuuti,

Ulf Landmesser, Günther Laufer, Franz-Josef Neumann, Dimitrios J. Richter, Patrick Schauer, Miguel Sousa Uva, Giulio G. Stefanini, David Paul Taggart, Lucia Torracca, Marco Valgimigli, William Wijns, Adam Witkowski. 2014 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization.

[56] Cai J, Pardali E, Sánchez-Duffhues G, ten Dijke P. BMP signaling in vascular diseases. *FEBS Lett.* 2012 Jul 4;586(14):1993-2002.

[57] S.M. Nelsen, J.L. Christian, Site-specific cleavage of BMP-4 by furin, PC6, and PC7. *J. Biol. Chem.*, 284, (2009), 27157– 27166.

[58] B.L. Rosenzweig, T. Imamura, T. Okadome, G.N. Cox, H. Yamashita, P. ten Dijke, C.H. Heldin, K. Miyazono, Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 92, (1995), 7632– 7636.

[59] Sánchez-Duffhues G, Hiepen C, Knaus P, Ten Dijke P. Bone morphogenetic protein signaling in bone homeostasis. *Bone.* 2015 Nov;80:43-59.

[60] Heldin CH, Miyazono K and ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature.* 1997;390:465-71.

[61] E. Canalis, A.N. Economides, E. Gazzerro, Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr. Rev.*, 24, (2003), 218– 235.

[62] D.W. Walsh, C. Godson, D.P. Brazil, F. Martin, Extracellular BMP-antagonist regulation in development and disease: tied up in knots. *Trends Cell Biol.*, 20, (2010), 244– 256.

[63] Y.E. Zhang, Non-Smad pathways in TGF-β signaling. *Cell Res.*, 19, (2009), 128– 139.

[64] K.M. Mulder, Role of Ras and Mapks in TGF-β signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 11, (2000), 23– 35.

[65] L. David, J.J. Feige, S. Bailly, Emerging role of bone morphogenetic proteins in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 20, (2009), 203– 212.

[66] T. Nakaoka, K. Gonda, T. Ogita, Y. Otawara-Hamamoto, F. Okabe, Y. Kira, K. Harii, K. Miyazono, Y. Takuwa, T. Fujita, Inhibition of rat vascular smooth muscle proliferation in vitro and in vivo by bone morphogenetic protein-2. *J. Clin. Invest.*, 100, (1997), 2824– 2832.

[67] H. Dorai, T.K. Sampath, Bone morphogenetic protein-7 modulates genes that maintain the vascular smooth muscle cell phenotype in culture. *J. Bone Joint Surg. Am.*, 83-A, Suppl. 1 (2001), S70– 8.

[68] Boström KI, Jumabay M, Matveyenko A, Nicholas SB, Yao Y. Activation of vascular bone morphogenetic protein signaling in diabetes mellitus. *Circ Res.* 2011 Feb 18;108(4):446-57.

[69] W.S. Chung, O. Andersson, R. Row, D. Kimelman, D.Y. Stainier. Suppression of Alk8-mediated Bmp signaling cell-autonomously induces pancreatic beta-cells in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107 (2010), pp. 1142–1147

[70] S.J. Richardson, A. Willcox, A.J. Bone, A.K. Foulis, N.G. Morgan. Islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetologia*, 52 (2009), pp. 1686–1688

[71] C. Bruun, G.L. Christensen, M.L. Jacobsen, M.B. Kanstrup, P.R. Jensen, H. Fjordvang, et al. Inhibition of beta cell growth and function by bone morphogenetic proteins. *Diabetologia*, 57 (2014), pp. 2546–2554

[72] J. Fadista, P. Vikman, E.O. Laakso, I.G. Mollet, J.L. Esguerra, J. Taneera, et al. Global genomic and transcriptomic analysis of human pancreatic islets reveals novel genes influencing glucose metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 111 (2014), pp. 13924–13929

[73] O. Kozawa, H. Matsuno, T. Uematsu, Involvement of p70 S6 kinase in bone morphogenetic protein signaling: vascular endothelial growth factor synthesis by bone morphogenetic protein-4 in osteoblasts. *J. Cell Biochem.*, 81, (2001), 430– 436.

[74] S. Hatakeyama, Y. Ohara-Nemoto, S. Kyakumoto, M. Satoh, Expression of bone morphogenetic protein in human adenocarcinoma cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 190, (1993), 695– 701.

[75] S. Hatakeyama, Y.H. Gao, Y. Ohara-Nemoto, H. Kataoka, M. Satoh, Expression of bone morphogenetic proteins of human neoplastic epithelial cells. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 42, (1997), 497– 505.

[76] H. Ide, T. Yoshida, N. Matsumoto, K. Aoki, Y. Osada, T. Sugimura, M. Terada, Growth regulation of human prostate cancer cells by bone morphogenetic protein-2. *Cancer Res.*, 57, (1997), 5022– 5027.

[77] Y. Kiyozuka, H. Nakagawa, H. Senzaki, Y. Uemura, S. Adachi, Y. Teramoto, T. Matsuyama, K. Bessho, A. Tsubura, Bone morphogenetic protein-2 and type IV collagen expression in psammoma body forming ovarian cancer. *Anticancer Res.*, 21, (2001), 1723– 1730.

[78] H. Deng, R. Makizumi, T.S. Ravikumar, H. Dong, W. Yang, W.L. Yang, Bone morphogenetic protein-4 is overexpressed in colonic adenocarcinomas and promotes migration and invasion of HCT116 cells. *Exp. Cell Res.*, 313, (2007), 1033– 1044.

- [79] M. Bieniasz, K. Oszejca, M. Eusebio, J. Kordiak, J. Bartkowiak, J. Szemraj, The positive correlation between gene expression of the two angiogenic factors: VEGF and BMP-2 in lung cancer patients. *Lung cancer*, 66, (2009), 319– 326.
- [80] Miyazaki Y, Oshima K, Fogo A, Ichikawa I. Evidence that bone morphogenetic protein 4 has multiple biological functions during kidney and urinary tract development. *Kidney Int.* 2003 Mar;63(3):835-44.
- [81] Stahls PF 3rd, Lightell DJ Jr, Moss SC, Goldman CK, Woods TC. Elevated serum bone morphogenetic protein 4 in patients with chronic kidney disease and coronary artery disease. *J Cardiovasc Transl Res.* 2013 Apr;6(2):232-8.
- [82] Mitu G, Hirschberg R. Bone morphogenetic protein-7 (BMP7) in chronic kidney disease. *Front Biosci.* 2008 May 1;13:4726-39.
- [83] Markić D, Celić T, Spanjol J, Grsković A, Bobinac D, Fuckar Z. Expression of bone morphogenetic protein-7, its receptors and Smad1/5/8 in normal human kidney and renal cell cancer. *Coll Antropol.* 2010 Apr;34 Suppl 2:149-53.
- [84] Rong S, Zhao X, Jin X, Zhang Z, Chen L, Zhu Y, Yuan W. Vascular calcification in chronic kidney disease is induced by bone morphogenetic protein-2 via a mechanism involving the Wnt/ β -catenin pathway. *Cell Physiol Biochem.* 2014;34(6):2049-60.
- [85] K.B. Lane, R.D. Machado, M.W. Pauciulo, J.R. Thomson, J.A. Phillips 3rd, J.E. Loyd, W.C. Nichols, R.C. Trembath, Heterozygous germline mutations in *BMP2*, encoding a TGF- β receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. *Nat. Genet.*, 26, (2000), 81– 84.
- [86] A. Gangopahyay, M. Oran, E.M. Bauer, J.W. Wertz, S.A. Comhair, S.C. Erzurum, P.M. Bauer, Bone morphogenetic protein receptor II is a novel mediator of endothelial nitric-oxide synthase activation. *J. Biol. Chem.*, 286, (2011), 33134– 33140.
- [87] Caira FC, Stock SR, Gleason TG, McGee EC, Huang J, Bonow RO, Spelsberg TC, McCarthy PM, Rahimtoola SH and Rajamannan NM. Human degenerative valve disease is associated with up-regulation of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 receptor-mediated bone formation. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47:1707-12.
- [88] Hruska KA, Mathew S and Saab G. Bone morphogenetic proteins in vascular calcification. *Circ Res.* 2005;97:105-14.
- [89] Y. Nakagawa, K. Ikeda, Y. Akakabe, M. Koide, M. Uraoka, K.T. Yutaka, R. Kurimoto-Nakano, T. Takahashi, S. Matoba, H. Yamada, M. Okigaki, H. Matsubara, Paracrine osteogenic signals via bone morphogenetic protein-2

accelerate the atherosclerotic intimal calcification in vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 30, (2010), 1908– 1915.

[90] Deng ZL, Sharff KA, Tang N, Song WX, Luo J, Luo X, Chen J, Bennett E, Reid R, Manning D, Xue A, Montag AG, Luu HH, Haydon RC and He TC. Regulation of osteogenic differentiation during skeletal development. *Front Biosci.* 2008;13:2001-21.

[91] Eghbali-Fatourehchi GZ, Lamsam J, Fraser D, Nagel D, Riggs BL and Khosla S. Circulating osteoblast-lineage cells in humans. *N Engl J Med.* 2005;352:1959-66.

[92] M.Y. Speer, H.Y. Yang, T. Brabb, E. Leaf, A. Look, W.L. Lin, A. Frutkin, D. Dichek, C.M. Giachelli, Smooth muscle cells give rise to osteochondrogenic precursors and chondrocytes in calcifying arteries. *Circ. Res.*, 104, (2009), 733– 741.

[93] M. Kuwana, Y. Okazaki, H. Kodama, K. Izumi, H. Yasuoka, Y. Ogawa, Y. Kawakami, Y. Ikeda, Human circulating CD14+ monocytes as a source of progenitors that exhibit mesenchymal cell differentiation. *J. Leukoc. Biol.*, 74, (2003), 833– 845.

[94] G. Collett, A. Wood, M.Y. Alexander, B.C. Varnum, R.P. Boot-Handford, V. Ohanian, J. Ohanian, Y.W. Fridell, A.E. Canfield, Receptor tyrosine kinase Axl modulates the osteogenic differentiation of pericytes. *Circ. Res.*, 92, (2003), 1123– 1129.

[95] Spinella-Jaegle S, Roman-roman S, Faucheu C, Dunn FW, Kawai S, Gallea S, Stiot V, Blanchet AM, Courtois B, Baron R, Rawadi G. Opposite effects of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor beta 1 on osteoblast differentiation. *Bone.* 2001; 29: 323–330.

[96] Lee MH, Kim YJ, Kim HJ, Park HD, Kang AR, Kyung HM, Sung JH, Wozney JM, Kim HJ, Ryoo HM. BMP-2-induced Runx2 expression is mediated by Dlx5, and TGF- β 1 opposes the BMP-2-induced osteoblast differentiation by suppression of Dlx5 expression. *J Biol Chem.* 2003; 278: 34387–34394.

[97] Chaudhary LR, Hofmeister AM, Hruska KA. Differential growth factor control of bone formation through osteoprogenitor differentiation. *Bone.* 2004; 34: 402–411.

[98] Lee MH, Kwon TG, Park HS, Wozney JM, Ryoo HM. BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2. *Biochem Biophys Res Com.* 2003; 309: 689–694.

[99] Hedin U, Roy J, Tran PK, Lundmark K, Rahman A. Control of smooth muscle cell proliferation - the role of the basement membrane. *Thromb Haemost.* 1999; 82 (Suppl.): 23–26.

- [100] Boström K, Watson KE, Horn S, Worthman C, Herman IM, Demer LL. Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest.* 1993; 91: 1800–1809.
- [101] Dhore CR, Cleutjens J, Lutgens E, Cleutjens K, Geussens P, Kitslaar P, Tordoir J, Spronk H, Vermeer C, Daemen M. Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21: 1998–2003
- [102] Cheng SL, Shao JS, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Towler DA. Msx2 promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation of multipotent mesenchymal progenitors. *J Biol Chem.* 2003; 278: 45969–45977.
- [103] Satokata I, Ma L, Ohshima H, Bei M, Woo I, Nishizawa K, Maeda T, Takano Y, Uchiyama M, Heaney S, Peters H, Tang Z, Maxson R, Maas R. Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat Genet.* 2004; 24: 391–395.
- [104] Maranto AR, Schoen FJ. Alkaline phosphatase activity of glutaraldehyde-treated bovine pericardium used in bioprosthetic cardiac valves. *Circ Res.* 1988;63:844-8.
- [105] Rifas L, Arackal S, Weitzmann MN. Inflammatory T cells rapidly induce differentiation of human bone marrow stromal cells into mature osteoblasts. *J Cell Biochem.* 2003; 88: 650–659.
- [106] Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, De Crombrughe B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell.* 2002; 108: 17–29.
- [107] Dorai H, Vukicevic S, Sampath TK. Bone morphogenetic protein-7 (osteogenic protein-1) inhibits smooth muscle cell proliferation and stimulates the expression of markers that are characteristic of SMC phenotype in vitro. *J Cellular Physiol.* 2000; 184: 37–45.
- [108] Dorai H, Sampath TK. Bone morphogenetic protein-7 modulates genes that maintain the vascular smooth muscle cell phenotype in culture. *J Bone and Joint Surg.* 2001; 83: S70–S78.
- [109] Barbara NP, Wrana JL, Letarte M. Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Biol Chem.* 1999; 274: 584–594.
- [110] Hsu DR, Economides AN, Wang X, Eimon PM, Harland RM. The *Xenopus* dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities. *Mol Cell.* 1998;1:673–683.
- [111] Nolan K, Thompson TB. The DAN family: modulators of TGF- β signaling and beyond. *Protein Sci.* 2014 Aug;23(8):999-1012.

- [112] Rider CCC, Mulloy BB. Bone morphogenetic protein and growth differentiation factor cytokine families and their protein antagonists. *Biochem J.* 2010;429:1–12.
- [113] Nolan K, Kattamuri C, Luedeke DM, Deng X, Jagpal A, Zhang F, Linhardt RJ, Kenny AP, Zorn AM, Thompson TB. Structure of protein related to dan and cerberus: insights into the mechanism of bone morphogenetic protein antagonism. *Structure.* 2013;21:1417–1429.
- [114] Sudo S, Avsian-Kretchmer O, Wang LS, Hsueh AJ. Protein related to DAN and Cerberus is a bone morphogenetic protein antagonist that participates in ovarian paracrine regulation. *J Biol Chem.* 2004;279:23134–23141.
- [115] Ideno H, Takanabe R, Shimada A, Imaizumi K, Araki R, Abe M, Nifuji A. Protein related to DAN and Cerberus (PRDC) inhibits osteoblastic differentiation and its suppression promotes osteogenesis in vitro. *Exp Cell Res.* 2009;315:474–484.
- [116] Sun J, Zhuang F-F, Mullersman JE, Chen H, Robertson EJ, Warburton D, Liu Y-H, Shi W. BMP4 activation and secretion are negatively regulated by an intracellular Gremlin-BMP4 interaction. *J Biol Chem.* 2006;281:29349–29356.
- [117] van Bezooijen RL, Roelen BA, Visser A, van der Wee-Pals L, de Wilt E, Karperien M, Hamersma H, Papapoulos SE, Dijke ten P, Löwik CW. Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *J Exp Med.* 2004;199:805–814
- [118] Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Hayes T, Skonier JE, Shpektor D, Jonas M, Kovacevich BR, Staehling-Hampton K. Osteocyte control of bone formation via Sclerostin, a novel BMP antagonist. *EMBO J.* 2003;22:6267–6276.
- [119] Yanagita M, Okuda T, Endo S, Tanaka M, Takahashi K, Sugiyama F, Kunita S, Takahashi S, Fukatsu A, Yanagisawa M. Uterine sensitization-associated gene-1 (USAG-1), a novel BMP antagonist expressed in the kidney, accelerates tubular injury. *J Clin Invest.* 2006;116:70–79.
- [120] Kusu N, Laurikkala J, Imanishi M, Usui H, Konishi M, Miyake A, Thesleff I, Itoh N. Sclerostin is a novel secreted osteoclast-derived bone morphogenetic protein antagonist with unique ligand specificity. *J Biol Chem.* 2003;278:24113–24117.
- [121] Avsian-Kretchmer O, Hsueh AJW. Comparative genomic analysis of the eight-membered ring cystine knot-containing bone morphogenetic protein antagonists. *Mol Endocrinol.* 2004;18:1–12.

- [122] Kattamuri C, Luedeke DM, Nolan K, Rankin SA, Greis KD, Zorn AM, Thompson TB. Members of the DAN family are BMP antagonists that form highly stable noncovalent dimers. *J Mol Biol.* 2012;424:313–327.
- [123] Nolan K, Kattamuri C, Luedeke DM, Deng X, Jagpal A, Zhang F, Linhardt RJ, Kenny AP, Zorn AM, Thompson TB. Structure of protein related to dan and cerberus: insights into the mechanism of bone morphogenetic protein antagonism. *Structure.* 2013;21:1417–1429.
- [124] Mitola S, Ravelli C, Moroni E, Salvi V, Leali D, Ballmer-Hofer K, Zammataro L, Presta M. Gremlin is a novel agonist of the major proangiogenic receptor VEGFR2. *Blood.* 2010;116:3677–3680.
- [125] Kišonaitė M, Wang X, Hyvönen M. Structure of Gremlin-1 and analysis of its interaction with BMP-2. *Biochem J.* 2016 Jun 1;473(11):1593-604.
- [126] Muller I, Schonberger T, Schneider M, Borst O, Ziegler M, Seizer P, Leder C, Muller K, Lang M, Appenzeller F, Lunov O, Buchele B, Fahrleitner M, Olbrich M, Langer H, Geisler T, Lang F, Chatterjee M, de Boer JF, Tietge UJ, Bernhagen J, Simmet T and Gawaz M. Gremlin-1 is an inhibitor of macrophage migration inhibitory factor and attenuates atherosclerotic plaque growth in ApoE^{-/-} Mice. *J Biol Chem.* 2013;288:31635-45.
- [127] Müller I, Schönberger T, Schneider M, Borst O, Ziegler M, Seizer P, Leder C, Müller K, Lang M, Appenzeller F, Lunov O, Büchele B, Fahrleitner M, Olbrich M, Langer H, Geisler T, Lang F, Chatterjee M, de Boer JF, Tietge UJ, Bernhagen J, Simmet T, Gawaz M. Gremlin-1 is an inhibitor of macrophage migration inhibitory factor and attenuates atherosclerotic plaque growth in ApoE^{-/-} Mice. *J Biol Chem.* 2013 Nov 1;288(44):31635-45.
- [128] Sanders LN, Schoenhard JA, Saleh MA, Mukherjee A, Ryzhov S, McMaster WG Jr, Nolan K, Gumina RJ, Thompson TB, Magnuson MA, Harrison DG, Hatzopoulos AK. BMP Antagonist Gremlin 2 Limits Inflammation After Myocardial Infarction. *Circ Res.* 2016 Jul 22;119(3):434-49.
- [129] Gawaz M. Blood platelets - physiology, pathophysiology, membrane receptors, antiplatelet principles, and therapy for atherothrombotic diseases. New York: Thieme; 2001:1-56.
- [130] Higashi Y. Antiplatelet Drugs and Endothelial Function. *J Atheroscler Thromb.* 2016 Jul 29.
- [131] Deuel TF, Senior RM, Chang D, Griffin GL, Henrikson RL, Kaiser ET. Platelet factor 4 is chemotactic for neutrophils and monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:4584-4587.
- [132] White JG. Anatomy and structural organization of the platelet. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, eds. *Hemostasis and Thrombosis: Basic*

Principles and Clinical Practice. Philadelphia: J.B. Lippincott Company; 1994:397-413.

[133] Eichhorn ME, Ney L, Massberg S, Goetz AE. Platelet kinetics in the pulmonary microcirculation in vivo assessed by intravital microscopy. *J Vasc Res* 2002;39:330-339.

[134] Bolhuis PA, Sakariassen KS, Sixma JJ. Adhesion of blood platelets to human arterial subendothelium: role of factor VIII-Von Willebrand factor. *Haemostasis* 1979;8:312-323.

[135] Schürzinger, K. Die Rolle der Thrombozyten in den frühen Phasen der Atherogenese. *Vet.Med.Diss.* 2004.

[136] Holmsen H. Platelet secretion and energy metabolism. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, eds. *Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice.* Philadelphia: J.B. Lippincott Company; 1994.

[137] Sixma JJ. Interaction of blood platelets with the vessel wall. In: Bloom A, Forbes CD, eds. *Haemostasis and thrombosis.* Livingstone: Churchill; 1994:259-285.

[138] Ferroni P, Basili S, Davi G. Platelet activation, inflammatory mediators and hypercholesterolemia. *Curr Vasc Pharmacol.* 2003 Jun;1(2):157-69.

[139] Grüner S. Die Rolle der Thrombozyten-und Leukozyten-Endothel-Interaktion in der Atherogenese: eine In-vivo-Studie an der ApoE-Knock-Out-Maus. *Vet.Med.Diss.* 2003.

[140] Bhatt DL. Intensifying platelet inhibition--navigating between Scylla and Charybdis. *N Engl J Med.* 2007 Nov 15;357(20):2078-81

[141] Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-126.

[142] Grove EL. Antiplatelet effect of aspirin in patients with coronary artery disease. *Dan Med J.* 2012 Sep;59(9):B4506.

[143] Würtz M. Aspirin in coronary artery disease: an appraisal of functions and limitations. *Dan Med J.* 2015 Apr;62(4):B5011.

[144] Christensen KH, Grove EL, Würtz M, Kristensen SD, Hvas AM. Reduced antiplatelet effect of aspirin during 24 hours in patients with coronary artery disease and type 2 diabetes. *Platelets.* 2015;26(3):230-5.

[145] Jennings LK. Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. *Thromb Haemost.* 2009 Aug;102(2):248-57.

- [146] Aradi D, Komócsi A, Vorobcsuk A, Serebruany VL. Impact of clopidogrel and potent P2Y₁₂-inhibitors on mortality and stroke in patients with acute coronary syndrome or undergoing percutaneous coronary intervention: a systematic review and meta-analysis. *Thromb Haemost.* 2013 Jan;109(1):93-101.
- [147] Liang ZY, Han YL, Zhang XL, Li Y, Yan CH, Kang J. The impact of gene polymorphism and high on-treatment platelet reactivity on clinical follow-up: outcomes in patients with acute coronary syndrome after drug-eluting stent implantation. *EuroIntervention.* 2013 Jul;9(3):316-27.
- [148] Fujisue K, Sugiyama S, Ono T, Matsuzawa Y, Akiyama E, Sugamura K, Matsubara J, Kurokawa H, Kaikita K, Iwashita S, Sumida H, Hokimoto S, Oniki K, Nakagawa K, Matsui K, Ogawa H. Effects of endothelial dysfunction on residual platelet aggregability after dual antiplatelet therapy with aspirin and clopidogrel in patients with stable coronary artery disease. *Circ Cardiovasc Interv.* 2013 Aug;6(4):452-9.
- [149] Schrör K. Antithrombotic drugs in vascular medicine: a historical perspective. *Semin Vasc Med.* 2003 May;3(2):97-105.
- [150] Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2009; 27: 669–692.
- [151] Zhao Y, Glesne D, Huberman E. A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 2426–2431.
- [152] Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 2010; 116: e74–e80.
- [153] Wong KL, Tai JJ, Wong WC et al. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* 2011; 118: e16–e31.
- [154] Rogacev KS, Cremers B, Zawada AM et al. CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes independently predict cardiovascular events: a cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography. *J Am Coll Cardiol* 2012; 60: 1512–1520.
- [155] Kashiwagi M, Imanishi T, Tsujioka H et al. Association of monocyte subsets with vulnerability characteristics of coronary plaques as assessed by 64-slice multidetector computed tomography in patients with stable angina pectoris. *Atherosclerosis* 2010;212:171–6.
- [156] Idzkowska E, Eljaszewicz A, Miklasz P, Musial WJ, Tycinska AM, Moniuszko M. The Role of Different Monocyte Subsets in the Pathogenesis of

Atherosclerosis and Acute Coronary Syndromes. *Scand J Immunol.* 2015 Sep;82(3):163-73.

[157] Gray JL, Shankar R. Down regulation of CD11b and CD18 expression in atherosclerotic lesion-derived macrophages. *Am Surg* 1995;61 :674–9.

[158] Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003;3 :23–35.

[159] Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM et.al. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101 :4560–5.

[160] Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* 2003;73:209–12.

[161] Eljaszewicz A, Wiese M, Helmin-Basa A et.al. Collaborating with the enemy: function of macrophages in the development of neoplastic disease. *Mediators Inflamm* 2013;2013:831387.

[162] Goerdt S, Orfanos CE. Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. *Immunity* 1999;10 :137–42.

[163] Stöger JL, Gijbels MJ, van der Velden S et.al. Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2012;225 :461–8.

[164] Vasamsetti SB, Karnewar S, Gopaju R, Gollavilli PN, Narra SR, Kumar JM, Kotamraju S. Resveratrol attenuates monocyte-to-macrophage differentiation and associated inflammation via modulation of intracellular GSH homeostasis: Relevance in atherosclerosis. *Free Radic Biol Med.* 2016 Jul;96:392-405.

[165] Rothe G, Gabriel H, Kovacs E et.al. Peripheral blood mononuclear phagocyte subpopulations as cellular markers in hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16 :1437–47.

[166] Serrano CV Jr, Yoshida VM, Venturinelli ML et.al. Effect of simvastatin on monocyte adhesion molecule expression in patients with hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2001;157 :505–12.

[167] Krychtiuk KA, Kastl SP, Pfaffenberger S, Lenz M, Hofbauer SL, Wonnerth A, Koller L, Katsaros KM, Pongratz T, Goliash G, Niessner A, Gaspar L, Huber K, Maurer G, Dostal E, Wojta J, Oravec S, Speidl WS. Association of small dense LDL serum levels and circulating monocyte subsets in stable coronary artery disease. *PLoS One.* 2015 Apr 7;10(4):e0123367.

[168] Krychtiuk KA, Kastl SP, Pfaffenberger S, Pongratz T, Hofbauer SL, Wonnerth A, Katsaros KM, Goliash G, Gaspar L, Huber K, Maurer G, Dostal E,

Oravec S, Wojta J, Speidl WS. Small high-density lipoprotein is associated with monocyte subsets in stable coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2014 Dec;237(2):589-96.

[169] Berg KE, Ljungcrantz I, Andersson L et.al. Elevated CD14⁺⁺CD16⁻ monocytes predict cardiovascular events. *Circ Cardiovasc Genet* 2012;5:122–31.

[170] Mehta NN, Reilly MP. Monocyte mayhem: do subtypes modulate distinct atherosclerosis phenotypes? *Circ Cardiovasc Genet* 2012;5 :7–9.

[171] Krychtiuk KA, Kastl SP, Hofbauer SL, Wonnerth A, Goliash G, Ozsvarkozma M, Katsaros KM, Maurer G, Huber K, Dostal E, Binder CJ, Pfaffenberger S, Oravec S, Wojta J, Speidl WS. Monocyte subset distribution in patients with stable atherosclerosis and elevated levels of lipoprotein(a). *J Clin Lipidol*. 2015 Jul-Aug;9(4):533-41.

[172] Gullestad L, Ueland T, Vinge LE, Finsen A, Yndestad A, Aukrust P. Inflammatory cytokines in heart failure: mediators and markers. *Cardiology* 2012;122:23–35.

[173] Nozawa N, Hibi K, Endo M et.al. Association between circulating monocytes and coronary plaque progression in patients with acute myocardial infarction. *Circ J* 2010;74:1384–91.

[174] van der Laan AM, Hirsch A, Robbers LF et.al. A proinflammatory monocyte response is associated with myocardial injury and impaired functional outcome in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: monocytes and myocardial infarction. *Am Heart J* 2012;163:57–65.

[175] Czepluch FS, Kuschicke H, Dellas C, Riggert J, Hasenfuss G, Schäfer K. Increased proatherogenic monocyte-platelet cross-talk in monocyte subpopulations of patients with stable coronary artery disease. *J Intern Med*. 2014 Feb;275(2):144-54.

[176] Ozaki Y, Imanishi T, Tanimoto T et.al. Effect of direct renin inhibitor, aliskiren, on peripheral blood monocyte subsets and myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction. *Circ J* 2012;76:1461–8.

[177] Qiuyang L, Ting W, Ting Y, Zhaoliang S, Gangjun Z. [Effect of bone morphogenetic protein-2 on human heart valve interstitial cells calcification in vitro]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*. 2015 Aug;43(8):724-7.

[178] Venardos N, Nadlonek NA, Zhan Q, Weyant MJ, Reece TB, Meng X, Fullerton DA. Aortic valve calcification is mediated by a differential response of aortic valve interstitial cells to inflammation. *J Surg Res*. 2014 Jul;190(1):1-8.

[179] Sanders LN, Schoenhard JA, Saleh MA, Mukherjee A, Ryzhov S, McMaster WG Jr, Nolan K, Gumina RJ, Thompson TB, Magnuson MA, Harrison

DG, Hatzopoulos AK. BMP Antagonist Gremlin 2 Limits Inflammation After Myocardial Infarction. *Circ Res*. 2016 Jul 22;119(3):434-49.

[180] Chang SA, Lee EJ, Kang HJ, Zhang SY, Kim JH, Li L, Youn SW, Lee CS, Kim KH, Won JY, Sohn JW, Park KW, Cho HJ, Yang SE, Oh WI, Yang YS, Ho WK, Park YB, Kim HS. Impact of myocardial infarct proteins and oscillating pressure on the differentiation of mesenchymal stem cells: effect of acute myocardial infarction on stem cell differentiation. *Stem Cells*. 2008 Jul;26(7):1901-12.

[181] Ostermann M, Ayis S, Tuddenham E, Lo J, Lei K, Smith J, Sanderson B, Moran C, Collinson P, Peacock J, Rhodes A, Treacher D. Cardiac Troponin Release is Associated with Biomarkers of Inflammation and Ventricular Dilatation During Critical Illness. *Shock*. 2016 Nov 29.

7. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde in der Klinik / am Institut Universitätsklinik Tübingen, Medizinische Klinik, Abteilung III, Experimentelle Kardiologie unter Betreuung von Prof. Dr. med. Tobias Geisler und PD Dr. med. Iris Irmgard Müller durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch / in Zusammenarbeit mit PD Dr. med. Iris Irmgard Müller und Dr. med. Karin Müller.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Frau Lydia Laptev und Claudia Posavec von mir durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Dr. med. Karin Müller und durch mich.

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

Tübingen, den 14.06.2017

8. Danksagung

Herzlichen Dank an...

... PD Dr. med. Iris Müller, dafür, dass Sie mich als Doktorandin für diese Doktorarbeit angenommen hat und sich immer Zeit genommen hat für meine Fragen.

... Dr. med. Karin Müller, dass Sie mir bei der Auswertung mit Rat und Tat zur Seite stand und mir dabei eine große Hilfe war.

... und zu guter Letzt danke ich noch Christoph, für seine Motivation und seelischen und moralischen Beistand.

9. Curriculum vitae

Name: Kechaiov

Vorname: Christina

Geburtsdatum: 08.04.1992

Geburtsort: Dinkelsbühl

Familienstand: Ledig

Schule: 1998 – 2002 Grundschule Dinkelsbühl
2002 – 2011 Gymnasium Dinkelsbühl
Mai 2011 Abitur

Praktika: 15.10.2011 – 15.01.2012 Pflegepraktikum im
städtischen Kreiskrankenhaus Dinkelsbühl

Tätigkeiten: 01.06.2014 – 31.04.2017 Schlaflabor Reutlingen
01.04.2016 – 31.12.2016 BG Unfallklinik Tübingen
01.10.2016 – 28.02.2017 Pädiatrie Tutor,
Kinderklinik Tübingen

Studium: Seit April 2012 Studium der Humanmedizin
18.-19. März 2014 Physikum
04.-06. April 2017 Zweites Staatsexamen
15. Mai 2017 - 15. April 2018 Praktisches Jahr,
Diakonie Klinikum Stuttgart