

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

**CyPA Einzelnukleotidpolymorphismen sind mit der  
Prognose von Patienten mit symptomatischer KHK  
assoziiert**

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

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

**vorgelegt von**

**Horstmann, Katja Valeria**

**2020**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. T. Geisler

2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. K. Grundmann-Hauser

Tag der Disputation: 17.09.2020

Teile der Arbeit wurden veröffentlicht:

**Platelet surface expression of cyclophilin A is associated with increased mortality in patients with symptomatic coronary artery disease**

Dominik Rath<sup>1</sup>, Saskia von Ungern-Sternberg<sup>1</sup>, David Heinzmann<sup>1</sup>, Manuel Sigle<sup>1</sup>, Mona Monzien<sup>1</sup>, Katja Horstmann<sup>1</sup>, Elke Schaeffeler<sup>2</sup>, Stefan Winter<sup>2</sup>, Karin Müller<sup>1</sup>, Patrick Grogga-Bada<sup>1</sup>, Monika Zdanyte<sup>1</sup>, Oliver Borst<sup>1</sup>, Alma Zerneck<sup>3</sup>, Meinrad Gawaz<sup>1</sup>, Peter Martus<sup>4</sup>, Matthias Schwab<sup>2,5,6</sup>, Tobias Geisler<sup>1</sup> and Peter Seizer<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universitätsklinik Tübingen, Abteilung Kardiologie, Deutschland

<sup>2</sup> Dr. Margarete-Fischer-Bosch Institut für klinische Pharmakologie, Auerbachstraße 112, Stuttgart, Deutschland, und Universität Tübingen.

<sup>3</sup> Universitätsklinik Würzburg, Institut für experimentelle Biomedizin, Deutschland

<sup>4</sup> Institut für klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie, Universität Tübingen, Deutschland

<sup>5</sup> Abteilung für klinische Pharmakologie, Universitätsklinik Tübingen, Auf der Morgenstelle 8, Tübingen, Deutschland

<sup>6</sup> Abteilung für Pharmazie und Biochemie, Universität Tübingen, Auf der Morgenstelle 8, 72076 Tübingen, Deutschland

Journal of Thrombosis and Haemostasis

13.09.2019

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	6
Abbildungsverzeichnis.....	9
Tabellenverzeichnis.....	10
1. Einleitung.....	11
1.1 Koronare Herzerkrankung.....	11
1.2 Anatomie der Koronararterien.....	13
1.3 Aufbau von Enzymen.....	15
1.4 Cyclophilin A.....	17
1.5 Cyclophilin A in der Kardiologie.....	18
1.6 Die Förderung der Atherosklerose durch CyPA.....	20
1.7 Cyclophilin- und Cyclosporin-Interaktion.....	21
1.8 Genetische Grundlagen.....	22
1.9 Einzelnukleotidpolymorphismen.....	23
1.10 Funktionelle Klassifikation der SNPs.....	24
1.11 Zusammenhang zwischen CyPA und SNPs.....	26
2. Ziele.....	29
3. Materialien und Methoden.....	30
3.1 Studienpopulation.....	30
3.2 Vollblut-Durchflusszytometrie (FACS).....	31
3.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	32
3.4 Genotypisierung von CyPA PPIA rs6850.....	32
3.5 Datenerhebung.....	32
3.6 Statistische Methoden.....	33
4. Ergebnisse.....	35
4.1 Basischarakteristika.....	35
4.2 Anzahl der Ereignisse und IR/PJ.....	37
4.3 Cox-Regressionsanalyse.....	38
4.4 Kaplan-Meier-Kurven.....	40
4.5 Kaplan-Meier-Kurven im rezessiven genetischen Modell.....	45
4.6 Einfache Boxplots der FACS- und ELISA-Analyse.....	50
4.7 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	52
5. Diskussion.....	54

6. Zusammenfassung der Arbeit .....	60
7. Literaturverzeichnis .....	61
8. Erklärung zum Eigenanteil .....	67

## Abkürzungsverzeichnis

$\Delta P$	Druckdifferenz zwischen Anfangs- und Endpunkt
°C	Grad Celsius
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ACE	angiotensin-converting-enzyme
ACS	acute coronary syndrome
AS	Aminosäuren
AT1	Angiotensin 1
AUG	Adenosin-Uracil-Guanin
BARC	Bleeding Academic Research Consortium
Bzw.	beziehungsweise
Ca.	circa
C-Atom	Kohlenstoff-Atom
CD	cluster of differentiation
CE	combined endpoint
Cs A/D	Cyclosporin A/D
cSNP	nonsynonymous coding SNP
CyPA	Cyclophilin A
Cyps	Cyclophiline
DNA	deoxyribonucleic acid
dpSNP	SNP data base
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EZ	Endothelzellen
FACS	fluorescence-activated cell scanning
ggf.	gegebenenfalls
HapMap	Haplotypen-Karte
HCV	Hepatitis C-Virus
Ig	Immunglobulin
IR	Inzidenzrate

IS	ischemic stroke/ischämischer Schlaganfall
kB	kilo-Basenpaar
kD	kilo-Dalton
KHK	koronare Herzerkrankung
KI	Konfidenzintervall
kTn	kardiales Troponin
KVRF	kardiovaskuläre Risikofaktoren
l	Gefäßlänge
LDL	low-density lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharide
LVEF%	Ejektionsfraktion linker Ventrikel in Prozent
MACE	major adverse cardiovascular endpoints
MALDI-TOF-MS	matrixunterstützte Laserdesorptions-/Ionisations-Flugzeit- Massenspektromie
MFI	mean fluorescence intensity
MI	Myokardinfarkt
MMP	Matrix-Metall-Proteinase
mRNA	messenger RNA
n	number/Anzahl
$\eta$	Viskosität
NIM811	N-methyl-4-isoleucin-cyclosporin 811
p	Signifikanz
PCI	percutaneous coronary intervention
pH	pondus Hydrogenii
PJ	Personenjahre
PPIA	Peptidyl-prolyl Isomerase A
PPIase	Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase
Q	Stromstärke
r	Gefäßradius
R	Strömungswiderstand
RNA	Ribonucleic acid
rSNP	regulatory SNP
SD	Standardabweichung

SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus
srSNP	struktureller RNA SNP
Th 1	Typ 1 T-Helferzellen
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
tRNA	transfer-RNA
u.a.	unter anderem
UTR	untranslated region
V.	Vena
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1
VGM	vaskuläre glatte Muskelzellen
vs.	versus
ZNS	zentrales Nervensystem



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Atherosklerose einer Koronararterie mit Ruptur .....	14
Abbildung 2: Die Beeinflussung der Atherosklerose durch CyPA .....	20
Abbildung 3: Varianten funktioneller Polymorphismen .....	25
Abbildung 4: Kaplan-Meier-Kurve, kombinierter Endpunkt.....	40
Abbildung 5: Kaplan-Meier-Kurve, Tod.....	41
Abbildung 6: Kaplan-Meier-Kurve, Myokardinfarkt.....	42
Abbildung 7: Kaplan-Meier-Kurve, Schlaganfall.....	43
Abbildung 8: Kaplan-Meier-Kurve, Blutung .....	44
Abbildung 9: Kaplan-Meier-Kurve rezessives genetisches Modell, kombinierter Endpunkt.....	45
Abbildung 10: Kaplan-Meier-Kurve rezessives genetisches Modell, Tod .....	46
Abbildung 11: Kaplan-Meier-Kurve rezessives genetisches Modell, Myokardinfarkt .	47
Abbildung 12: Kaplan-Meier-Kurve rezessives genetisches Modell, Schlaganfall .....	48
Abbildung 13: Kaplan-Meier-Kurve rezessives genetisches Modell, Blutung .....	49
Abbildung 14: Einfacher Boxplot für CyPA MFI .....	50
Abbildung 15: Einfacher Boxplot für CyPA ELISA.....	51

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Codierende SNPs im PPIA-Gen.....	27
Tabelle 2: Basischarakteristika der Kohortenstudie .....	35
Tabelle 3: Basischarakteristika der Kohortenstudie unterteilt in das rezessive genetische Modell .....	36
Tabelle 4: Anzahl der Ereignisse und Inzidenzrate (IR) pro 100 Personenjahre (PJ)	37
Tabelle 5: Anzahl der Ereignisse und Inzidenzrate (IR) pro 100 Personenjahre (PJ) im rezessiven genetischen Modell .....	38
Tabelle 6: Cox-Regressionsanalyse mit CE und MI als abhängige Variable und klinische Faktoren als Kovariable in der gesamten Patientenkohorte (rezessives genetisches Modell) .....	39

# 1. Einleitung

## 1.1 Koronare Herzerkrankung

Das Herz bestehend aus Perikard, Myokard und Endokard verfügt über eine eigene Blutversorgung über die sogenannten Koronararterien. Über die zwei Hauptäste der Arteria coronaria sinistra und dextra wird es mit dem nötigen Sauerstoff aus der Aorta versorgt und von den Venen V. cardiaca magna, parva, media und der Vena obliqua arterii sinistri in den Sinus coronarius drainiert. Sollte eine der Arterien verengt oder verschlossen sein, resultiert daraus eine schlechtere Sauerstoffversorgung des Herzens und es wird von einer koronaren Herzerkrankung (KHK) gesprochen. In Deutschland bekamen 6,6% der Frauen und 9,6% der Männer bereits ein Herzleiden diagnostiziert. (*Robert Koch Institut, 2015*)

Nachdem die Medizin fast eineinhalb Jahrtausende die Säftelehre Galens befolgte, fing die eigentliche Entdeckung, Wahrnehmung und auch Zuordnung der koronaren Herzerkrankung im Zeitalter der Aufklärung an. Bis zu diesem Zeitpunkt wurden pektanginöse Beschwerden der Lunge oder dem Darm zugeschrieben. (*F. Unger, 2013b*) Die als häufiges Symptom auftretende Angina pectoris wurde erstmals 1768 von dem Londoner Arzt W. Herberden detailliert beschrieben und mit allen Symptomen zu einem Krankheitsbild vereint. (*F. Unger, 2013b*) Ebenso wie es später John Warren in seinem Artikel „Remarks on Angina Pectoris“, erschienen 1812, im New England Journal of Medicine and Surgery beschrieb. (*J. Warren*) Seine Ausführung zur Angina Pectoris ist heute noch gleichermaßen zutreffend, auch wenn damals die Pathogenese noch unbekannt und die Behandlung aus Bettruhe und/oder Aderlass bestand. (*E. G. Nabel, E.A. Braunwald*) Caleb H. Parry vermutete 1799, dass die kardiale Synkope mit der koronararteriellen Ossifikation (bzw. Kalzifikation) zusammenhängt. Diese tritt vorwiegend bei etwa 50-jährigen Männern und weniger bei Frauen und Kindern auf. (*Ch. Parry, 1799*)

Nach mehr als 200 Jahren trifft dies immer noch zu, wie der Statistik zur Gesundheit in Deutschland des statistischen Bundesamtes entnommen werden kann. (*Robert Koch Institut, 2015*)

Dennoch dauerte es bis Ende des 19. Jahrhunderts bis dieser Verschluss der Arterien anhand von Tierexperimenten mit der darauffolgenden Myokardischämie in Zusammenhang gebracht wurde. (*JA McWilliam, 1889; WT Porter, 1893*)

Auch als James B. Herrick 1919 das Elektrokardiogramm zur Diagnostik der arteriellen Verschlusskrankheit verwendete (*JB Herrick, 1919*), wurde als Standard-Therapie noch bis in die Mitte des 20. Jahrhunderts die Bettruhe verordnet. (*E. G. Nabel, E.A. Braunwald*)

Eine etablierte Standard-Therapie gab es nicht, was sich in der Anzahl der verwendeten Medikamente widerspiegelte. Bis dahin beruhte auch die Pharmakotherapie lediglich auf empirischen Erkenntnissen, deren nicht wissenschaftlich belegten Wirkungen dennoch über Generationen weitergegeben wurden. (*F. Unger, 2013b*)

Mitte des 19. Jahrhunderts bis Mitte des 20. Jahrhunderts entwickelte sich die Therapie mit Amylnitrit und Nitroglycerin, wobei die beiden Stoffe nicht zur KHK-Therapie, sondern auch zur Behandlung von Zahnschmerzen und Neuralgien genutzt wurde. Dennoch war der genaue Wirkmechanismus der beiden Stoffe noch unklar. F. Franck hatte 1903 die Theorie aufgestellt, dass Amylnitrit durch Koronardilatation für eine verbesserte Myokardperfusion und dadurch verminderte Schmerzen sorgt, wurde allerdings 70 Jahre später von Ganz und Markus mit einer anderen Theorie abgelöst. Sie behaupteten „*mittels Herzkathetertechnik, daß nicht die vermehrte Durchblutung der Koronarien, sondern die Reduktion des O<sub>2</sub>-Bedarfs durch „venöses Pooling“ den Wirkmechanismus der Nitrate darstellte.*“ (*Editorial 1979; Parnham 1984*)“ (*F. Unger, 2013a*) Im Jahr 1979 bewies Paratt, dass der Blutstrom durch das Nitrit vom normalen Endokard in Richtung des ischämischen umverteilt wird. (*F. Unger, 2013b*)

In den vergangenen drei Dekaden gewann die Prophylaxe immer mehr an Bedeutung. Zudem wurde durch eine immense Diversifikation versucht, die

Therapie der KHK zu vereinheitlichen (F. Unger, 2013b), weshalb heute im klinischen Alltag nach Leitlinie vorgegangen werden kann.

Die moderne Therapie des akuten Myokardinfarkts besteht zum einen aus Glycerintrinitrat (Nitroglycerin), das als Tabletten, Kapseln oder Spray sublingual einzunehmen ist. Die Wirkung sollte nach 1-2 Minuten eintreten. (K.-H. Huhnstock, W. Kutschka, H. Dehmel, 2013)

Zum anderen aus Amylnitrit, das inhaliert werden soll und mit ca. 10 Sekunden eine noch schneller eintretende Wirkung aufweist. (K.-H. Huhnstock, W. Kutschka, H. Dehmel, 2013)

Beide Stoffe haben durch ihre vasodilatierende Wirkung Kopfschmerzen und Schwindel als Nebenwirkung. Während des Anfalls ist auf körperliche Ruhe möglichst im Sitzen oder Liegen zu achten, wobei dies meist die natürliche Reaktion des Patienten auf einen Anfall ist. (K.-H. Huhnstock, W. Kutschka, H. Dehmel, 2013)

## 1.2 Anatomie der Koronararterien

Alle Arterien des Körpers bestehen aus einer Intima, Media und Adventitia. Je nach Lokalisation und Größe unterscheiden sich diese drei Schichten beim muskulären Typ, dem elastischen Typ und den Arteriolen.

Der bindegewebige Anteil der Intima ist an den Herzkranzgefäßen sehr ausgeprägt und grenzt mit der Membrana elastica interna die Intima zur Media ab. Im ungedehnten Zustand ermöglicht sie durch die lückig liegenden elastischen Fasern die Versorgung der Media.

Die Media bildet die dickste Schicht und besteht hauptsächlich aus glatten Muskelzellen und einer geringen Anzahl von elastischen und kollagenen Fasern. Durch die Membrana elastica externa trennt sie sich von der Adventitia ab. Diese ist beim muskulären und elastischen Typ gleich aufgebaut und enthält Nerven, sowie Vasa vasorum, um die äußeren Wandschichten zu versorgen. (W. Linß, 1999)

Kommt es nun zur Ablagerung von Fetten, Kohlenhydraten oder Blutbestandteilen, wird von atherosklerotischen Plaques bzw. Arteriosklerose gesprochen (Abb. 1). Folglich kann es zum Zerfall der Elastica kommen und

somit zur Lumenverengung, Durchblutungsstörungen und arterieller Hypertonie.  
 „Prädilektionsstellen der Arteriosklerose sind u.a.: Koronararterien (→  
 Koronarsklerose), Hirn- (→ Zerebralsklerose), Abdominal- (→ Angina  
 abdominalis), Nierenarterien (→ Nephrosklerose → renovaskuläre Hypertonie).“  
 (W. Linß, 1999)

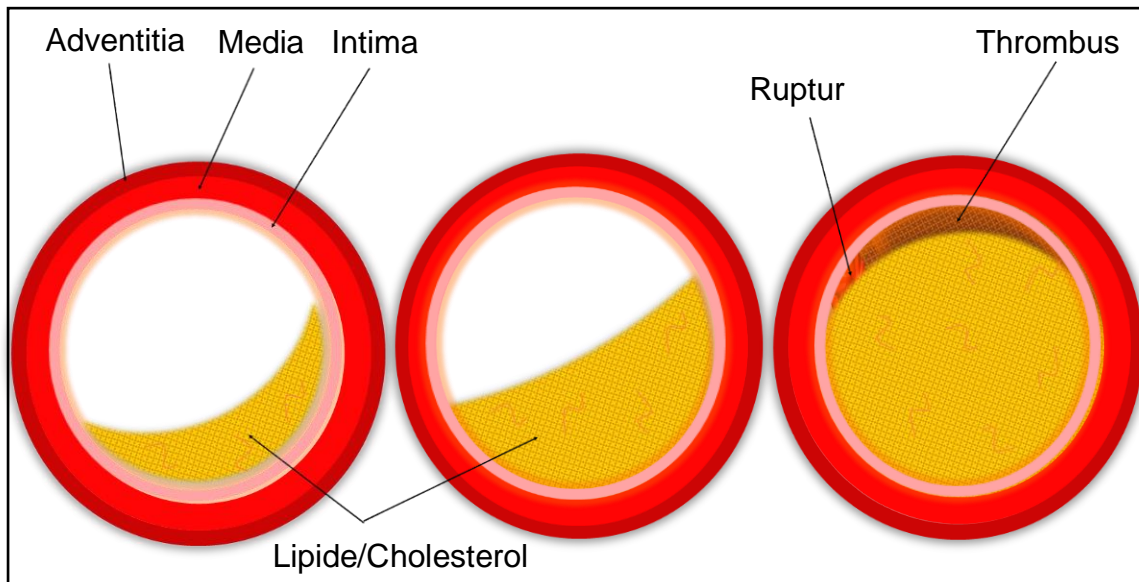


Abbildung 1: Atherosklerose einer Koronararterie mit Ruptur (Eigene Darstellung)

Wird das Hagen-Poiseuille-Gesetz für laminare Strömungen in einem Rohr zur Darstellung des Widerstands in einem Blutgefäß verwendet, so muss zunächst darauf hingewiesen werden, dass diese Gleichung nur vereinfacht den Zustand in einem Gefäß beschreibt. Denn Blut, bestehend aus Wasser, Elektrolyten und korpuskulären Bestandteilen, ist keine homogene Flüssigkeit. Außerdem ist die Gefäßwand, wie oben beschrieben, kein starres Rohr, sondern elastisch. Dennoch kann das Hagen-Poiseuille-Gesetz gut die Verhältnisse der einzelnen Faktoren des Strömungswiderstandes beschreiben: (Silbernagl/ Despopoulos/ Draguhn, 2018)

$$Q = \frac{\pi \cdot r^4}{8\eta \cdot l} \cdot \Delta P$$

Q : Stromstärke

r: Gefäßradius

$\eta$ : Viskosität

$\Delta P$ : Druckdifferenz zwischen Anfangs- und Endpunkt

$l$ : Gefäßlänge (*Silbernagl/Despopoulos/Draguhn, 2018*)

Das bedeutet, dass sich die Stromstärke bei der Halbierung des Radius auf 1/16 verringert. Zusammenhängend mit der obigen Gleichung ist das Ohm'sche Gesetz:

$$Q = \frac{\Delta P}{R}$$

Q: Stromstärke

R: Strömungswiderstand

$\Delta P$ : Druckdifferenz zwischen Anfangs- und Endpunkt

(*Silbernagl/Despopoulos/Draguhn, 2018*)

Also ist  $R = \frac{8\eta \cdot l}{\pi \cdot r^4}$  und der Widerstand würde sich versechzehnfachen bei der Halbierung des Radius.

Anhand Abbildung 1 und der obigen Berechnung wird klar, dass die Atherosklerose zu einer Stenose der Koronararterien führt und schon früh für erhebliche Durchblutungsstörungen, Myokardischämien und Blutdruckerhöhungen sorgt. Eine Arterienstenose ist somit früh zu vermeiden bzw. zu erkennen und adäquat zu behandeln.

### 1.3 Aufbau von Enzymen

Im menschlichen Körper laufen manche Reaktionen, obwohl sie teilweise exergon sind, nicht automatisch ab. Das liegt meist daran, dass diese Reaktionen eine sehr hohe Aktivierungsenergie benötigen. Damit die gewünschte Reaktion dennoch stattfindet, wird ein Katalysator genutzt, der mit dem Ausgangsstoff einen Komplex bildet, der eine geringere Aktivierungsenergie benötigt. Da der Katalysator bei der Reaktion selbst nicht verbraucht wird, kann er danach weitere Reaktionen katalysieren. (*Dr. med. Madjid Salimi, Dr. med. Nawid Salimi, Benedikt Hochkirchen, 2019*)

In Zellen übernehmen diese Reaktionen Biokatalysatoren bzw. Enzyme. Es sind Proteine, die in ihrem aktiven Zentrum Substrat umsetzen können und in allen Kompartimenten der Zelle vorkommen. Es gibt eine Vielzahl an Enzymen, da jedes von ihnen andere Substrate umsetzen und andere Reaktionen katalysieren

kann. (Dr. med. Madjid Salimi, Dr. med. Nawid Salimi, Benedikt Hochkirchen, 2019) Sie können irreversibel oder reversibel, kompetitiv, nicht kompetitiv und funktionell gehemmt werden. Kompetitiv bedeutet, dass ein anderes Substrat das aktive Zentrum des Enzyms blockiert und somit der eigentliche Stoff nicht mehr umgesetzt werden kann. Bei der nicht kompetitiven Hemmung bindet der Hemmstoff am Enzym und verändert somit seine Bindungsstelle. Substrat kann nicht mehr so schnell bzw. so gut oder gar nicht mehr umgesetzt werden. Bei der funktionellen Hemmung hat der Antagonist die entgegengesetzte Wirkung des umgesetzten Substrats, ohne am gleichen Enzym zu binden.

Außer des aktiven Zentrums besitzen einige Enzyme zusätzlich ein regulatorisches Zentrum. Dieses bietet eine Bindungsstelle, die zur Regulation des Enzyms genutzt werden kann.

Die sogenannte Allosterie kann die Aktivität des Enzyms verändern. Dabei bindet ein Effektor am regulatorischen Zentrum des Enzyms und kann somit die Enzymaktivität hemmen oder beschleunigen. Grund hierfür ist die Veränderung des aktiven Zentrums, womit das spezifische Substrat besser oder schlechter binden und umgesetzt werden kann. Diese Regulation ist reversibel, da der Effektor sich ebenso wieder vom Enzym lösen kann. Sie dienen dementsprechend als sogenannte Schalter in verzweigten Biosyntheseketten. (Dr. med. Madjid Salimi, Dr. med. Nawid Salimi, Benedikt Hochkirchen, 2019)

Zur Allosterie gehört auch die negative Rückkopplung. Dabei geschieht die Substrathemmung über das Produkt eines Enzyms, das in der nachfolgenden Stoffwechselkette vorkommt. Ist genug dieses Produktes vorhanden, wird die weitere Produktion automatisch gesenkt. (Dr. med. Madjid Salimi, Dr. med. Nawid Salimi, Benedikt Hochkirchen, 2019)

Es gibt sechs verschiedene Enzymhauptklassen:

1. Oxidoreduktasen: Katalysieren von Redoxreaktionen
2. Transferasen: Übertragung funktioneller Gruppen
3. Hydrolasen: „Hydrolytische Spaltung kovalenter Bindungen“ (Dr. med. Madjid Salimi, Dr. med. Nawid Salimi, Benedikt Hochkirchen, 2019)
4. Lyasen: Bildung und Spaltung fast aller kovalenter Bindungen



5. Isomerasen: „Umwandlung von Substraten in ihre Isomere“ (Dr. med. Madjid Salimi, Dr. med. Nawid Salimi, Benedikt Hochkirchen, 2019)
6. Ligasen: „Knüpfung kovalenter Bindungen und Kopplung der Reaktion an die Hydrolyse eines Energieträgermoleküls“ (Dr. med. Madjid Salimi, Dr. med. Nawid Salimi, Benedikt Hochkirchen, 2019)

#### 1.4 Cyclophilin A

Die Cyclophiline (Cyps) im Allgemeinen gehören zu einer Gruppe weit verbreiteter Proteine, die sich im Laufe der Evolution gut erhalten haben und in allen Pro- sowie Eukaryonten vorkommen. (Wang/Heitman, 2005) Sie wurden 1984 als zytosolische Bindungspartner des Cyclosporin A identifiziert, ein Immunsuppressiva, und gehören zur Familie der Immunophiline. (Handschumacher u. a., 1984; Yurchenko/Constant/Bukrinsky, 2006) Die Cyps katalysieren die Isomerisierung der Peptid-Bindung von trans- zu cis-Form an Prolinresten und ermöglichen die Proteinfaltung durch ihre peptidyl-prolyl-Isomerase-Aktivität. Sie gehören folglich zur fünften Enzymklasse. (Lang/Schmid/ Fischer, 1987)

Von den sechzehn strukturell unterschiedlichen Cyclophilinen kommt das Cyclophilin A (CyPA) am Häufigsten vor und ist mit circa 0,1-0,6% bei den zytosolischen Proteinen vertreten. (Dornan/Taylor/Walkinshaw, 2003; Wang/Heitman, 2005) CyPA wurde zunächst in Rinderthymozyten als das erste zytosolische Bindungsprotein des immunsuppressiven Stoffes Cyclosporin A (CsA) identifiziert. (Handschumacher u. a., 1984)

Außer der Proteinfaltung hat CyPA noch eine Transportfunktion, sowie die Fähigkeit der T-Zell-Aktivierung und der zellulären Signaltransduktion. (Nigro/Pompilio/Capogrossi, 31.10.2013) Es ist jedoch nicht nur intrazellulär zu finden, sondern kann auch sezerniert werden. Dies wird bei Makrophagen beispielsweise durch die LPS von gramnegativen Bakterien aktiviert. (Sherry u. a., 1992) Hervorgerufen wird diese Sekretion als Antwort auf eine Entzündungsstimulation unter anderem durch Hypoxie, Infektion oder oxidativen Stress. (Jin u. a., 27.10.2000; Seko u. a., 2004; Sherry u. a., 1992; Suzuki u. a., 31.03.2006)

Somit beeinflusst CyPA die interzelluläre Kommunikation sowohl als auto-, als auch als parakriner Faktor. Hierbei stimuliert das extrazelluläre CyPA die Entzündungsreaktion der Endothelzellen und der vaskulären glatten Muskelzellen (VGM). (*Jin u. a.*, 27.10.2000; *Suzuki u. a.*, 31.03.2006) Außerdem hat es eine hohe chemotaktische Wirkung auf Leukozyten, Monozyten und Lymphozyten. (*Sherry u. a.*, 1992; *Xu u. a.*, 1992) Dabei wird die chemotaktische Funktion des CyPA teilweise über die Aktivierung des häufig vorkommenden Ig ähnlichen CD147 Zellrezeptor vermittelt. (*Yurchenko u. a.*, 2002)

Zu erkennen ist Letzteres durch die erhöhte Konzentration von CyPA bei einer Sepsis, dahingegen ist es nicht erhöht bei schwerkranken Patienten ohne Sepsis. (*Tegeder u. a.*, 1997) Ähnlich verhält es sich bei der rheumatoiden Arthritis. Bei ihr handelt es sich, im Gegensatz zur degenerativen Erkrankung der Arthrose, um eine inflammatorische Erkrankung. Daher ist bei der rheumatoiden Arthritis das CyPA in der Synovialflüssigkeit erhöht. (*Billich u. a.*, 1997) Bei entzündlichen Lungenerkrankungen sorgt der frühe Anstieg des extrazellulären CyPA für eine initiale Rekrutierung der Leukozyten ins entzündliche Gewebe. (*Arora u. a.*, 2005; *Balsley u. a.*, 2010; *Gwinn u. a.*, 2006; *Xu u. a.*, 1992)

Eine immer größer werdende Reihe an Hinweisen lässt somit vermuten, dass CyPA an einigen Schlüsselprozessen der humanen Pathogenese beteiligt ist. Ziel der Medizin und dieser Arbeit ist es, diese Beeinflussung künftig therapeutisch nutzen zu können. (*Nigro/Pompilio/Capogrossi*, 31.10.2013)

### 1.5 Cyclophilin A in der Kardiologie

Das 20 kD große Chaperon-Protein CyPA wird von vaskulären glatten Muskelzellen als Antwort auf reaktive Sauerstoffspezies sezerniert. Es stimuliert so die Proliferation und Migration von Entzündungszellen *in vitro* und *in vivo*. Sowohl extra-, als auch intrazellulär trägt es zur Entzündung und Atherosklerose bei, indem es die Apoptose von Endothelzellen (EZ) und die endothelzellregulierte Stimulation der Leukozytenmigration fördert. CyPA verstärkt die Typ 1 T-Helferzellen (Th1) Reaktion, steigert die Proliferation von Makrophagen und VGM und erhöht die proinflammatorische Signaltransduktion in den VGM. (*Satoh/Nigro/Berk*, 2010) Satoh et al. testeten den Zusammenhang

zwischen CyPA und kardiovaskulären Erkrankungen mit Hilfe dreier Mäusegruppen. Die Erste war die Wildtyp bzw. Referenzgruppe, die Zweite exprimierte kein CyPA (-/-) und die Dritte exprimierte durch genetische Veränderung ungewöhnlich viel (+/+). Dabei spielte CyPA eine zentrale Rolle bei der Proliferation von VGM, Migration von Entzündungszellen und Förderung der Entzündungsreaktion, die bei den (+/+) Mäusen deutlich öfter in kardiovaskulären Ereignissen endeten.

CyPA kann als Biomarker der koronaren Herzerkrankung gesehen werden. (Nigro/Pompilio/Capogrossi, 31.10.2013) Die, durch oxidativen Stress verursachte Herzerkrankung zeigt sich in Hypertrophie, Myokardischämie und KHK. (Griendling/FitzGerald, 21.10.2003) Satoh et al. untersuchten die Funktion des CyPA in Angiotensin II assoziierter Myokardhypertrophie. Dabei zeigte sich in Mäusen ohne CyPA eine weitaus geringere Angiotensin II assoziierte kardiale Hypertrophie. Es wurde bewiesen, dass CyPA dabei die Produktion von radikalen Sauerstoffspezies erhöht, die Proliferation und Migration von Fibroblasten stimuliert und die Hypertrophie der Kardiomyozyten begünstigt. (Nigro/Pompilio/Capogrossi, 31.10.2013; Satoh u. a., 01.05.2011)

Seizer et al. wiederum zeigten in ihrer Studie, dass CD147 mit seinem Ligand CyPA Entzündungsmediatoren nach einer Myokardischämie und Reperfusion sind und somit als mögliches Ziel zur Verhinderung der Krankheit gelten. (Seizer u. a., 01.06.2011) Denn dieses Ligand-Rezeptor-Paar beeinflusst die Chemotaxis der Leukozyten und die Matrix-Metall-Proteinase(MMP)-Aktivität. (Arora u. a., 2005; Seizer u. a., 2010; Yurchenko/Constant/Bukrinsky, 2006) Für eine optimale Heilung benötigt es einen ausgewogenen MMP-regulierten Umsatz extrazellulärer Matrix. (Yarbrough u. a., 2003) Andernfalls führt es zu einem verstärkten Remodellierungsprozess mit Fibrosen und kardialen Rupturen als Folge. (Heymans u. a., 1999; Matsumura u. a., 2005)

Wie zu Beginn erwähnt, ist CyPA ein kritischer Einflussfaktor auf Hypertrophie, Myokardischämie und Reperfusionsstörungen, was es zu einem geeigneten Biomarker dieser Krankheiten macht. (Nigro/Pompilio/Capogrossi, 31.10.2013)

## 1.6 Die Förderung der Atherosklerose durch CyPA

Anhand Abbildung 2 ist zu sehen, wie das CyPA die Entzündungsreaktion der atherosklerotischen Plaque vorantreibt. Es steigert die Expression von Adhäsionsmolekülen, sowie die Apoptoserate der Endothelzellen (EZ) und senkt die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS). Gleichzeitig lockt es Entzündungszellen an und steigert die Expression an Scavenger-Rezeptoren und beeinflusst die LDL-Aufnahme.

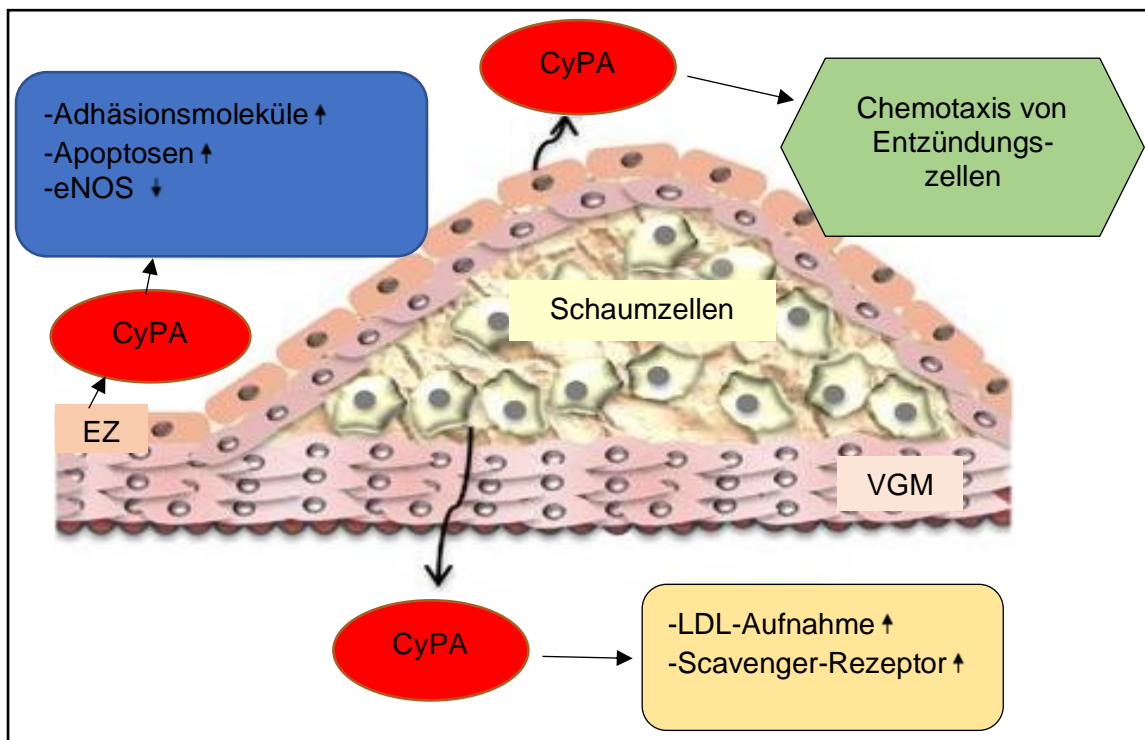


Abbildung 2: Die Beeinflussung der Atherosklerose durch CyPA modifiziert nach „Cyclophilin A: a key player for human disease“; P. Nigro, G. Pompilio, M. C. Capogrossi, *Cell Death & Disease*; volume 4 (2013)

Grundsätzlich können fünf pathologische Mechanismen des CyPA, welche die Atherosklerose begünstigen, herausgearbeitet werden (Nigro u. a., 2011):

1. CyPA stimuliert die Aufnahme von low-density Lipoproteinen (LDL) in die Gefäßwand.
2. Es verstärkt die Entzündung der Endothelzellen, da es das „vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1)“ (Nigro/Pompilio/Capogrossi, 31.10.2013) exprimiert.

3. CyPA vermindert die Endothelstickoxid-Synthase-Expression durch die Unterdrückung der Transkription eines Faktors in der Endothelzelle.
4. Es fördert die Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF $\alpha$ ) -induzierte Endothelzell-Apoptose.
5. Es stimuliert die Rekrutierung von Entzündungszellen aus dem Knochenmark in die Aortenwand. (*Nigro/Pompilio/Capogrossi*, 31.10.2013)

Aus den oben genannten Gründen ist CyPA ein sehr beeinflussender Stoff bezüglich einiger pathologischer Vorgänge des menschlichen Körpers. In der vorliegenden Arbeit wird die Rolle des CyPA bei der koronaren Herzerkrankung näher untersucht.

### 1.7 Cyclophilin- und Cyclosporin-Interaktion

Cyclosporin ist ein lipophiles cyclisches Polypeptid. Es inhibiert kalzium-abhängig, spezifisch und reversibel die Transkription von Interleukin-2 und anderer Zytokine meist in T-Helferzellen. So reduziert es die Produktion einer Reihe von Zytokinen, indem es die Aktivierung und/oder die Reifung verschiedener Zelltypen hemmt. Dazu zählen auch die Zellen der zellvermittelten Immunabwehr. Cyclosporin hat somit immunsuppressive Eigenschaften und wird deshalb auch als Medikation nach Organtransplantation genutzt. (*Diana Faulds, Karen L. Goa, Paul Benfield*, 2012) In größeren Mengen ist Cyclosporin A (CsA) im Pankreas, Fettgewebe und der Leber vertreten. In geringeren Mengen im Gehirn, Muskeln und Blut. Somit wurde das extrazelluläre Vorkommen erläutert. Intrazellulär ist Cyclosporin an Cyclophilin gebunden, welches eine Rolle bei der Gewebeverteilung des CsA zu spielen scheint. (*Akagi/Reynolds/Hjelm*, 1991) CyPA reguliert die Konzentration des immunsuppressiven Cyclosporin A. (*Handschumacher u. a.*, 1984) Der CsA-CyPA-Komplex bindet an und hemmt Calcineurin, eine zelluläre Phosphatase und Schlüssel-Mediator der T-Zell-Aktivierung. (*Liu u. a.*, 1991) Die Cyclosporin A-Bindungsaktivität des CyPA ist Sulfhydryl-abhängig und ab einer Temperatur von 56 °C und einem pH-Wert von  $\leq 4$  oder  $\geq 9,5$  instabil. Sie ist empfindlich auf die Trypsin-, nicht aber auf die Chymotrypsin-Verdauung. (*Handschumacher u. a.*, 1984) Höhere Cyclosporin A-

Konzentrationen bedeuten mehr CsA-CyPA-Komplexe, diese wiederum hemmen Calcineurin und somit die T-Zellreaktion bzw. die Immunreaktion. Es wurden deshalb verschiedene CsA-Derivate für die Forschung und Therapie entwickelt. Beispielsweise bindet das Derivat NIM811 an CyPA ohne eine immunsuppressive Wirkung zu besitzen. Aufgrund solcher Forschungen ist heute bekannt, dass die Cyclosporin A-Wirkung nicht nur auf der Immunsuppression beruht. (*A Billich, F Hammerschmid, P Peichl, R Wenger, G Zenke, V Quesniaux, B Rosenwirth*)

### 1.8 Genetische Grundlagen

Die DNA besteht aus einem Doppelstrang, in dem sich die Desoxyribose und ein Phosphatrest abwechseln. Verbunden sind die beiden Stränge mit spezifischen Basenpaaren (Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin). Adenin bildet mit Thymin eine Verbindung über zwei Kohlenwasserstoffbrücken und Guanin ist mit Cytosin über drei solcher Brücken verbunden. Eine Base in Verbindung mit einem Zucker wird Nukleosid genannt. Wenn das Phosphat-Ion hinzukommt, entsteht ein Nukleotid. Die Phosphationen sind am 3' oder 5'-C-Atom mit der Desoxyribose verbunden. Deshalb kann immer die Richtung des DNA-Stranges unterschieden werden (3'-Ende oder 5'-Ende). (*Oliver Kohlhaas, 2018*) Bei der Replikation wird die DNA vervielfacht, bei der Transkription wird die DNA in RNA umgeschrieben und bei der Translation wird die genetische Information mittels Aminosäuren in Proteine übersetzt.

Die sogenannte messenger RNA (mRNA) wird am DNA-Strang vom Promotor bis zum Terminator transkribiert. Auf der entstandenen mRNA befindet sich nahe des 5'-Endes das Startbasentriplett AUG. Dort beginnt die Translation mittels tRNA und es entsteht eine Kette aus Aminosäuren (Protein). Die Richtung wird von 5' nach 3' nach dem Transkriptionsstartpunkt als „downstream“ und von 3' nach 5' vor dem Transkriptionsstartpunkt als „upstream“ bezeichnet. Zu beachten ist auch, dass unmittelbar nach der Transkription die prä-m-RNA noch Introns und Exons enthält. Da Introns nicht codierende Bereiche sind, werden sie beim Splycing entfernt. Nach diesem „Processing“ ist die reife mRNA entstanden (Abb. 3b). (*Moritz Ritter*)

## 1.9 Einzelnukleotidpolymorphismen

Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) vertreten eine oft auftretende Form der genetischen Variation des menschlichen Genoms. Andere Studien zeigen bereits, dass verschiedene Mutationen das Auftreten der Atherosklerose oder Herzinfarkt beeinflussen. (*Topol u. a., 2006*), (*Rodríguez u. a., 2007*) Insbesondere die SNPs tragen zu vielen komplexen Phänotypen des zentralen Nervensystems bei und beeinflussen die Reaktion auf Medikamente. Außerdem sind SNPs der Chromosomen 3p21 und 10q24, sowie die der spannungsabhängigen Calciumkanaluntereinheiten vom L-Typ (CACNA1C und CACNB2) mit der Anfälligkeit auf neurophysiologische und psychiatrische Erkrankungen assoziiert. (*Twyman, 2009*), (*Jordan W Smoller (lead), Nicholas Craddock, Kenneth Kendler, Phil Hyoun Lee, Benjamin M Neale, John I Nurnberger, Stephan Ripke, Susan Santangelo, Patrick F Sullivan, 2013*)

Präziser umschrieben ist ein SNP eine Variation einer einzelnen Basensequenz zwischen Individuen an einem bestimmten Ort des Genoms. Im Gegensatz zur Punktmutation sind Einzelnukleotidpolymorphismen vererblich. Jeder Mensch besitzt Millionen von SNPs, somit können sie zur Differenzierung der einzelnen Individuen und zum Finden genetischer Krankheiten genutzt werden. (*Butler, 2012*) SNPs können in jedem genetischen Merkmal auftreten, als Phänotyp, in physiologischer Form, auf kodierenden oder nicht kodierenden DNA-Sequenzen. Die Besonderheit dieser Art von genetischer Variation ist, dass es die Abgrenzung von relativ vielen ähnlichen Variationen einer Population suggeriert und die Präsenz von evolutionären Mechanismen zu deren Erhalt impliziert. (*Brenner/Miller, 2001*)

Einzelnukleotidpolymorphismen treten fast immer als Biallel auf, weshalb die Unterscheidungsmöglichkeiten auf einzelne Orte begrenzt sind. (*Budowle/Schutzer/Breeze, 2011*) Es existieren aber auch Tri- und Quadriallele. Ihr biologischer Effekt kann neutral, aber auch funktionell sein. Sie sind mittels automatisierter Technologie leicht zu genotypisieren. (*Ramírez-Bello/Jiménez-Morales, 2017*)

## 1.10 Funktionelle Klassifikation der SNPs

Es gibt drei verschiedene Arten von Einzelnukleotidpolymorphismen (Abb. 3a). Die SNPs, die eine funktionelle Bedeutung bezüglich der Genexpression bzw. Transkription haben, werden regulatory SNPs (rSNPs) genannt. Dagegen werden SNPs, die beeinflussend auf die Translation, das Splicing und die mRNA-Stabilität wirken, strukturelle RNA SNPs genannt (srSNPs). SNPs, die die Protein-Aktivität beeinflussen, werden als nonsynonymous coding SNPs (cSNPs) bezeichnet. Die Bezeichnung „SNP“ wird für alle Typen benutzt. (*Sadee u. a.*, 2011) (*Ramírez-Bello u. a.*, 2013) Die Transkriptionsraten werden von rSNPs beeinflusst, die sich meist in den 5'-aufwärts Regionen befinden. Sie können aber auch innerhalb transkribierter Regionen oder 3'-abwärts vorkommen. Der srSNP muss sich im transkribierten Teil des Gen-Lokus befinden, wenn er Einfluss auf die RNA-Verarbeitung haben soll. Sie sind folglich in jedem entstehenden RNA-Transkript vorhanden, sowie in reifer mRNA, wenn sie in Exons präsent sind. So beeinflussen sie die RNA-Funktion auf vielfältige Weise. In der Abbildung 3b sind die pre-mRNA und RNA-Regionen zu sehen, in denen srSNPs deren Funktion ändern können.

Dabei ist zu berücksichtigen, dass einige Promotor-/Enhancer-Varianten in transkribierten Regionen vorkommen und deshalb als die Transkription beeinflussenden rSNPs angesehen werden. Die Einteilung wird durch den betreffenden Mechanismus bestimmt. Ein weiteres Beispiel sind die non-synonymous-SNPs, die auf RNA-Ebene wirken und somit als srSNPs fungieren, statt (oder zusätzlich) die Proteinaktivität direkt zu beeinflussen. Daher sollte die biologische Rolle der verschiedenen Arten der Einzelnukleotidpolymorphismen mit Bedacht nur auf Grundlage der Position im Genlocus zugewiesen werden. (*Sadee u. a.*, 2011) Außerdem muss eine Veränderung des Genoms durch die Phänotyp-Heterogenität nicht zwingend zu Symptomen führen. (*García-Castro u. a.*, 2003)



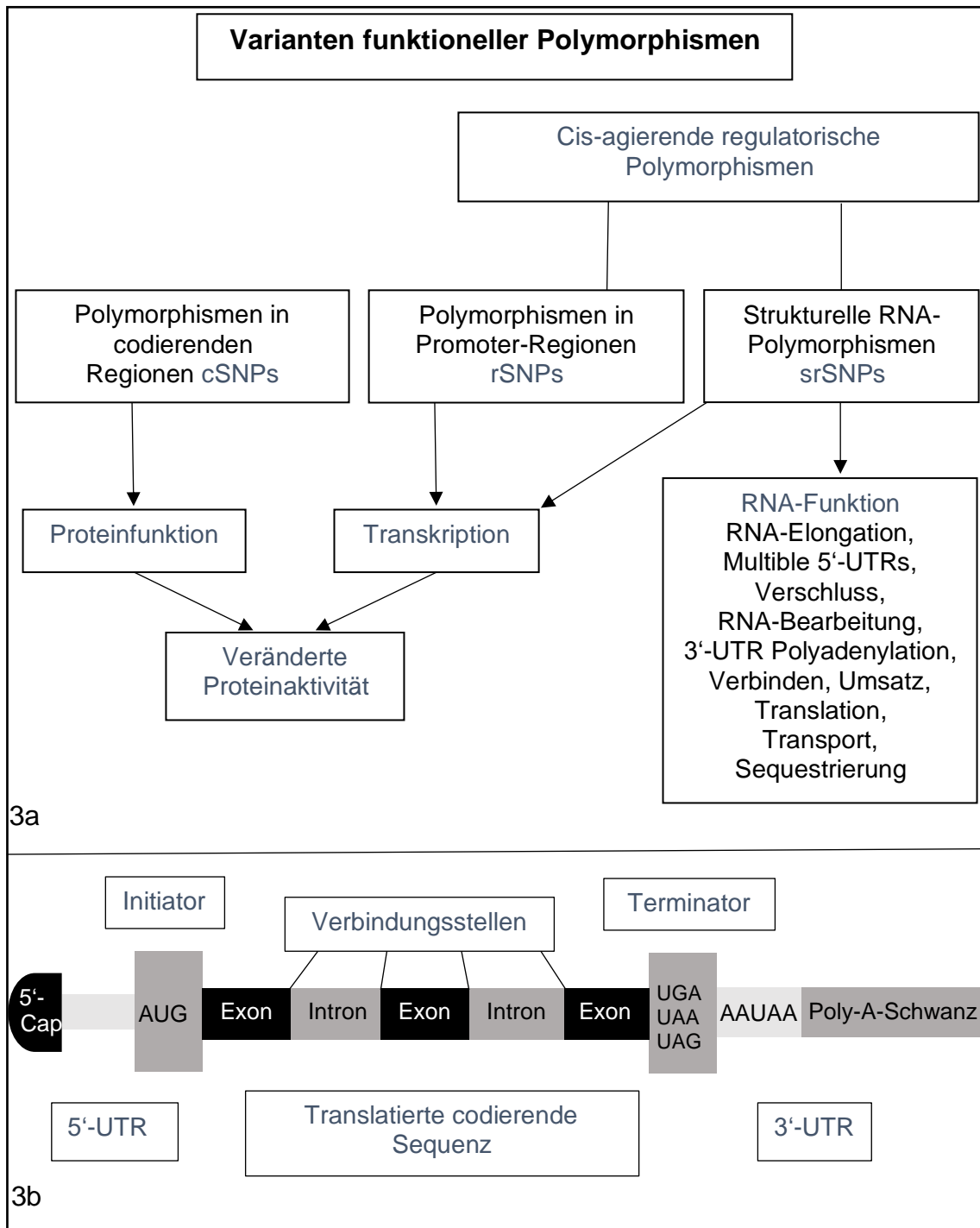


Abbildung 3: Varianten funktioneller Polymorphismen in Anlehnung an „Pharmacogenomics of the RNA World: Structural RNA Polymorphisms in Drug Therapy“; W Sadee, D Wang, AC Papp, JK Pinsonneault, RM Smith, RA Moyer, AD Johnson

### 1.11 Zusammenhang zwischen CyPA und SNPs

In den Kapiteln 1.4 – 1.7 wurde bereits das CyPA beschrieben. Ebenso wurden die SNPs in den vorangegangenen Kapiteln thematisiert und erklärt. Im folgenden Kapitel sollen diese beiden wichtigen Bestandteile der Arbeit miteinander in Verbindung gebracht werden. Denn ihre gegenseitige Abhängigkeit und Beeinflussung sind Grundlagen für die Interpretation der Ergebnisse.

Das PPIA-Gen codiert für ein Mitglied der peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase (PPIase)-Familie. Es handelt sich um die sogenannte peptidyl-prolyl Isomerase A, welche auch als Cyclophilin A bezeichnet wird. (*Murphy M, Brown G, Wallin C, et al., 2006 sep 13 (Updated 2019 Mar 4)*) Das PPIA-Gen, das für CyPA codiert, ist 7kB lang und enthält fünf Exons. (*An u. a., 2007*) Mehrere codierende und nicht-codierende genetische Variationen des PPIA-Gens wurden beschrieben, ohne nähere Zusammenhänge oder konkrete Einflüsse feststellen zu können. (*Hahn/Ciesek, 2015*)

Die dp-SNP-Datenbank enthält sechs codierende non-synonymous SNPs in den Exons 4 und 5 des menschlichen PPIA-Gens, die durch 1000 Genome der HapMap (Haplotypen-Karte) validiert wurden (siehe Tabelle 1). Jedes dieser SNPs führt zum Austausch einer einzelnen Aminosäure im CyPA-Protein und wurde in verschiedenen Populationen (Europa und weltweit) nachgewiesen. Diese Veränderungen treten allerdings sehr selten in der menschlichen Population auf. Der Austausch der Aminosäure G96D wurde in keiner der 4 HapMap-Kohorten (HapMap-CEU, HapMap-HCB, HapMap-JPT, HapMap-YRI) nachgewiesen. (*Hahn/Ciesek, 2015*) Es wurden von Hahn et al. weitere 300 HCV-negative Individuen für diese Variationen genotypisiert: Lediglich der Einzelnukleotidpolymorphismus, der den Austausch der Aminosäure E84D bewirkt, wurde bei Personen mit arabischen Wurzeln mit einer Allelfrequenz von 1% nachgewiesen. Während andere Varianten nicht belegt werden konnten bzw. wahrscheinlich eine Allelfrequenz deutlich unter 1% aufwiesen. (*Hahn u. a., 2012*)

*Tabelle 1: Codierende SNPs im PPIA-Gen in Anlehnung an „Cyclophilin polymorphism and virus infection. Current Opinion in Virology“, Hahn T, Ciesek S; 2015*

SNP-Variante	AS-Austausch	Effekt auf HCV	Effekt auf HCoV-229E
rs61747111	D66E	Hemmung	Hemmung
rs1059983	E84D	-	-
rs17850033	I89T	-	-
rs11547706	G96D	Hemmung	Hemmung
rs17850166	N106E	Hemmung	Hemmung
rs9769523	E134K	-	-

Bei weiteren Studien wurde die Auswirkung der getauschten Aminosäuren auf die Funktion des Cyclophilins untersucht. Dabei fördert das Cyclophilin weiterhin die Hepatitis C-Virus-RNA-Replikation durch den, mit SNPs erzeugten Aminosäureaustausch E84D, I89T und E134K. Dies geschieht hingegen nicht bei D66E, G96D und N106E. Hepatozyten mit den letzteren Polymorphismen sind folglich resistent gegen HCV, da die SNPs vermutlich die CyPA Struktur destabilisieren und durch den Aminosäureaustausch für einen schnelleren Abbau sorgen. (Hahn u. a., 2012; Hahn/Ciesek, 2015) In einer weiteren Studie konnte beim humanen Coronavirus herausgefunden werden, dass CyPA als wesentlicher Wirtsfaktor dient. Bei dessen Unterdrückung mit Cyclosporin D Alisporivir, sowie nicht-immunsuppressiven CsA-Derivaten wird die Replikation des Virus gehemmt. (Carbajo-Lozoya u. a., 2014) Ebenso verhält es sich in der immunsuppressiven Therapie mit Cyclosporin A, da CyPA der intrazelluläre Rezeptor dessen ist und die Polymorphismen somit auch die Pharmakogenetik des CsA beeinflussen können. (Colgan u. a., 2005) Auch hier ist CyPA somit ein guter therapeutischer Angriffspunkt. Insbesondere da das CyPA kein essenzielles Protein für Säugetiere ist und Mäuse ohne die Expression von CyPA keine Verkürzung ihrer Lebensspanne zeigten. (Colgan u. a., 2004) Palacín et al. schreiben in ihrer experimentellen Arbeit, dass sie nicht nachweisen konnten, dass PPIA-Polymorphismen das Risiko eines Myokardinfarkts erhöhen.

So könnten dennoch die Einzelnukleotidpolymorphismen rs8177826 (-11 G/C) und rs6850 (+36 G/A) Erkrankungen beeinflussen, bei denen CyPA eine Rolle spielt. (*Palacín u. a.*, 2008)

Da zu Beginn dieser Arbeit die positive Korrelation zwischen der koronaren Herzerkrankung und CyPA dargelegt wurde, ist es von eminenter Bedeutung in Erfahrung zu bringen, in welchem Maße die SNPs tatsächlich mit der CyPA-Expression bzw. der Prognose einer KHK zusammenhängen. Im folgenden Abschnitt der Arbeit wird anhand einer Patientenkohorte evaluiert, ob dieser Zusammenhang signifikant besteht und ob er in Zukunft medizinisch und therapeutisch genutzt werden sollte.

## 2. Ziele

Aktuell sind Assoziationen zwischen CyPA SNPs und der Prognose bei Patienten mit symptomatischer KHK nur unzureichend untersucht. Des Weiteren gibt es nur eine geringe Menge an Daten, welche Zusammenhänge zwischen dem CyPA SNP und dem thrombozytären, sowie zirkulierenden CyPA beschreiben.

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob

- Der CyPA SNP rs6850 mit thrombozytären und zirkulierenden CyPA-Konzentrationen assoziiert ist.
- Der CyPA SNP rs6850 bei Patienten mit symptomatischer KHK eine Prognoserelevanz besitzt.

## 3. Materialien und Methoden

### 3.1 Studienpopulation

Für die Kohortenstudie wurden während der perkutanen koronaren Intervention (PCI) Blutproben entnommen. Alle Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Studie, nachdem sie darüber mündlich und schriftlich aufgeklärt und informiert wurden. Sie wurden in der Abteilung für Kardiologie der medizinischen Klinik Tübingen aufgenommen.

Für die Genotypisierung wurden 752 Patienten mit symptomatischer KHK eingeschlossen (stabile KHK, n = 368; ACS, n = 384) und in homozygote Träger des häufigeren Allels (AA), homozygote Träger des selteneren Allels (GG) und Heterozygote (AG) unterteilt.

Es konnte das Blut von 333 Patienten mit symptomatischer KHK (stabile KHK, n = 158; ACS, n = 175) mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht und so die Oberflächenexpression des CyPA auf den Thrombozyten ermittelt werden. Zirkulierendes CyPA wurde mittels ELISA für 122 Patienten bestimmt (stabile KHK, n = 74; ACS, n = 48).

Das ACS wurde als Verschlechterung der Angina, akuter Myokardinfarkt (MI) oder plötzlicher Herztod definiert. Ein akuter Myokardinfarkt wurde anhand eines Anstiegs und/oder Abfalls der kardialen Biomarker-Werte (kardiales Troponin (kTn)) mit mindestens einem Wert über der 99. Perzentilenobergrenze und mindestens eines der folgenden Symptome diagnostiziert:

Anzeichen einer Ischämie, neue oder vermutlich neue signifikante ST-Segment-T-Wellen (ST-T) -Änderungen oder ein neuer Linksschenkelblock, Entwicklungen pathologischer Q-Wellen im EKG, Bildgebungsnachweise für einen neuen Verlust des vitalen Myokards, eine neue regionale Wandbewegungsstörung oder Identifizierung eines intrakoronaren Thrombus durch Angiographie.

Der ZNS-Infarkt und der ischämische Schlaganfall wurden als Gehirn-, Rückenmarks- oder Netzhautzelltod definiert, der auf eine Ischämie zurückzuführen war. Die Definition basierte auf pathologischen, bildgebenden

oder anderen objektiven Hinweisen auf eine zerebrale, Rückenmarks- oder fokale ischämische Netzhautverletzung in einer definierten Gefäßverteilung oder klinischen Hinweisen auf eine zerebrale, Rückenmark- oder fokale ischämische Verletzung der Netzhaut. Hinweise gaben Symptome, die  $\geq 24$  Stunden oder bis zum Tod anhielten und bei denen andere Ätiologien ausgeschlossen werden konnten. (Sacco, R. L., Kasner, S. E., Broderick, J. P., Caplan, L. R., Connors, J. J., Culebras, A., ... & Hoh, B. L.) Klinisch relevante Blutungen wurden mit dem BARC-Blutungs-Score definiert. (Mehran u. a., 2011)

Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Universität Tübingen genehmigt (270/2011BO1, 019/2018BO2 und 238/2018BO2) und entspricht der Deklaration von Helsinki und den Vorschriften zur guten klinischen Praxis. (KONG/WEST/AFRICA, S. *Cardiovasc Res*, 1997, 35. Jg., S. 2-3., 1997; ICH harmonized tripartite guideline: Guideline for Good Clinical Practice, 2001; Directive 2001/20/EC of the European Parliament and of the Council of 4 April 2001 on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the member states relating to the implementation of good clinical practice in the conduct of clinical trials on medicinal products for human use, 2002)

### 3.2 Vollblut-Durchflusszytometrie (FACS)

Für die Vollblut-Durchflusszytometrie wurde das Blut von 333 Patienten während der PCI entnommen und im Laufe der darauffolgenden Stunde für die FACS-Analyse markiert. Die „mean fluorescence intensity“ (MFI) wurde zur Quantifizierung der Ergebnisse herangezogen. Das Vollblut wurde 1:50 verdünnt und davon wurden je 50 ml in ein FACS-Röhrchen appliziert. Die Zellen wurden doppelt mit CD42b-PE (BD Biosciences, San Jose, CA) und CD62p-FITC (Beckman Coulter, Brea, CA), CyPA-FITC oder der IgG-Kontrolle 30 Minuten lang gefärbt. Fixiert wurden die Zellen nach der Inkubation mit 0,5% Paraformaldehyd und mit dem BD FACS Calibur Durchflusszytometer (Becton Dickinson, Oxford, UK) wurden sie, wie bereits beschrieben, analysiert. Die Proben wurden nach der Fixierung mit Paraformaldehyd bei 4°C gelagert und mittels Durchflusszytometrie innerhalb von 24 Stunden analysiert. Es wurden

keine Thrombozyten permeabilisiert, daher wurde die Oberflächenexpression von Cyclophilin A gemessen.

### 3.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Für die Analyse mit ELISA wurden 122 Blutproben in Serumröhrchen (Sarstedt) gesammelt und anschließend für 10 Minuten bei 1800g zentrifugiert. Das separierte Serum wurde in frische Röhrchen überführt und bis zur Nutzung bei -80°C gelagert. Die Serum-CyPA-Spiegel wurden mit einem Sandwich-Enzymgebundenen Immunosorbens Assay (Sigma-Aldrich, Cat Nr. RAB1402) gemäß Herstellerprotokoll ermittelt. Die Analyse aller Proben erfolgte in Duplikaten.

### 3.4 Genotypisierung von CyPA PPIA rs6850

Die Genotypisierung für CyPA PPIA rs6850 wurde durch matrixunterstützte Laserdesorptions-/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) unter Verwendung des MassARRAY® Compact-Systems (Sequenom, CA, USA) durchgeführt. Hierbei wurde eine kleine Menge der Probe auf einen Probenträger aus Stahl gegeben und mit der sogenannten Matrix überschichtet. Anschließend wurde der Träger in das MALDI-TOF-MS-Gerät gegeben, wo die Probe mit Hilfe der Matrix durch einen gepulsten Laser ionisiert werden konnte. Innerhalb kurzer Zeit wurden Massenspektren in einem Bereich von 2000 – 20.000 Dalton aufgezeichnet. Aus dem Spektrum konnte unmittelbar danach eine Liste der detektierbaren Massen erzeugt und mit einer Datenbank abgeglichen werden. (Schütz, 10.04.2018)

Dem Studienpersonal, welches das Ergebnis beurteilte, war während des gesamten Genotypisierungsprozesses der Fallstatus der Studienteilnehmer unbekannt. Die Genotypisierung wurde bei 752 Patienten mit symptomatischer KHK durchgeführt (stabile KHK, n = 368; ACS, n = 384).

### 3.5 Datenerhebung

Alle Patienten der Kohorte wurden 1080 Tage nach Einschluss in die Studie auf schwerwiegende unerwünschte kardiovaskuläre Endpunkte (MACE) und Blutungen befragt. Der primäre kombinierte Endpunkt (CE) definierte sich als das



erste Auftreten des Todes durch jegliche Ursache, des Myokardinfarkts (MI), des ischämischen Schlaganfalls (IS) und/oder einer klinisch relevanten Blutung. Die sekundären Endpunkte wurden als das individuelle Auftreten dieser Endpunkte definiert.

Die Datenerhebung wurde per Telefoninterview oder durch das Recherchieren in den klinikinternen Arztbriefen durchgeführt. Beim Interview wurde von den durchführenden Personen auf die Reliabilität, Validität und Objektivität der gestellten Fragen geachtet.

31 (9,2%) der mittels FACS untersuchten Patienten konnten aus unterschiedlichen Gründen (z.B. Umzug, unmögliche Erreichbarkeit, ungültige Telefonnummer) nicht nachverfolgt werden. In der Patientengruppe, deren Blutproben genotypisiert worden waren, traf das auf 73 der Patienten (9,0%) zu.

### 3.6 Statistische Methoden

Alle statistischen Analysen wurden mit der SPSS Version 25.0.0.1 (IBM SPSS Statistics 25, IBM corp) durchgeführt. Normalverteilte Daten wurden mittels Student's-t-test verglichen. MFIs werden als Median und 25./75. Perzentile dargestellt. Kreuztabellen mit dem Chi-Quadrat Test wurden verwendet, um die Zahl und die Verteilung der Endpunkte zwischen den verschiedenen Ausprägungen der Allele zu zeigen. Dabei werden zusätzlich die Inzidenzraten pro 100 Personenjahre angegeben.

Da keine Normalverteilung vorliegt, wurde der nicht parametrische Kruskal-Wallis-H-Test angewandt, um die zirkulierenden CyPA-Spiegel zwischen verschiedenen CyPA-SNPs zu vergleichen. Für zensierte Daten wurden Kaplan-Meier-Kurven, Log-Rang-Tests und Hazard ratios ermittelt. In diesen Analysen wurden die CyPA-Spiegel im Median dichotomisiert. Zusätzlich wurden Log CyPA-Werte ohne Dichotomisierung analysiert. Des Weiteren wurde die Allelfrequenz von CyPA PPIA rs6850 untersucht.

Um unabhängige Korrelationen von CyPA mit den Endpunkten nach Bereinigung um epidemiologische Faktoren, die das kardiovaskuläre Ergebnis beeinflussen, zu analysieren, wurde die multivariate Cox-Regressionsanalyse mit Vorwärtsselektion der Variablen angewendet. Auch nicht adjustierte p-Werte und

p-Werte, die nach dem Bonferroni-Verfahren für Mehrfachtests angepasst wurden, liegen vor.

Boxplots wurden für die thrombozytären und zirkulierenden CyPA-Konzentrationen erstellt. Dabei wurden MFI CyPA und ELISA CyPA als abhängige Variablen gewählt. Ausreißer wurden in den Berechnungen belassen. Als unabhängige Variablen wurden die homozygoten Träger des häufigeren Allels, die homozygoten Träger des selteneren Allels und die Heterozygoten gewählt. Der Median, der Mittelwert, die Standardabweichung und das Maximum, bzw. Minimum wurden für alle drei Patientengruppen bestimmt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Basischarakteristika

Basischarakteristika der Kohortenstudie ohne die Patienten, die nicht nachverfolgt werden konnten, unterteilt in homozygote Träger des häufigeren Allels (AA), homozygote Träger des selteneren Allels (GG) und Heterozygote (AG) sind in Tabelle 2 aufgeführt.

*Tabelle 2: Basischarakteristika der Kohortenstudie*

<b>Charakteristika</b>	<b>Homozygote Träger des häufigeren Allels (n = 562)</b>	<b>Homozygote Träger des selteneren Allels (n = 30)</b>	<b>Heterozygote (n = 158)</b>	<b>p</b>
Alter ( $\pm$ SD)	68,4 ( $\pm$ 11,3)	66,1 ( $\pm$ 11,1)	68,8 ( $\pm$ 12,8)	0,97
Männlichen Geschlechts	398 (70,8%)	25 (83,3%)	110 (69,6%)	0,32
LVEF% ( $\pm$ SD)	51,2 ( $\pm$ 10,6)	49,7 ( $\pm$ 10,9)	51,7 ( $\pm$ 9,9)	0,58
<b>KVRF</b>				
Arterielle Hypertonie	406(72,2%)	23 (76,7%)	131 (82,9%)	0,61
Hyperlipidämie	323 (57,5%)	19 (63,3%)	96 (60,8%)	0,71
Diabetes Typ II	182 (32,4%)	12 (40,0%)	54 (34,2%)	0,68
Raucher	230 (40,9%)	18 (60,0%)	59 (37,3%)	0,10
<b>Medikation bei Aufnahme</b>				
ASS	307 (54,6%)	19 (63,3%)	93 (58,9%)	0,54
Clopidogrel	70 (12,5%)	1 (3,3%)	21 (7,5%)	0,30
Prasugrel	10 (1,8%)	2 (6,7%)	3 (1,9%)	0,18
Ticagrelor	24 (4,3%)	0 (0,0%)	13 (8,3%)	0,06
ACE-Hemmer	235 (41,8%)	13 (43,3%)	69 (43,7)	0,94

AT1-Antagonisten	107 (19%)	4 (13,3%)	24 (15,2%)	0,40
Ca <sup>2+</sup> -Kanal-Blocker	118 (21%)	5 (16,7%)	25 (15,8%)	0,30
Beta-Blocker	324 (58%)	15 (50,0%)	85 (54%)	0,46
Statine	267 (47,5%)	15 (50,0%)	75 (47,5%)	0,97
<b>Aufnahmegrund</b>				
ACS	294 (52,3%)	15 (50,0%)	74 (46,8%)	0,47
Stabile KHK	268 (47,7%)	15 (50,0%)	84 (53,2%)	0,47

Basischarakteristika der Kohortenstudie ohne die nicht nachverfolgbaren Patienten, unterteilt in das rezessive genetische Modell, sind in Tabelle 3 aufgeführt. Dabei sind Träger des häufigeren Allels (AA, AG) den homozygoten Trägern des selteneren Allels (GG) gegenübergestellt.

*Tabelle 3: Basischarakteristika der Kohortenstudie unterteilt in das rezessive genetische Modell*

<b>Charakteristika</b>	<b>Träger des häufigeren Allels (n = 720)</b>	<b>Homozygote Träger des selteneren Allels (n = 30)</b>	<b>p</b>
Alter (±SD)	68,2 (±11,7)	66,1 (±11,1)	0,34
Männlichen Geschlechts	507 (70,2%)	25 (83,3%)	0,13
LVEF% (±SD)	51,3 (±10,5)	49,7 (±10,9)	0,44
<b>KVRF</b>			
Arterielle Hypertonie	598 (82,8%)	23 (76,7%)	0,20
Hyperlipidämie	420 (58,2%)	19 (63,3%)	0,72
Diabetes Typ II	237 (32,8%)	12 (40,0%)	0,47
Raucher	290 (40,2%)	18 (60,0%)	<b>0,04</b>

<b>Medikation bei Aufnahme</b>			
ASS	401 (55,5%)	19 (63,3%)	0,43
Clopidogrel	91 (12,6%)	1 (3,3%)	0,13
Prasugrel	13 (1,8%)	2 (6,7%)	0,06
Ticagrelor	37 (5,1%)	0 (0,0%)	0,20
ACE-Hemmer	305 (42,2%)	13 (43,3%)	0,93
AT1-Antagonisten	131 (18,1%)	4 (13,3%)	0,49
Ca <sup>2+</sup> -Kanal-Blocker	143 (19,8%)	5 (16,7%)	0,66
Beta-Blocker	411 (56,9%)	15 (50,0%)	0,43
Statine	343 (47,5%)	15 (50,0%)	0,82
<b>Aufnahmegrund</b>			
ACS	369 (51,1%)	15 (50,0%)	0,91
Stabile KHK	353 (48,9%)	15 (50,0%)	0,91

Die Allelfrequenz von n = 752 Patienten mit symptomatischer KHK bestand aus 564 (75,0%) homozygoten Trägern des häufigeren Allels (AA), 30 (4,0%) homozygoten Trägern des selteneren Allels (GG) und 158 (21,0%) Heterozygoten (AG).

#### 4.2 Anzahl der Ereignisse und IR/PJ

Die Anzahl der Ereignisse und die Inzidenzrate (IR) pro 100 Personenjahre (PJ) sind in Tabelle 4 präsentiert.

*Tabelle 4: Anzahl der Ereignisse und Inzidenzrate (IR) pro 100 Personenjahre (PJ)*

<b>Ereignis (n = Gesamtanzahl)</b>	<b>Anzahl der Ereignisse *</b>	<b>IR/100 PJ *</b>	<b>p</b>
<b>CE (n = 165)</b>	116/11/38	7,63/13,1/8,86	0,086
<b>Tod (n = 84)</b>	60/2/22	3,94/2,47/5,13	0,379
<b>MI (n = 87)</b>	60/9/18	3,94/11,11/4,2	<b>0,026</b>

<b>IS (n = 21)</b>	18/1/2	1,18/1,23/0,47	0,486
<b>Blutung (n = 61)</b>	44/2/15	2,89/2,47/3,5	0,766

\* Homozygote Träger des häufigeren Allels vs. homozygote Träger des selteneren Allels vs. Heterozygote

Die Anzahl der Ereignisse und die Inzidenzrate (IR) pro 100 Personenjahre im rezessiven genetischen Modell sind in Tabelle 5 präsentiert.

*Tabelle 5: Anzahl der Ereignisse und Inzidenzrate (IR) pro 100 Personenjahre (PJ) im rezessiven genetischen Modell*

<b>Ereignis (n = Gesamtanzahl)</b>	<b>Anzahl der Ereignisse *</b>	<b>IR/100 PJ *</b>	<b>p</b>
<b>CE (n = 165)</b>	154/11	7,9/13,1	<b>0,043</b>
<b>Tod (n = 84)</b>	82/2	4,2/2,47	0,421
<b>MI (n = 87)</b>	78/9	4/11,11	<b>0,007</b>
<b>IS (n = 21)</b>	20/1	1,03/1,23	0,631
<b>Blutung (n = 61)</b>	59/2	3,03/2,47	0,767

\* Träger des häufigeren Allels vs. homozygote Träger des selteneren Allels

#### 4.3 Cox-Regressionsanalyse

In der Cox-Regressionsanalyse (Tabelle 6) ist CyPA PPIA rs6850 (rezessives genetisches Modell) signifikant und unabhängig assoziiert mit dem primären kombinierten Endpunkt (CE) und dem sekundären Endpunkt Myokardinfarkt (MI). Dahingegen ist der Polymorphismus rs6850 nicht unabhängig assoziiert mit den Endpunkten Tod, IS oder Blutung (Tabelle 6). Genauso ist das Alter, die LVEF%, die ASS-Einnahme und der Aufnahmegrund unabhängig mit den Endpunkten CE und MI assoziiert.

Tabelle 6: Cox-Regressionsanalyse mit CE und MI als abhängige Variable und klinische Faktoren als Kovariable in der gesamten Patientenkohorte (rezessives genetisches Modell)

Variablen	Hazard ratio (CE) (95% KI)	p (CE)	Hazard ratio (MI) (95% KI)	p (MI)
Alter	1,07 (1,05-1,09)	<b>&lt;0,001</b>	1,05 (1,03-1,08)	<b>&lt;0,001</b>
LVEF%	0,97 (0,95-0,98)	<b>&lt;0,001</b>	-	-
ASS	1,71 (1,19-2,44)	<b>0,003 (0,015*)</b>	2,18 (1,32-3,62)	<b>0,002 (0,010*)</b>
AT-1-Antagonist	-	-	0,53	<b>0,054 (0,270*)</b>
Stabile KHK vs. ACS	1,65 (1,17-2,32)	<b>0,007 (0,035*)</b>	1,74 (1,11-2,73)	<b>0,016 (0,080*)</b>
CyPA PPIA rs6850 (rezessives Modell)	2,48 (1,34-4,63)	<b>0,004 (0,020*)</b>	3,15 (1,51-6,58)	<b>0,002 (0,010*)</b>

\*Bonferroni-korrigierter p-Wert

Die in die Cox-Regressionsanalyse eingebundenen Faktoren sind das Alter, das Geschlecht, die LVEF%, arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie, Diabetes mellitus Typ II, Rauchen, die ASS-, Clopidogrel-, ACE-Hemmer-, AT-1-Antagonisten-, beta-Blocker-, Statin-Einnahme und der Aufnahmegrund.

#### 4.4 Kaplan-Meier-Kurven

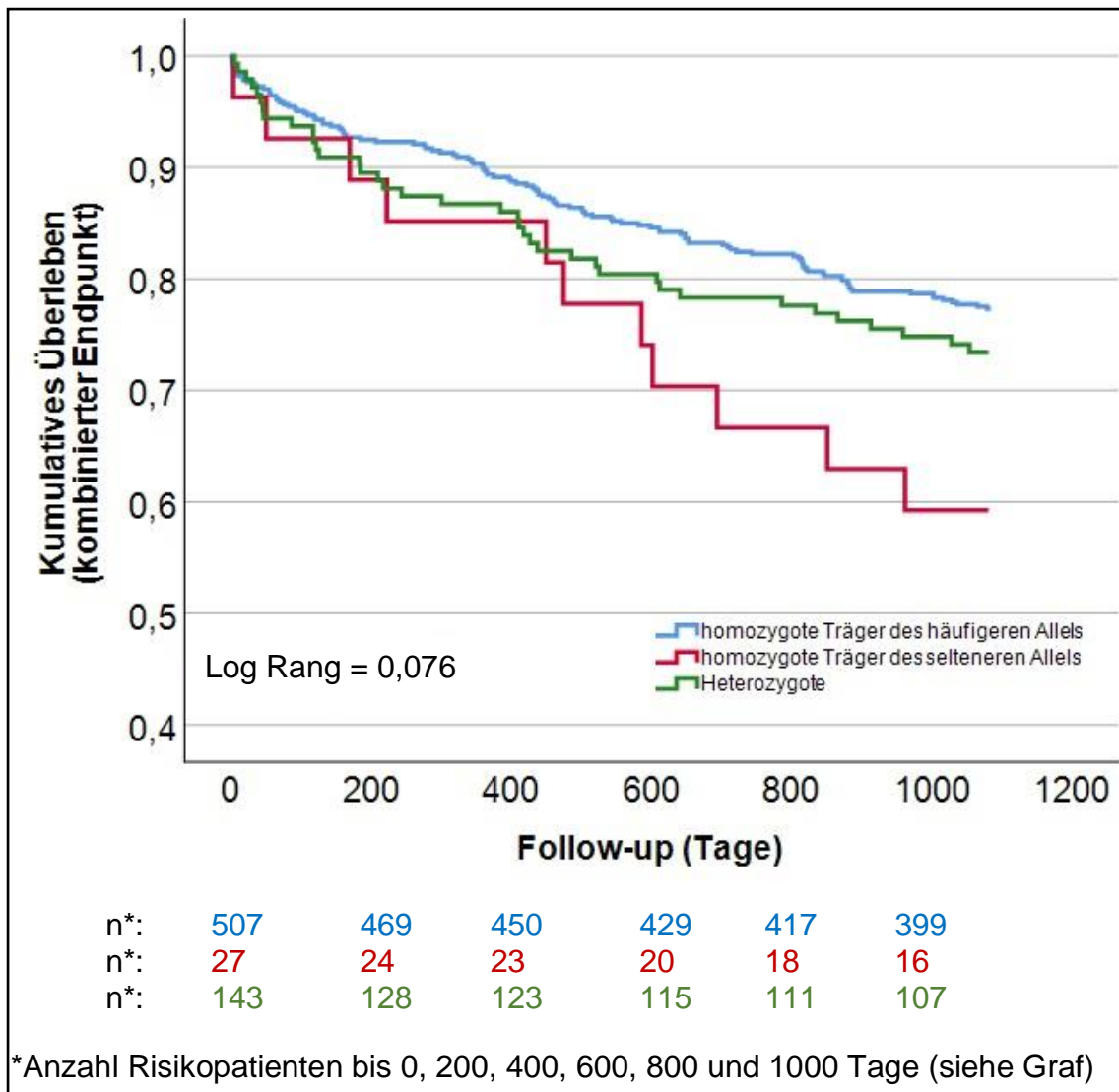


Abbildung 4: Kaplan-Meier-Kurve, kombinierter Endpunkt

Die Gesamtzahl der Werte beträgt 677. In Abbildung 4 ist zu erkennen, dass bei homozygoten Trägern des selteneren Allels (GG) mit einer Signifikanz von 0,076 häufiger Ereignisse (Tod, Myokardinfarkt, ischämischer Schlaganfall, Blutung) auftraten ( $n = 11$  von 27; 40,7%) als bei homozygoten Trägern des häufigeren Allels (AA) ( $n = 116$  von 507; 22,9%) oder bei Heterozygoten (AG) ( $n = 38$  von 143; 26,6%).

Allerdings liegt das Signifikanzniveau bei  $\leq 0,05$  und wird folglich mit dem Log Rang-Wert von 0,076 nicht erreicht.



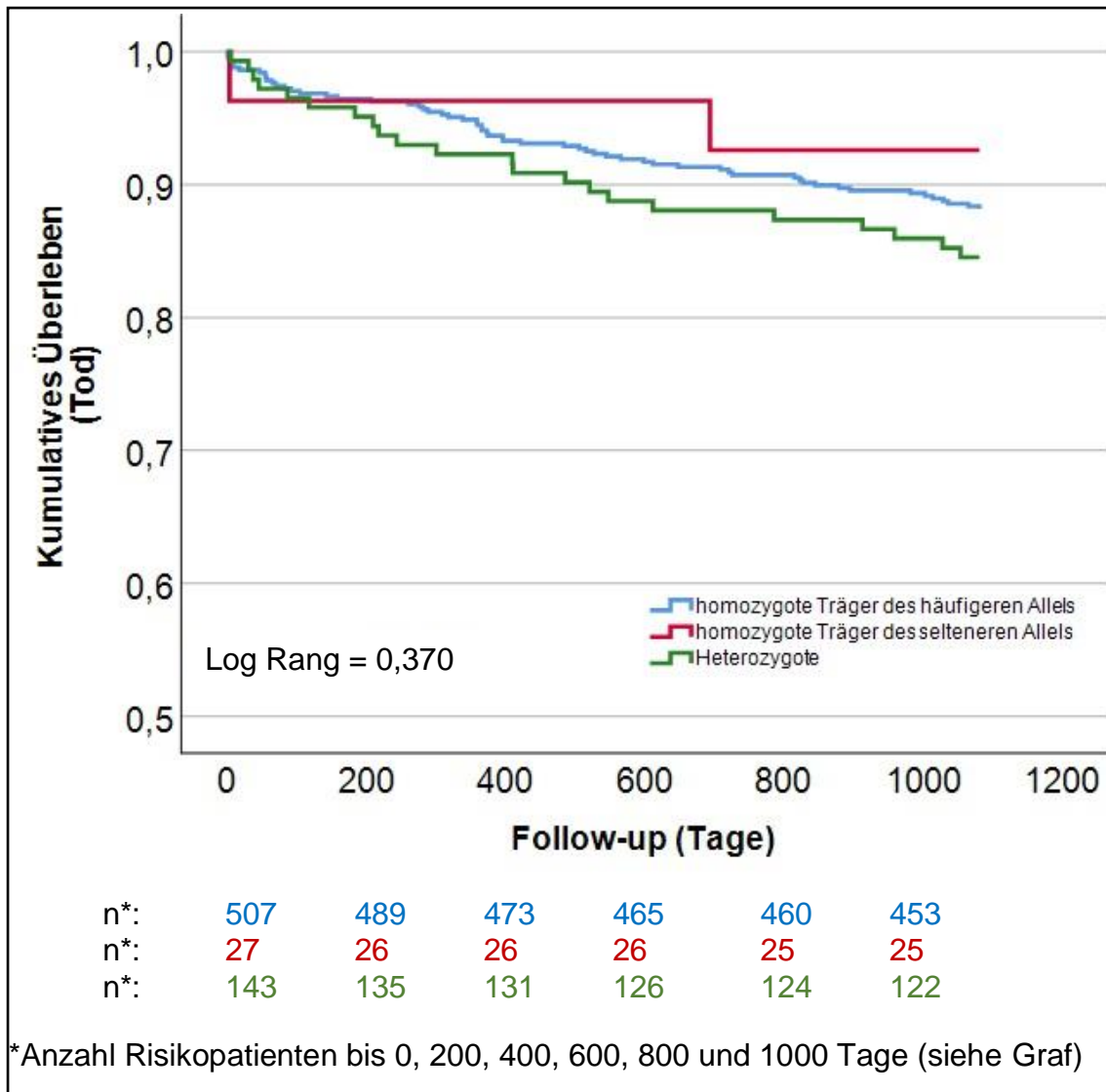


Abbildung 5: Kaplan-Meier-Kurve, Tod

Durch den Log Rang-Wert von 0,370 ist der Unterschied der Kurven in Abbildung 5 nicht signifikant. Es kann dennoch eine leicht bessere Überlebensrate bei homozygoten Trägern des selteneren Allels (GG) ( $n = 2$  von 27; 7,4%) erkannt werden. Bei den homozygoten Trägern des häufigeren Allels (AA) starben innerhalb der 1080 Tage 60 von 507 (11,8%) Probanden und bei den Heterozygoten (AG) waren es 22 von 143 (15,4%).

Diese leichte Tendenz ist auch in Tabelle 4 zu erkennen (IR/100 PJ homozygote Träger des häufigeren Allels vs. homozygote Träger des selteneren Allels vs. Heterozygote: 3,94/2,47/5,13). Der Unterschied zwischen den verschiedenen Überlebensraten ist statistisch nicht signifikant (Log Rang = 0,370).

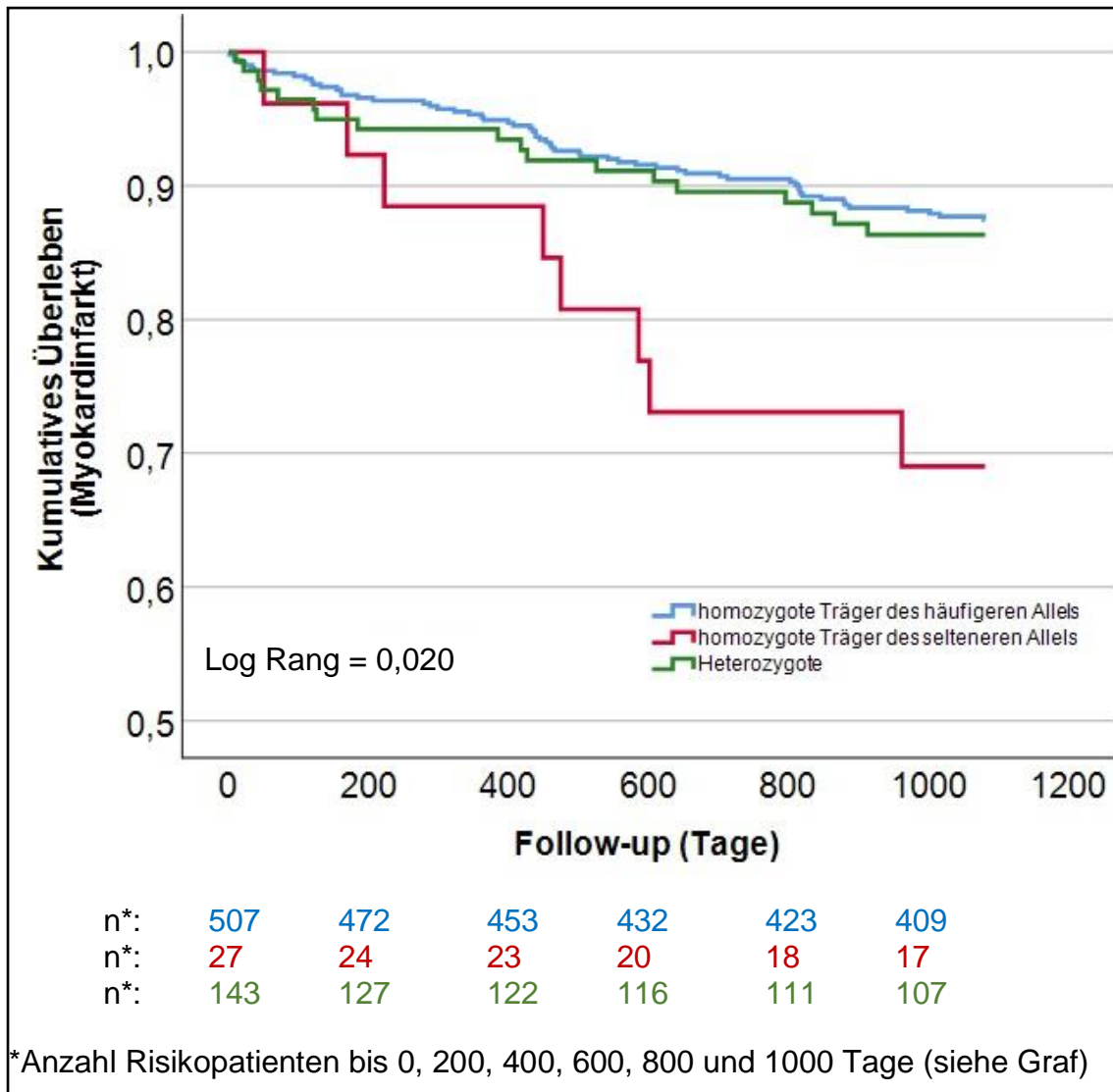


Abbildung 6: Kaplan-Meier-Kurve, Myokardinfarkt

Die Abbildung 6 bestätigt die in Abbildung 4 genannten Unterschiede mit einer Signifikanz von 0,020. Bei homozygoten Trägern des selteneren Allels (GG) traten häufiger Myokardinfarkte auf ( $n = 8$  von 27; 29,6%) als dies bei homozygoten Trägern des häufigeren Allels (AA) ( $n = 60$  von 507; 11,8%) oder bei Heterozygoten (AG) ( $n = 18$  von 143; 12,6%) der Fall war. Anhand Tabelle 4 ist diese Signifikanz bereits zu erkennen ( $p = 0,026$ ).

Beim Vergleich der „Kaplan-Meier-Kurve, Myokardinfarkt“ mit der des primären kombinierten Endpunkts, ist darauf hinzuweisen, dass Letztere durch die Signifikanz der Ersteren beeinflusst wird. Denn in den Berechnungen zum primären kombinierten Endpunkt wurde das erste Auftreten aller sekundärer

Endpunkte (Tod, Myokardinfarkt, ischämischer Schlaganfall, Blutung) mit einbezogen.

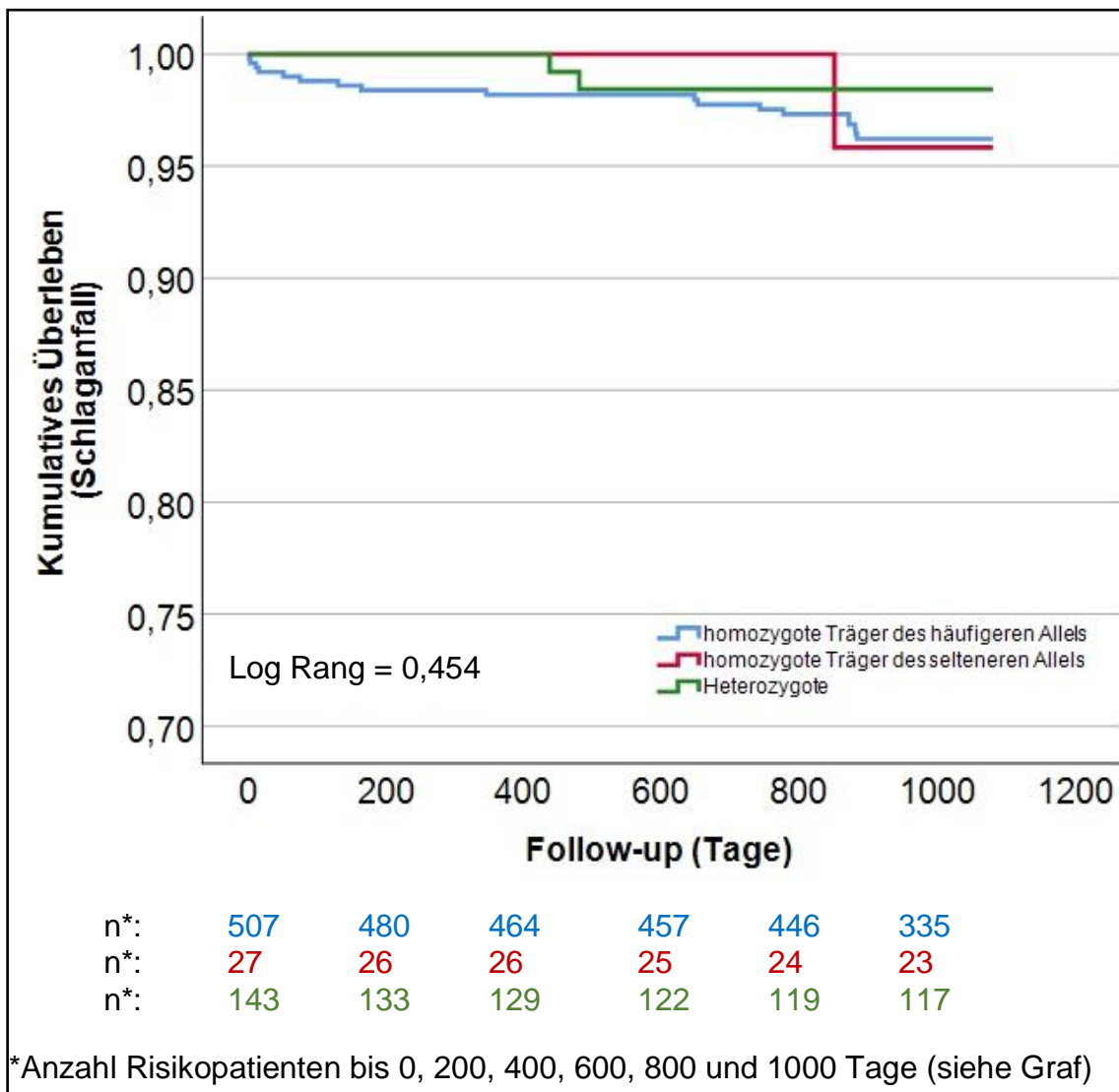


Abbildung 7: Kaplan-Meier-Kurve, Schlaganfall

Wie anhand Abbildung 7 gezeigt, trat ein Schlaganfall in den 1080 Tagen bei einem Log Rang-Wert von 0,454 sowohl bei homozygoten Trägern des selteneren Allels (n = 1 von 27; 3,7%) als auch bei homozygoten Trägern des häufigeren Allels (n = 18 von 507; 3,6%) und Heterozygoten (AG) (n = 2 von 143; 1,4%) in ähnlicher Anzahl auf.

Der Unterschied zwischen den drei Genotyp-Gruppen ist bei diesem sekundären Endpunkt nicht signifikant. Folglich ist ein Schlaganfall im Durchschnitt über die

drei Jahre bei 3,1% (n = 21 von 677) der Patienten der gesamten Kohorte aufgetreten.

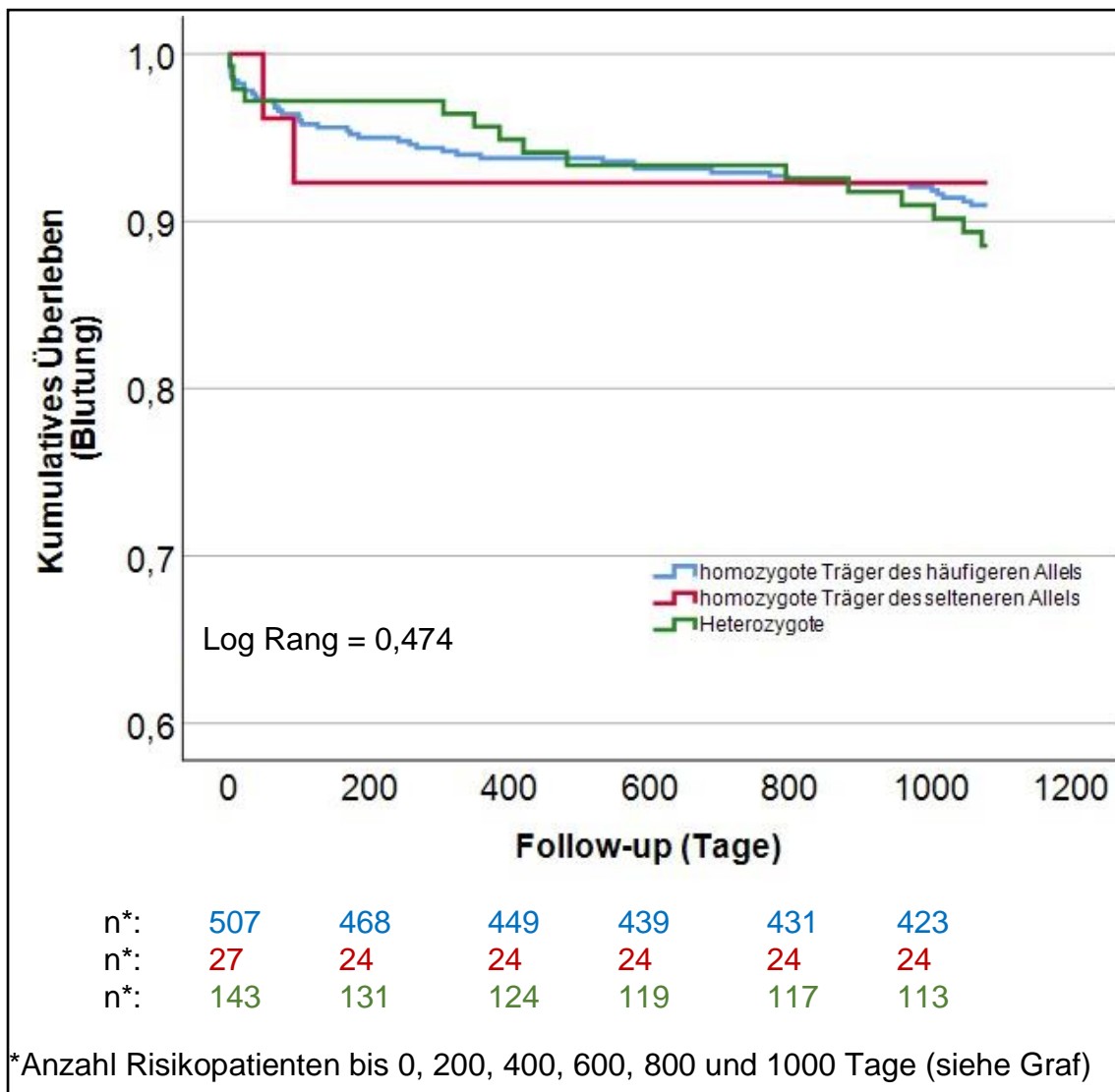


Abbildung 8: Kaplan-Meier-Kurve, Blutung

Anhand dieser Auswertung (Abb. 8) ist zu sehen, dass homozygote Träger des selteneren Allels (GG) in den ersten 400 Tagen häufigere Blutungsereignisse hatten. Bezogen auf die gesamte Studienzeit trifft dies allerdings nicht zu (gesamt n = 2 von 27; 7,4%). Bei den homozygoten Trägern des häufigeren Allels (AA) traten bei n = 44 von 507 (8,7%) und bei den Heterozygoten (AG) bei n = 15 von 143 (10,5%) Blutungsereignisse auf. Diese Unterscheidung der Kurven ist bei einem Log Rang-Wert von 0,747 nicht signifikant.

Das Auftreten einer Blutung innerhalb der drei Studienjahre war unabhängig vom Genotyp. Im Mittel betrug die Häufigkeit 9% (n = 61 von 677).

#### 4.5 Kaplan-Meier-Kurven im rezessiven genetischen Modell

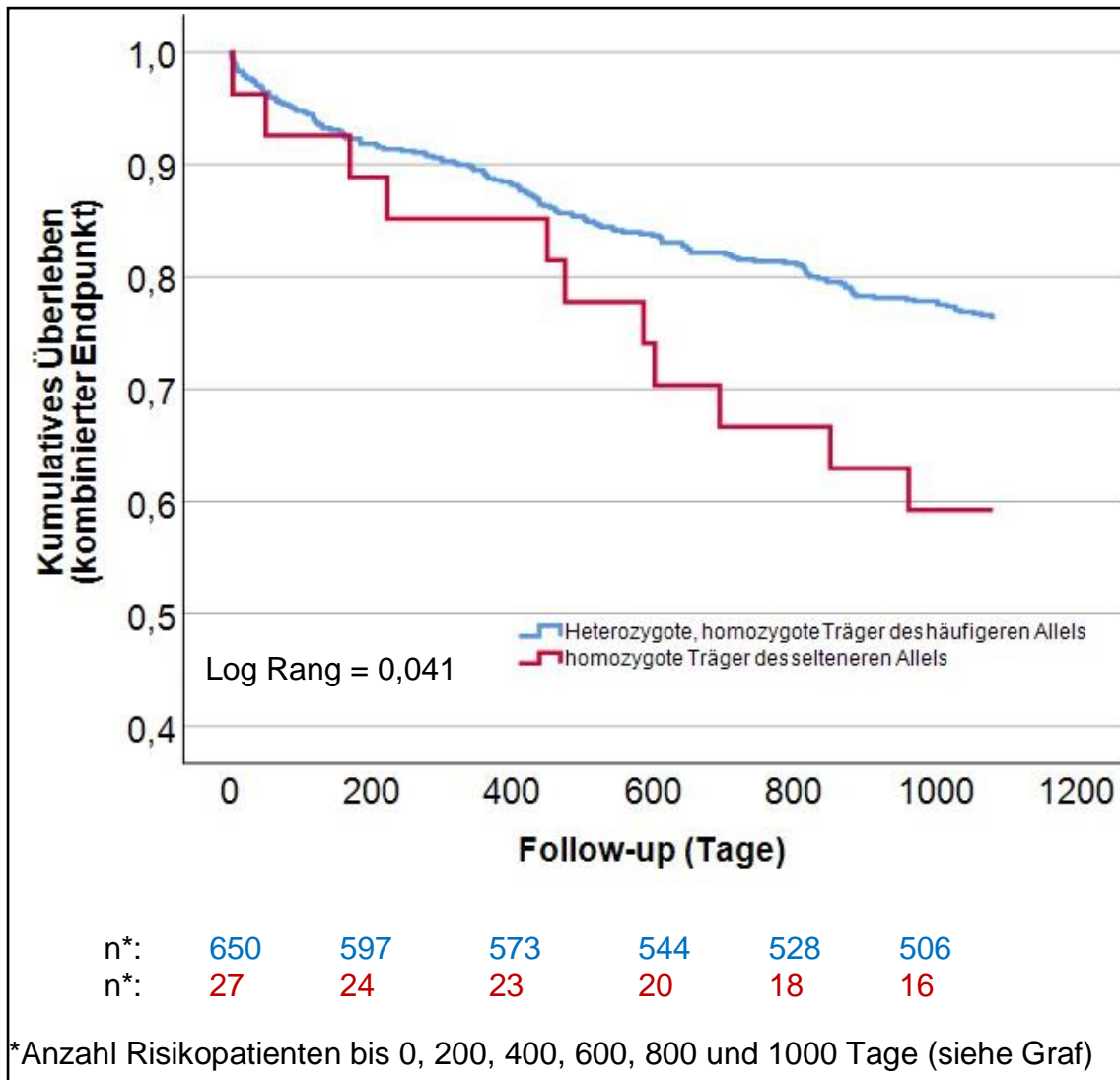


Abbildung 9: Kaplan-Meier-Kurve rezessives genetisches Modell, kombinierter Endpunkt

Mit einem Log Rang-Wert von 0,041 (Abb. 9) traten bei homozygoten Trägern des selteneren Allels (GG) signifikant häufiger Ereignisse auf (n = 11 von 27; 40,7%) als bei Trägern des häufigeren Allels (AA, AG) (n = 154 von 650; 23,7%). Diese Korrelation ist bereits anhand Abbildung 4 (Kaplan-Meier-Kurve, kombinierter Endpunkt) und Tabelle 5 (p = 0,04) zu erkennen. Jedoch liegt in

Abbildung 4 der Log Rang-Wert bei 0,076 und ist dementsprechend nicht signifikant. Im Gegensatz dazu werden in Abbildung 9 homozygote Träger des selteneren Allels (GG) allen Trägern des häufigeren Allels (AA, AG) gegenübergestellt, womit ein signifikanter Unterschied festgestellt werden kann.

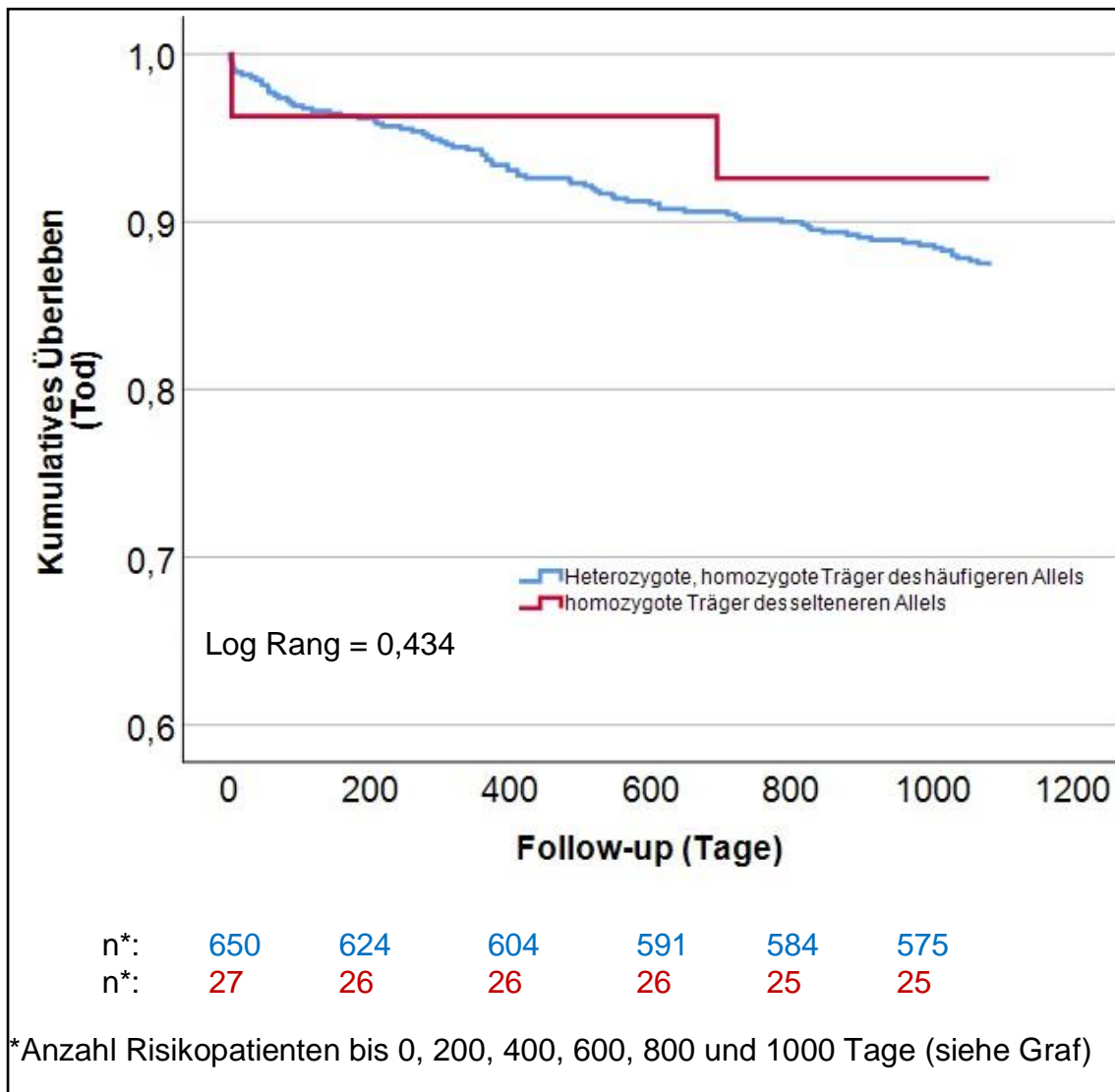


Abbildung 10: Kaplan-Meier-Kurve rezessives genetisches Modell, Tod

Bei den Trägern des häufigeren Allels (AA, AG) starben innerhalb der 3 Jahre 82 von 650 (12,6%) Patienten und unter den homozygoten Trägern des selteneren Allels (GG) 2 von 27 (7,4%). Mit dem Log Rang-Wert von 0,434 ist der leichte Unterschied vernachlässigbar.

Dennoch bestätigt sich hier erneut die Tendenz, wie schon anhand Abbildung 5 und Tabelle 5 zu erkennen, dass die homozygoten Träger des selteneren Allels

eine leicht bessere Überlebensrate aufweisen als homozygote Träger des häufigeren Allels oder Heterozygote. Allerdings wird hier, wie auch in den erwähnten Korrelationen das Signifikanzniveau nicht erreicht.

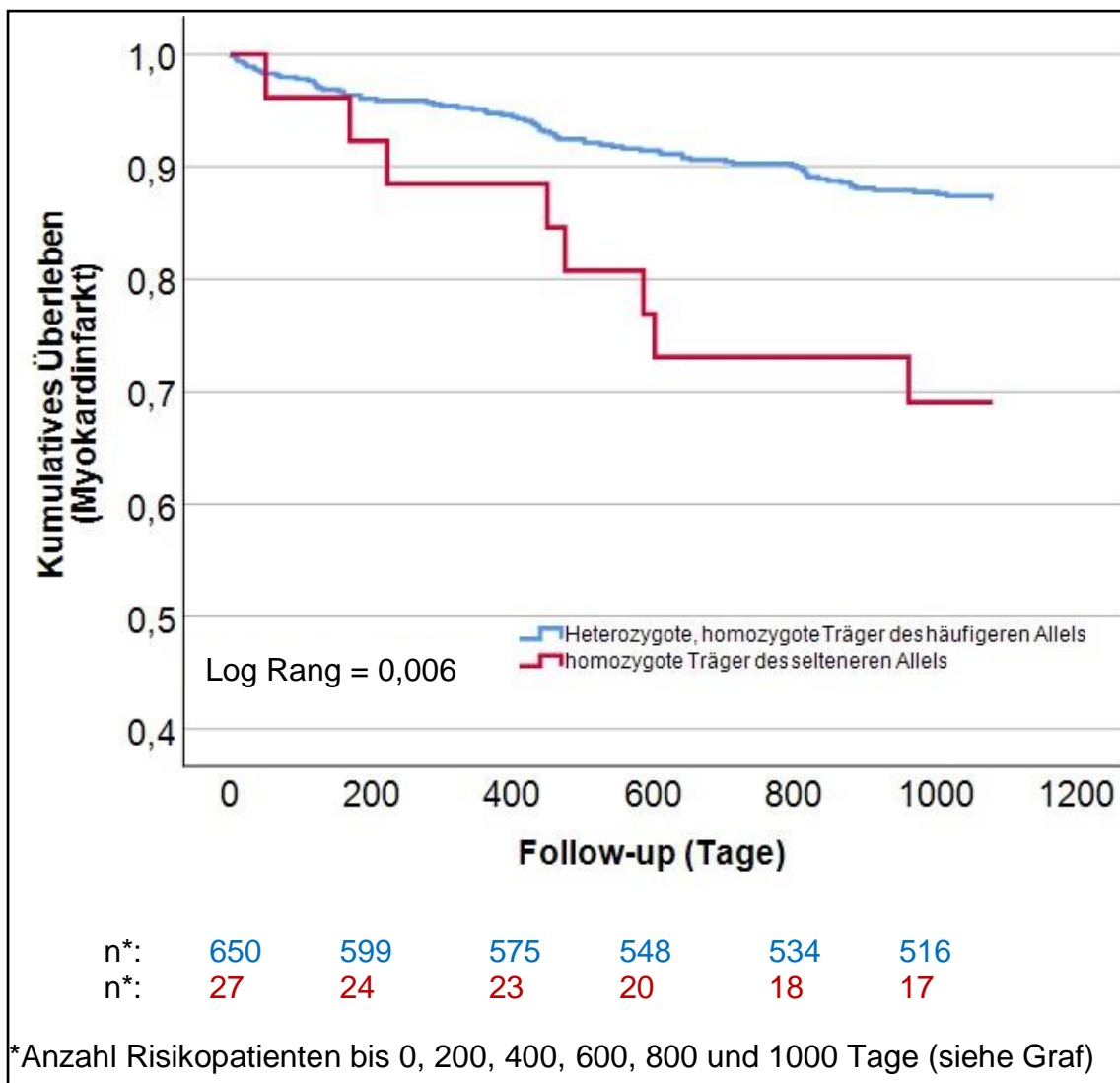


Abbildung 11: Kaplan-Meier-Kurve rezessives genetisches Modell, Myokardinfarkt

Anhand Abbildung 11 ist deutlich der Unterschied der beiden Kurven zu erkennen, was von einem Log Rang-Wert von 0,006 bestätigt wird. Homozygote Träger des selteneren Allels (GG) erlitten signifikant häufiger einen Myokardinfarkt (n = 8 von 27; 29,6%) als Träger des häufigeren Allels (AA, AG) (n = 78 von 650; 12%).

Bereits in Tabelle 5 ( $p = 0,007$ ) und Abbildung 6 (Log Rang = 0,020) zeigt sich das Auftreten des sekundären Endpunkts „Myokardinfarkt“ signifikant unterschiedlich zwischen den verschiedenen Genotypen. Im rezessiven genetischen Modell tritt diese Differenz deutlich stärker hervor.

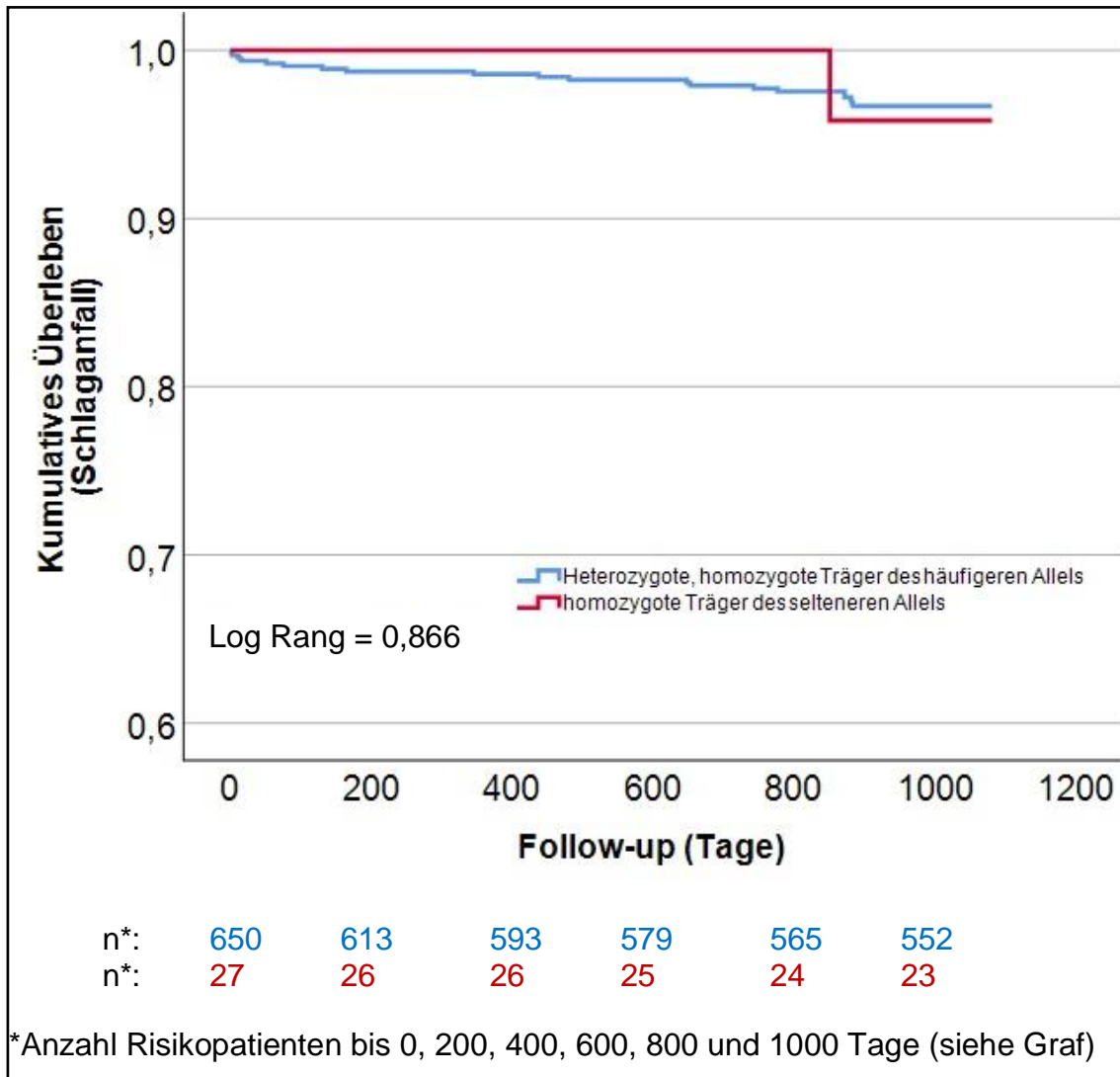


Abbildung 12: Kaplan-Meier-Kurve rezessives genetisches Modell, Schlaganfall

Anhand der Abbildung 12 ist zu erkennen, dass sich die beiden Kurven nicht signifikant voneinander unterscheiden. Bei homozygoten Trägern des selteneren Allels (GG) traten innerhalb der 1080 Tage bei einem von 27 Patienten (3,7%) ein Schlaganfall auf und bei Trägern des häufigeren Allels waren es 20 von 649 (3,1%) Probanden.

Im Vergleich zu Abbildung 7 kann auch im rezessiven genetischen Modell keine Abhängigkeit des Auftretens des sekundären Endpunkts Schlaganfall festgestellt



werden. Somit ist davon auszugehen, dass die verschiedenen Genotypen keinen Einfluss auf das Ereignis „Schlaganfall“ haben.

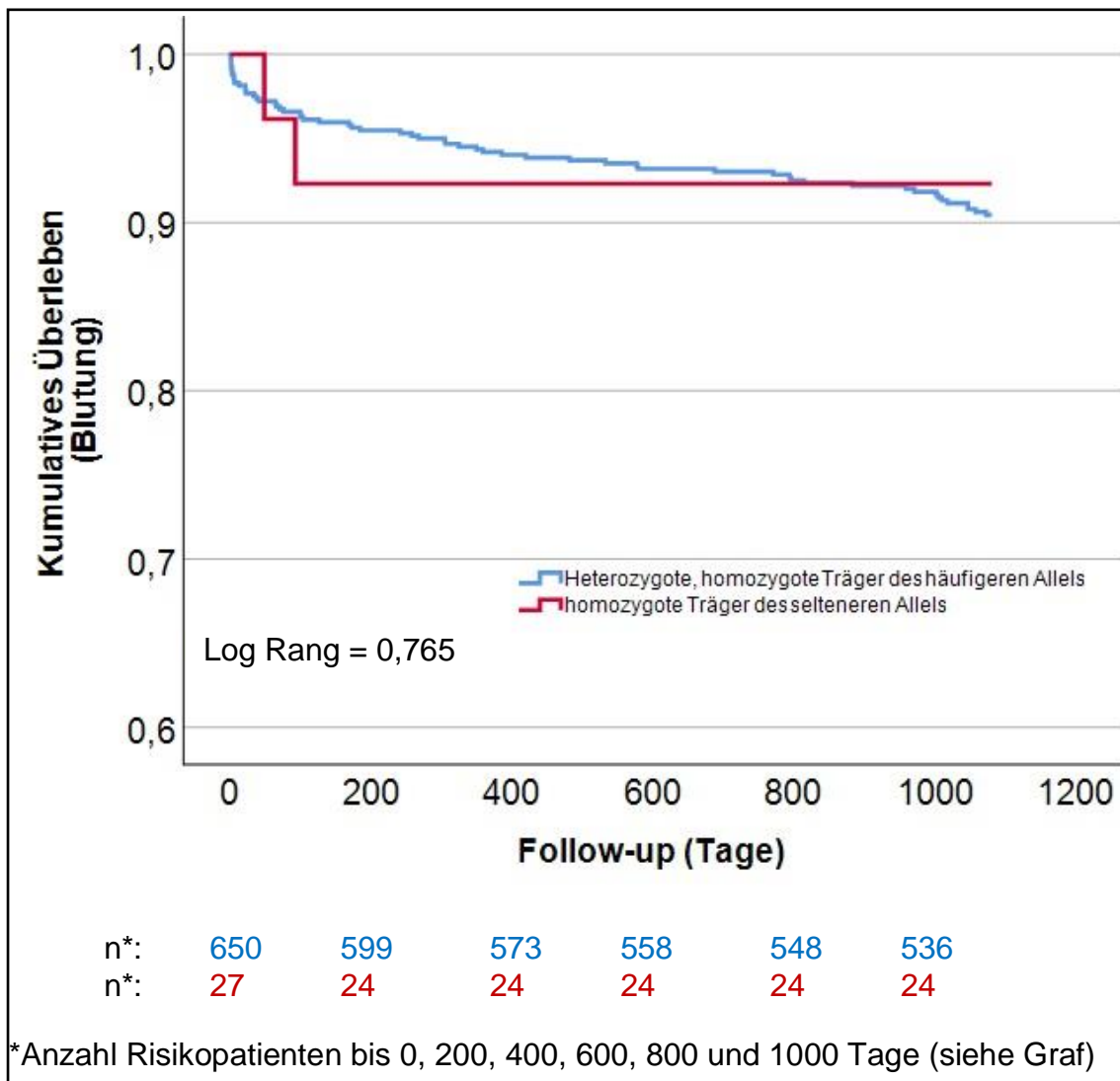


Abbildung 13: Kaplan-Meier-Kurve rezessives genetisches Modell, Blutung

Entsprechend der Kaplan-Meier-Kurve bezüglich des Schlaganfalls (Abb. 12) unterscheiden sich auch hier bei den Blutungsereignissen die beiden Kurven kaum (Log Rang = 0,765). Bei homozygoten Trägern des selteneren Allels (GG) traten bei 2 von 27 Patienten (7,4%) klinisch relevante Blutungen auf. Bei den Trägern des häufigeren Allels (AA, AG) waren es 59 von 650 (9,1%).

Somit ist anhand dieser Korrelation als auch bei der in Abbildung 8 davon auszugehen, dass die Blutungsereignisse innerhalb der drei Studienjahre unabhängig zwischen den homozygoten Trägern des selteneren Allels, den

homozygoten Trägern des häufigeren Allels und den Heterozygoten auftraten. Insgesamt hatten 6% (n = 61 von 677) der Patienten klinisch relevante Blutungsereignisse.

#### 4.6 Einfache Boxplots der FACS- und ELISA-Analyse

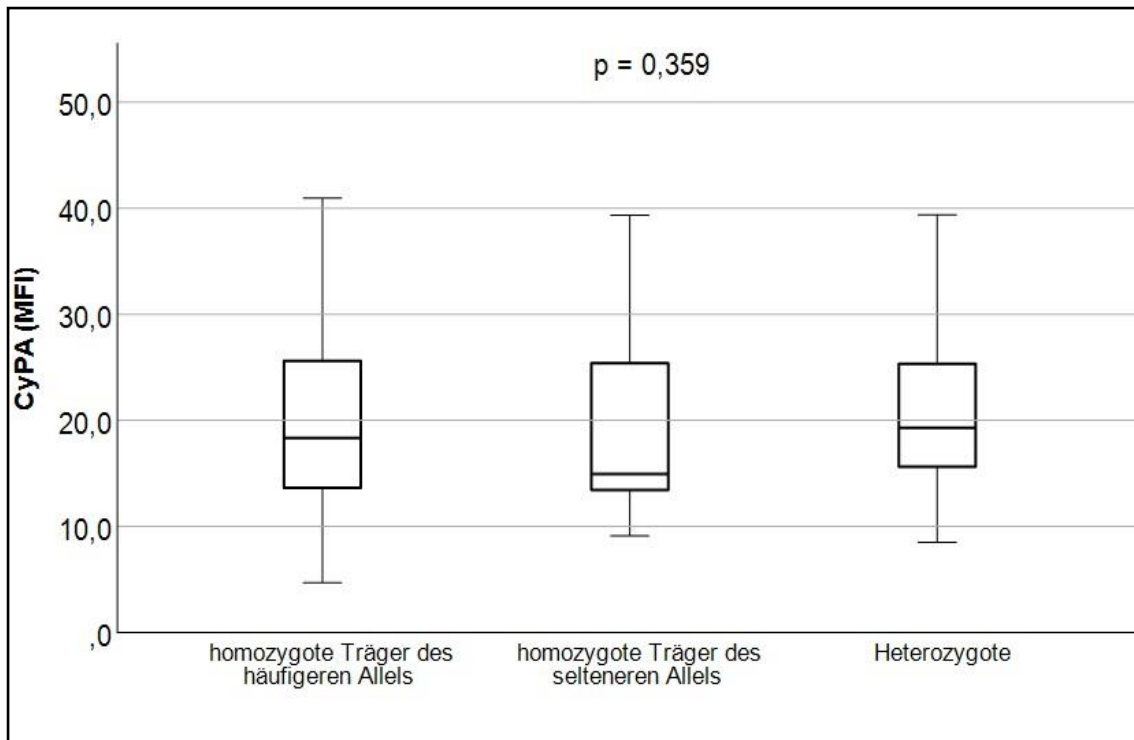


Abbildung 14: Einfacher Boxplot für CyPA MFI

Abbildung 14 präsentiert die Oberflächenexpression von CyPA auf den Thrombozyten von insgesamt 333 Patienten (AA, n = 254; GG, n = 7; AG, n = 72). Diese wurde mittels MFI dargestellt. Der Median liegt bei homozygoten Trägern des häufigeren Allels bei 18,2, der Mittelwert bei 20,0 und die Standardabweichung beträgt 9,1. Bei den homozygoten Trägern des selteneren Allels liegt der Median bei 14,95, der Mittelwert bei 20,1 und die Standardabweichung bei 11,6. In der Gruppe der Heterozygoten ist der Median 19,3, der Mittelwert 21,4 und die Standardabweichung 9,4. Mit einem p-Wert von 0,359 ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Oberflächenexpression bei homozygoten Trägern des häufigeren Allels, homozygoten Trägern des selteneren Allels oder Heterozygoten feststellen.

Somit scheint die Oberflächenexpression des CyPA auf Thrombozyten nicht wesentlich von den verschiedenen Allelträgern abzuhängen.

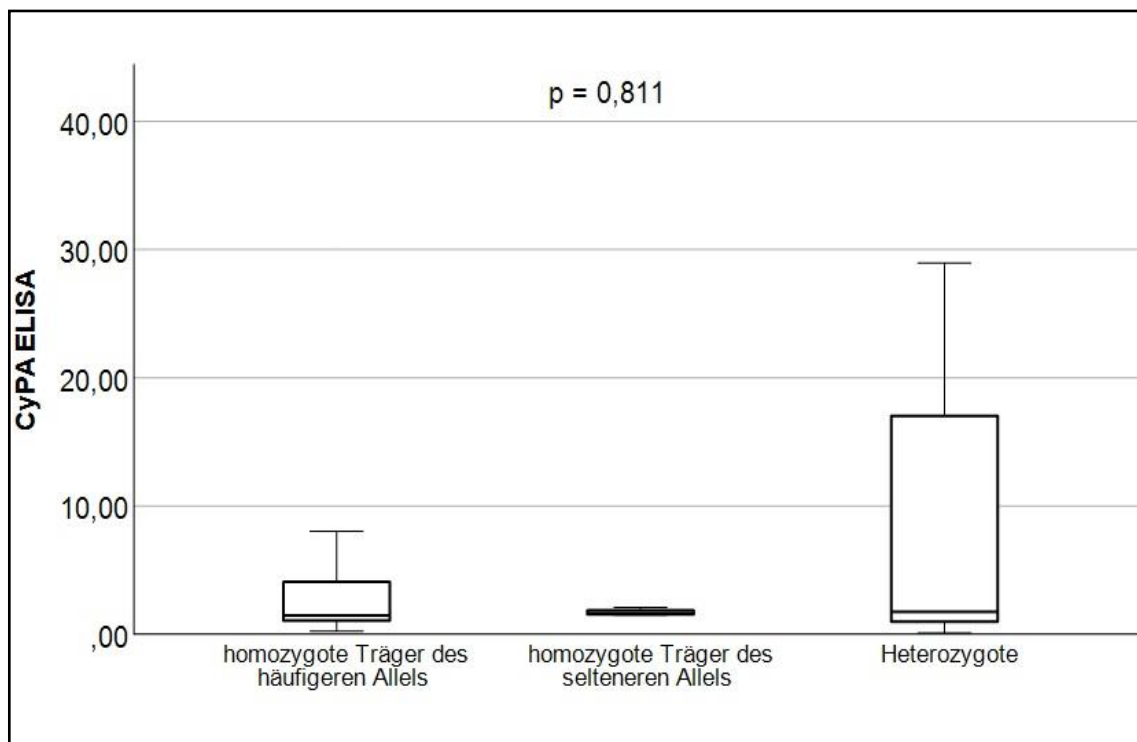


Abbildung 15: Einfacher Boxplot für CyPA ELISA

Anhand Abbildung 15 ist die Serumkonzentration von CyPA von insgesamt 122 Patienten bei homozygoten Trägern des häufigeren Allels ( $n = 92$ ), homozygoten Trägern des selteneren Allels ( $n = 3$ ) und Heterozygoten ( $n = 27$ ) dargestellt. Die Analyse wurde mittels ELISA durchgeführt. Der Median liegt in der ersten Gruppe bei 1,5, der Mittelwert bei 57,6 und die Standardabweichung bei 374,2. In der zweiten Gruppe liegt der Median bei 1,6, der Mittelwert bei 1,7 und die Standardabweichung bei 0,3. Die letzte Gruppe weist einen Median von 1,8, einen Mittelwert von 78,4 und eine Standardabweichung von 260,7 auf. Die Unterschiede sind mit einem p-Wert von 0,811 nicht signifikant.

#### 4.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Bei der Untersuchung der Einzelnukleotidpolymorphismen konnte ein deutlich höherer Raucheranteil ( $p = 0,042$ ) in der Gruppe der homozygoten Träger des selteneren Allels evaluiert werden.

In der Cox-Regressionsanalyse konnte nachgewiesen werden, dass der Polymorphismus CyPA PPIA rs6850 unabhängig von jeglichen berücksichtigten kardiovaskulären Faktoren mit dem primären kombinierten Endpunkt (Bonferroni-korrigiert  $p = 0,02$ ) und dem Endpunkt Myokardinfarkt (Bonferroni-korrigiert  $p = 0,01$ ) assoziiert ist. Die Hazard ratio war für den Myokardinfarkt um das 3,15-fache und für den kombinierten Endpunkt um das 2,48-fache erhöht. Für die Endpunkte Tod, ischämischer Schlaganfall und Blutung konnte eine solche unabhängige positive Korrelation nicht festgestellt werden.

In der Überlebensanalyse mittels Kaplan-Meier-Kurven unterschied sich die Gegenüberstellung aller drei Allelträger von dem rezessiven genetischen Modell, in dem die Summe der Träger des häufigeren Allels (AA, AG) mit den homozygoten Trägern des selteneren Allels (GG) verglichen wurden.

So konnte kein signifikanter Unterschied zwischen homozygoten Trägern des häufigeren Allels (AA), homozygoten Trägern des selteneren Allels (GG) und Heterozygoten (AG) bezüglich der Endpunkte CE, Tod, IS und Blutung nachgewiesen werden. Allerdings trat mit einem Log Rang-Wert von 0,02 der sekundäre Endpunkt Myokardinfarkt häufiger bei homozygoten Trägern des selteneren Allels (GG) als bei den anderen beiden Genotypen auf.

Im rezessiven genetischen Modell ergab die Analyse kein aussagekräftiges Ergebnis bezüglich der Endpunkte Tod, ischämischer Schlaganfall oder Blutung. Im Gegensatz zur oben beschriebenen Methode, zeigte sich in diesem Modell ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,041$ ) zwischen den Trägern des häufigeren Allels (AA, AG) und den homozygoten Trägern des selteneren Allels (GG) beim Auftreten des primären kombinierten Endpunkts (CE). So kam es bei Letzteren häufiger zu Ereignissen als bei Trägern des häufigeren Allels (AA, AG). Genauso verhielt es sich bei dem sekundären Endpunkt Myokardinfarkt. So erlitten homozygote Träger des selteneren Allels (GG) signifikant häufiger ( $p = 0,006$ )

einen Myokardinfarkt innerhalb der drei Studienjahre als Träger des häufigeren Allels (AA, AG).

Schlussendlich wurde in Form von einfachen Boxplots die Oberflächenexpression auf Thrombozyten und die Plasmakonzentration von CyPA bei den unterschiedlichen Allelträgern dargestellt. Die durch FACS ermittelte Oberflächenexpression des CyPA unterschied sich nicht wesentlich ( $p = 0,359$ ) zwischen den drei Gruppen (AA, GG, AG) und ist somit unabhängig vom Genotyp.

Die Plasmakonzentration des CyPA wurde mit ELISA erfasst und zeigte sich in ihrer Höhe im Vergleich auch als unabhängig vom Genotyp ( $p = 0,811$ ).

## 5. Diskussion

Die wichtigsten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind zum einen die Erkenntnis, dass CyPA PPIA rs6850 unabhängig von anderen kardiovaskulären Risikofaktoren und epidemiologischen Faktoren mit dem primären kombinierten Endpunkt und dem Myokardinfarkt assoziiert ist. Zum anderen, dass das kumulative Überleben dieser Endpunkte für homozygote Träger des selteneren Allels (GG) signifikant geringer ist.

Die thrombozytäre Oberflächenexpression und die Plasmakonzentration des CyPA ist nach der Analyse mit ELISA und FACS unabhängig von der Allelhäufigkeit des untersuchten Polymorphismus. Genauso verhält es sich beim Auftreten der anderen sekundären Endpunkte Tod, ischämischer Schlaganfall, sowie klinisch relevante Blutungen.

Wie zu Beginn dieser Arbeit erläutert, katalysieren die Cyclophiline die Isomerisierung der Peptid-Bindung von trans- zu cis-Form an Prolinresten und ermöglichen im Körper die Proteinfaltung durch ihre peptidyl-prolyl-Isomerase-Aktivität.

Neben der Proteinfaltung hat insbesondere CyPA noch eine Transportfunktion, sowie die Fähigkeit der T-Zell-Aktivierung und der zellulären Signaltransduktion. (*Nigro/Pompilio/Capogrossi*, 31.10.2013) Wie hier mittels ELISA gemessen und in Boxplots dargestellt, ist CyPA auch extrazellulär im Serum zu finden. Es wird demnach zusätzlich sezerniert. Hervorgerufen wird diese Sekretion als Antwort auf eine Entzündungsstimulation beispielsweise durch Hypoxie, Infektion oder oxidativen Stress. (*Jin u. a.*, 27.10.2000; *Seko u. a.*, 2004; *Sherry u. a.*, 1992; *Suzuki u. a.*, 31.03.2006)

Somit beeinflusst CyPA die interzelluläre Kommunikation sowohl als auto-, als auch als parakriner Faktor. Hierbei stimuliert das extrazelluläre CyPA die Entzündungsreaktion der Endothelzellen und der vaskulären glatten Muskelzellen (VGM) als proinflammatorisches Zytokin. (*Jin u. a.*, 27.10.2000; *Suzuki u. a.*, 31.03.2006; *Yang u. a.*, 2005) Zusätzlich hat es eine hohe chemotaktische Wirkung auf Leukozyten, Monozyten und Lymphozyten. (*Sherry u. a.*, 1992; *Xu u. a.*, 1992)

Es kann folglich darauf geschlossen werden, dass die CyPA-Serumkonzentration in positiver Korrelation mit der Schwere und dem Vorkommen entzündlicher Erkrankungen steht. (*Billich u. a.*, 1997; *Stemmy u. a.*, 2011; *Tegeeder u. a.*, 1997) Als Quellen für das extrazelluläre Vorkommen wurden bereits die vaskulären glatten Muskelzellen angegeben. Des Weiteren wurde die Aktivierung von Myosin II infolge des Rho-Rock2-Signals als pathophysiologisch relevante Quelle des CyPA beschrieben. (*Suzuki u. a.*, 31.03.2006; *Tang u. a.*, 2017) Jedoch sollte bei der Interpretation der CyPA-Wirkung beachtet werden, dass CyPA bei niedrigen Konzentrationen die Endothelzellproliferation, die Tubulogenese, die Invasionskapazität und die Migration erhöht. Zudem wird mehr aktive Matrix-Metall-Proteinase-2 sezerniert. Bei hohen Konzentrationen entfaltet CyPA allerdings eine gegensätzliche Wirkung, indem es die EZ-Migration und Überlebensfähigkeit herabsetzt. (*Kim u. a.*, 2004)

Eine weitere Untersuchung zeigt, dass CyPA als redox-sensitiver sezernierter Mediator als Wachstumsfaktor der vaskulären glatten Muskelzellen auftritt (*Jin u. a.*, 2000) und somit Kardiomyozyten vor oxidativem Stress schützen soll. (*Doyle/Virji/Crompton*, 1999) Demzufolge würde ein schnellerer Abbau und eine geringere Expression eher zu kardiovaskulären Schäden beitragen, was Palacín et al. in ihrer experimentellen Arbeit allerdings nicht nachweisen konnten. Sie vermuteten dennoch, dass die SNPs rs8177826 (-11 G/C) und rs6850 (+36 G/A) Erkrankungen beeinflussen, bei denen CyPA eine Rolle spielt. (*Palacín u. a.*, 2008)

Es ist anzumerken, dass Palacín et al. lediglich 250 Patienten mit koronarer Herzerkrankung untersuchten und diese mit 250 gesunden Patienten verglichen. Dabei waren alle Probanden von männlichem Geschlecht und 92% der Patientengruppe waren Raucher. Im Gegensatz dazu waren es lediglich 40% in der Referenzgruppe. Ein weiterer Unterschied zu der vorliegenden Studie ist, dass Palacín et al. die statistische Analyse mit Odds ratio durchführten und nicht, wie in dieser Arbeit mit Hazard ratio (sowie der Cox-Regression und Kaplan-Meier-Kurven). Zudem kamen in deren Patientengruppe 4 und in deren Referenzgruppe 5 Probanden mit dem Polymorphismus rs6850 vor. (*Palacín u. a.*, 2008) In der vorliegenden Analyse waren es 27 von 677 Probanden.

Durch das Sammeln und Analysieren der Blutproben, sowie der anschließenden retrograden Befragung der Studienteilnehmer, konnte über die Überlebenszeitanalyse in den 3 Studienjahren ein signifikanter Unterschied zwischen den Allelträgern herausgearbeitet werden. Die Vermutung von Palacín et al., dass durch den SNP rs6850 das Auftreten eines Myokardinfarkts wahrscheinlicher ist, konnte somit trotz anfänglicher gegenteiliger Annahme nachgewiesen werden. In den Ergebnissen trat zudem der primäre kombinierte Endpunkt (CE) signifikant häufiger bei homozygoten Trägern des selteneren Allels auf. Da die Darstellung des kombinierten Endpunkts das unabhängige Auftreten aller anderen sekundären Endpunkte (Tod, Myokardinfarkt, ischämischer Schlaganfall und Blutung) zusammenfasst, ist die Differenz der Kurven durch das Ergebnis des sekundären Endpunkts „Myokardinfarkt“ bedingt. Für die weiteren sekundären Endpunkte konnte kein Zusammenhang zwischen dem Einzelnukleotidpolymorphismus und den Ereignissen festgestellt werden. In der vorliegenden Arbeit konnte keine positive Korrelation zwischen der unterschiedlichen Allelhäufigkeit des untersuchten Polymorphismus und der Oberflächenkonzentration von CyPA festgestellt werden (siehe Abbildung 14). Gleichermaßen verhielt es sich bei den Serumkonzentrationen des CyPA (siehe Abbildung 15), obwohl der Polymorphismus die Struktur des CyPA negativ beeinflussen und für einen schnelleren Abbau sorgen soll. (Hahn u. a., 2012; Hahn/Ciesek, 2015) Die darauf begründete Schlussfolgerung, dass Patienten mit dem Polymorphismus eine geringere CyPA-Serumkonzentration haben, konnte folglich nicht nachgewiesen werden. Allerdings wurden Ausreißer bei der deskriptiven Statistik nicht extrahiert und könnten das Ergebnis beeinflusst haben. Diese Beeinflussung gilt jedoch nur für die Standardabweichung und den Mittelwert, nicht für den Median.

Da speziell zur untersuchten Thematik des Einzelnukleotidpolymorphismus rs6850 im Zusammenhang mit der symptomatischen koronaren Herzerkrankung nur wenige Forschungsergebnisse vorliegen, sind weitere Studien zu diesem Themengebiet von eminenter Bedeutung. Außerdem sollte das Intervall der Datenerhebung möglichst von drei auf fünf oder mehr Jahre erweitert werden, um auch langfristig repräsentative Ergebnisse zu erhalten. Ähnlich verhält es sich



mit der Anzahl der Studienteilnehmer. Mit einer Anzahl von 752 Patienten konnte eine moderate Stichprobe betrachtet, bzw. eine Teilerhebung durchgeführt werden. In der deskriptiven Statistik in Form der Boxplots waren es 333 bzw. 122 Probanden (FACS, n=333; ELISA, n=122). Es kann somit grundsätzlich auf die Grundgesamtheit geschlossen werden, dennoch sollten in nächster Zeit weitere Patienten in die Datenerhebung eingeschlossen werden, um noch umfassendere Ergebnisse zu erhalten.

Des Weiteren bestand die Kohorte aus Patienten mit stabiler KHK und dem ACS. Diese Zusammensetzung könnte die Prognose beeinflussen. Der Aufnahmegrund (stabile KHK oder ACS) stellte jedoch in dieser multivariaten Analyse keine Störgröße dar.

Ein weiterer Punkt ist die Evaluation der Daten durch das Telefon-Interview. Es wurde von den durchführenden Personen indes auf die Objektivität und die Reliabilität ihrer Befragung geachtet, dennoch könnte ein Interview-Protokoll für einheitlichere und objektivere Fragen und Antworten sorgen. Eine weitere Schwachstelle liegt in den Antworten der Studienteilnehmer. So war für viele eine klinisch relevante Blutung schwer vorstellbar oder sie hatten deren Auftreten möglicherweise über die Zeit vergessen. Außerdem könnten einige Ereignisse verfälscht worden oder verloren gegangen sein, falls sich die genaue zeitliche Einordnung für den Patienten schwer darstellte. Insbesondere bei der Befragung von Angehörigen der verstorbenen Probanden, die sich an kardiovaskuläre Ereignisse vor dem Tod ihres Verwandten erinnern mussten, lag aufgrund der Emotionalität die Schwierigkeit der persönlichen Befragung.

Wenn die Patienten der Studie in den drei Jahren regelmäßig im Universitätsklinikum Tübingen behandelt worden waren, konnten die Daten zusätzlich mit Arztbriefen oder Operationsberichten erfasst werden. Dies erforderte allerdings das gründliche Durcharbeiten dieser Dokumente. Grundvoraussetzung war hierbei die Vollständigkeit der Diagnosen und deren sorgfältige Auflistung. Auf diese Weise war die genaue zeitliche Einordnung von kardiovaskulären Ereignissen möglich. Sollten Diagnosen oder Blutungen gefehlt haben oder nur im Fließtext erwähnt worden sein, ist auch hier von einem möglichen Datenverlust auszugehen.

Um eine optimale Datenerhebung mit möglichst geringen Verlusten von Ereignissen und damit genaueren Ergebnissen zu gewährleisten, empfiehlt der Verfasser dieser Arbeit eine engere Zusammenarbeit und mehr Austausch mit weiteren behandelnden Ärzten und Krankenhäusern. Es muss hierbei konsequent darauf geachtet werden, dass etwaige Datenschutzgesetze, sowie die ärztliche Schweigepflicht nicht verletzt werden. Weiterhin benötigt es eine detaillierte Aufklärung und spezifische Einverständniserklärungen der teilnehmenden Patienten. So könnten zukünftig aufgetretene Ereignisse besser evaluiert und zeitlich eingeordnet werden.

Sollten die Ergebnisse dieser Arbeit bei weiteren Untersuchungen bestätigt werden, eröffnet sich ein neuer Risikoindikator für das Auftreten und den Verlauf der koronaren Herzerkrankung. Dieser könnte künftig in die individuelle Bewertung des Krankheitsbildes eingebunden werden und ermöglicht für den Patienten und den Behandler einen weiteren Fortschritt hin zur Präzisionsmedizin. (*Thomas/Lip, 2017*) Weiterführend könnte das Risiko des Auftretens eines Myokardinfarkts in Zukunft besser definiert und die Therapie mit Antikoagulanzen und Thrombozytenaggregationshemmern bei Hochrisikopatienten angepasst werden.

Diesbezüglich ist ein wichtiges Ergebnis der Arbeit, dass das Vorkommen von klinisch relevanten Blutungen bei den homozygoten Trägern des selteneren Allels nicht signifikant häufiger war als bei den homozygoten Trägern des häufigeren Allels oder den Heterozygoten. Dank dieser Erkenntnis ist eine stärkere antikoagulative Therapie zur Verringerung thromboischämischer Ereignisse ggf. möglich, bzw. empfehlenswert.

Obwohl noch unklar ist, ob das Testen genetischer Polymorphismen für den Patienten, die Diagnose, die Prognose oder die Medikation von Nutzen ist (*Cambien, 2005*), ermöglicht die Entdeckung und Untersuchung relevanter Gene dennoch eine bessere Einschätzung des Erkrankungsrisikos. (*Wang, 2005*)

Dies kann und sollte künftig die Therapievorgaben im klinischen Alltag vereinfachen und schlussendlich die Prognose der Patienten verbessern.

Insbesondere zu diesem Thema des Einzelnukleotidpolymorphismus rs6850 im konkreten Zusammenhang mit CyPA und deren Beeinflussung von kardiovaskulären Ereignissen liegen noch wenige Studien vor.

Aufgrund dessen sind weitere Untersuchungen von eminenter Bedeutung, um die Ergebnisse dieser Arbeit zu stützen. Insbesondere sollte eine höhere Anzahl an Probanden und eine verbesserte Evaluation der Daten angestrebt werden, um die Studie weiter auszubauen. Erst dann kann die Genotypisierung von Patienten mit einer KHK oder einem ACS ein sinnvoller und hilfreicher Risikoscore werden.

## 6. Zusammenfassung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit konnte aufgezeigt werden, dass CyPA PPIA rs6850 unabhängig von anderen kardiovaskulären Risikofaktoren mit dem Auftreten des primären kombinierten Endpunkts und dem Myokardinfarkt assoziiert ist. Wenn die drei Allelträger (AA, GG, AG) untereinander verglichen werden, tritt ein Herzinfarkt bei homozygoten Trägern des selteneren Allels (GG) signifikant häufiger auf. Den primären kombinierten Endpunkt betreffend, wird lediglich im rezessiv genetischen Modell das Signifikanzniveau ( $\leq 0,05$ ) erreicht. Die Oberflächenexpression, sowie die Serumkonzentration von CyPA unterschied sich zwischen den drei Genotypen nicht wesentlich.

Es wurden 752 Patienten genotypisiert und retrospektiv nach 3 Jahren befragt. Dabei war der ursprüngliche Aufnahmegrund bei 368 Probanden die stabile KHK und bei 384 das ACS. Die Ergebnisse wurden mittels Cox-Regressionsanalysen und Kaplan-Meier-Kurven ermittelt.

Blutproben von 333 Patienten konnten mittels FACS untersucht werden. Davon litten 158 an stabiler KHK und 175 an dem ACS. Mit ELISA wurden 122 Blutproben analysiert (74 von Patienten mit stabiler KHK und 48 mit ACS). Somit konnte die CyPA-Serumkonzentration und die Oberflächenexpression von CyPA auf den Thrombozyten gemessen werden.

Die Studienergebnisse deuten darauf hin, dass der Einzelnukleotidpolymorphismus rs6850 des PPIA-Gens ein höheres Myokardinfarktrisiko birgt. Er könnte künftig als Risikoparameter gemessen werden, um beispielsweise Hochrisikokollektive hinsichtlich eines zukünftigen Myokardinfarkts zu identifizieren und gegebenenfalls die Therapie über Verlängerung oder Verkürzung der antithrombozytären Therapie anzupassen.

## 7. Literaturverzeichnis

- A Billich, F Hammerschmid, P Peichl, R Wenger, G Zenke, V Quesniaux, B Rosenwirth*: Mode of action of SDZ NIM 811, a nonimmunosuppressive cyclosporin A analog with activity against human immunodeficiency virus (HIV) type 1: interference with HIV protein-cyclophilin A interactions., in: Journal of virology Nr. 69
- Akagi, H./Reynolds, A./Hjelm, M.* (1991): Cyclosporin A and its metabolites, distribution in blood and tissues, in: The Journal of international medical research 19 (1991), S. 1–18, <https://doi.org/10.1177/030006059101900101>
- An, Ping u. a.* (2007): Regulatory polymorphisms in the cyclophilin A gene, PPIA, accelerate progression to AIDS, in: PLoS pathogens 3 (2007), e88, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030088>
- Arora, Kamalpreet u. a.* (2005): Extracellular Cyclophilins Contribute to the Regulation of Inflammatory Responses<sup>1</sup>, in: Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) 175 (2005), S. 517–522
- Balsley, Molly A. u. a.* (2010): A cell-impermeable cyclosporine A derivative reduces pathology in a mouse model of allergic lung inflammation, in: Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) 185 (2010), S. 7663–7670, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001707>
- Billich, A. u. a.* (1997): Presence of cyclophilin A in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis, in: The Journal of experimental medicine 185 (1997), S. 975–980, <https://doi.org/10.1084/jem.185.5.975>
- Brenner, Sydney/Miller, Jeffrey H.* (Hrsg.) (2001): Encyclopedia of genetics, San Diego, Calif./London: Academic, 2001
- Budowle, Bruce/Schutzer, Steven E./Breeze, Roger G.* (Hrsg.) (2011): Microbial Forensics, 2. Aufl., Amsterdam/Boston: Elsevier/Acad. Press, 2011
- Butler, John Marshall* (Hrsg.) (2012): Advanced topics in forensic DNA typing: Methodology, San Diego, CA: Elsevier Academic Press, 2012
- Cambien, François* (2005): Coronary heart disease and polymorphisms in genes affecting lipid metabolism and inflammation, in: Current atherosclerosis reports 7 (2005), S. 188–195
- Carbajo-Lozoya, Javier u. a.* (2014): Human coronavirus NL63 replication is cyclophilin A-dependent and inhibited by non-immunosuppressive cyclosporine A-derivatives including Alisporivir, in: Virus Research 184 (2014), S. 44–53, <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.02.010>
- Ch. Parry* (1799): An inquiry into the symptoms and causes of the syncope anginosa, commonly called angina pectoris.: Cruttwell, 1799
- Colgan, John u. a.* (2004): Cyclophilin A Regulates TCR Signal Strength in CD4+ T Cells via a Proline-Directed Conformational Switch in I $\kappa$ k, in: Immunity 21 (2004), S. 189–201, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.07.005>
- Colgan, John u. a.* (2005): Cyclophilin A-deficient mice are resistant to immunosuppression by cyclosporine, in: Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) 174 (2005), S. 6030–6038, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.10.6030>

- Diana Faulds, Karen L. Goa, Paul Benfield* (2012): Cyclosporin: A Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Use in Immunoregulatory Disorders, <<https://link.springer.com/article/10.2165%2F00003495-199345060-00007>> [Zugriff 2019-06-17]
- (2002): Directive 2001/20/EC of the European Parliament and of the Council of 4 April 2001 on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the member states relating to the implementation of good clinical practice in the conduct of clinical trials on medicinal products for human use, in: *Medicinska etika a bioetika : casopis Ustavu medicinskeje etiky a bioetiky = Medical ethics & bioethics : journal of the Institute of Medical Ethics & Bioethics* 9 (2002), S. 12–19
- Dornan, Jacqueline/Taylor, Paul/Walkinshaw, Malcolm* (2003): Structures of Immunophilins and their Ligand Complexes, in: *CTMC* 3 (2003), S. 1392–1409, <https://doi.org/10.2174/1568026033451899>
- Doyle, V./Virji, S./Crompton, M.* (1999): Evidence that cyclophilin-A protects cells against oxidative stress, in: *Biochemical Journal* 341 (1999), S. 127–132
- Dr. med. Madjid Salimi, Dr. med. Nawid Salimi, Benedikt Hochkirchen* (2019): *Enzyme und Biokatalyse*
- E. G. Nabel, E.A. Braunwald*: A Tale of Coronary Artery Disease and Myocardial Infarction., in: *N° Engl J Med Surg* 2012, 366: 54-63
- F. Unger* (2013a): *Herzerkrankungen und Interventionsmöglichkeiten*: Springer, 2013
- (2013b): *Herzerkrankungen und Interventionsmöglichkeiten*: Springer, 2013
- García-Castro, Mónica u. a.* (2003): Hypertrophic cardiomyopathy: low frequency of mutations in the beta-myosin heavy chain (MYH7) and cardiac troponin T (TNNT2) genes among Spanish patients, in: *Clinical chemistry* 49 (2003), S. 1279–1285
- Griendling, Kathy K./FitzGerald, Garret A.* (21.10.2003): Oxidative Stress and Cardiovascular Injury, <<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.CIR.0000093660.86242.BB>> [Zugriff 2018-10-18]
- Gwinn, William M. u. a.* (2006): Novel approach to inhibit asthma-mediated lung inflammation using anti-CD147 intervention, in: *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 177 (2006), S. 4870–4879, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.7.4870>
- Hahn, Thomas von u. a.* (2012): Hepatocytes That Express Variants of Cyclophilin A Are Resistant to HCV Infection and Replication, in: *Gastroenterology* 143 (2012), 439-447.e1, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.04.053>
- Hahn, Thomas von/Ciesek, Sandra* (2015): Cyclophilin polymorphism and virus infection, in: *Current Opinion in Virology* 14 (2015), S. 47–49, <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.07.012>
- Handschumacher, R. u. a.* (1984): Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A, in: *Science* 226 (1984), S. 544–547, <https://doi.org/10.1126/science.6238408>

- Heymans, S. u. a.* (1999): Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure, in: *Nature medicine* 5 (1999), S. 1135–1142, <https://doi.org/10.1038/13459>
- (2001): ICH harmonized tripartite guideline: Guideline for Good Clinical Practice, in: *Journal of postgraduate medicine* 47 (2001), S. 45–50
- J. Warren*: Remarks on angina pectoris, in: *N° Engl J Med Surg*
- JA McWilliam* (1889): Cardiac failure and sudden death, in: *BMJ* (1889), 1:6-8
- JB Herrick* (1919): Thrombosis of the coronary arteries, in: *JAMA°* (1919), 72: 387-390
- Jin, Z. G. u. a.* (2000): Cyclophilin A is a secreted growth factor induced by oxidative stress, in: *Circulation research* 87 (2000), S. 789–796, <https://doi.org/10.1161/01.res.87.9.789>
- Jin, Zheng-Gen u. a.* (27.10.2000): Cyclophilin A Is a Secreted Growth Factor Induced by Oxidative Stress, <<https://www.ahajournals.org/doi/full/10.1161/01.RES.87.9.789>> [Zugriff 2018-10-15]
- Jordan W Smoller (lead), Nicholas Craddock, Kenneth Kendler, Phil Hyoun Lee, Benjamin M Neale, John I Nurnberger, Stephan Ripke, Susan Santangelo, Patrick F Sullivan* (2013): Identification of risk loci with shared effects on five major psychiatric disorders: a genome-wide analysis, in: *The Lancet* 381 (2013), S. 1371–1379, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)62129-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)62129-1)
- K.-H. Huhnstock, W. Kutscha, H. Dehmel* (Hrsg.) (2013): *Diagnose und Therapie in der Praxis*: Springer, 2013
- Kim, Se-Hwa u. a.* (2004): Cyclophilin A as a Novel Biphasic Mediator of Endothelial Activation and Dysfunction, in: *The American Journal of Pathology* 164 (2004), S. 1567–1574
- KONG, H./WEST, S./AFRICA, S.* *Cardiovasc Res*, 1997, 35. Jg., S. 2-3. (1997): world medical association declaration of helsinki, *Cardiovasc Res*, <[https://scholar.google.de/scholar?hl=de&as\\_sdt=0%2C5&q=world+medical+association+declaration+of+helsinki%2C+recommendations&btnG=>](https://scholar.google.de/scholar?hl=de&as_sdt=0%2C5&q=world+medical+association+declaration+of+helsinki%2C+recommendations&btnG=>)> [Zugriff 2019-07-24]
- Lang, Kurt/Schmid, Franz X./Fischer, Gunter* (1987): Catalysis of protein folding by prolyl isomerase, in: *Nature* 329 (1987), 268 EP -, <https://doi.org/10.1038/329268a0>
- Liu, Jun u. a.* (1991): Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes, in: *Cell* 66 (1991), S. 807–815, [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90124-H](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90124-H)
- Matsumura, Shin-ichiro u. a.* (2005): Targeted deletion or pharmacological inhibition of MMP-2 prevents cardiac rupture after myocardial infarction in mice, in: *The Journal of clinical investigation* 115 (2005), S. 599–609, <https://doi.org/10.1172/JCI22304>
- Mehran, Roxana u. a.* (2011): Standardized bleeding definitions for cardiovascular clinical trials: a consensus report from the Bleeding Academic Research Consortium, in: *Circulation* 123 (2011), S. 2736–2747, <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.009449>

- Moritz Ritter*: Aufbau von DNA und RNA, <[https://www.google.com/search?q=replikation%2C+translation%2C+transkription&rlz=1C1CHBF\\_deDE766DE766&oq=replikation%2C+translation%2C+transkription&aqs=chrome.69i57j69i60j0l4.1000j0j4&sourceid=chrome&ie=UTF-8](https://www.google.com/search?q=replikation%2C+translation%2C+transkription&rlz=1C1CHBF_deDE766DE766&oq=replikation%2C+translation%2C+transkription&aqs=chrome.69i57j69i60j0l4.1000j0j4&sourceid=chrome&ie=UTF-8)> [Zugriff 2019-06-14]
- Murphy M, Brown G, Wallin C, et al.* (2006 sep 13 (Updated 2019 Mar 4)): Gene Help: Integrated Access to Genes of Genomes in the Reference Sequence Collection, <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3841/>>
- Nigro, P./Pompilio, G./Capogrossi, M. C.* (31.10.2013): Cyclophilin A: a key player for human disease, <<https://www.nature.com/articles/cddis2013410>> [Zugriff 2018-10-15]
- Nigro, Patrizia u. a.* (2011): Cyclophilin A is an inflammatory mediator that promotes atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice, in: *The Journal of experimental medicine* 208 (2011), S. 53–66, <https://doi.org/10.1084/jem.20101174>
- Oliver Kohlhaas* (2018): Bio einfach erklärt [Zugriff 2019-11-14]
- Palacín, M. u. a.* (2008): A search for cyclophilin-A gene (PPIA) variation and its contribution to the risk of atherosclerosis and myocardial infarction, in: *International journal of immunogenetics* 35 (2008), S. 159–164, <https://doi.org/10.1111/j.1744-313X.2008.00755.x>
- Ramírez-Bello, Julián u. a.* (2013): Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas (Single nucleotide polymorphisms (SNPs): functional implications of regulatory-SNP (rSNP) and structural RNA (srSNPs) in complex diseases, spa), in: *Gaceta medica de Mexico* 149 (2013), S. 220–228
- Ramírez-Bello, Julián/Jiménez-Morales, Mayra* (2017): Implicaciones funcionales de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en genes codificantes de proteínas y no codificantes en enfermedades multifactoriales (Functional implications of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in protein-coding and non-coding RNA genes in multifactorial diseases, spa), in: *Gaceta medica de Mexico* 153 (2017), S. 238–250
- Robert Koch Institut* (2015): Gesundheitsberichterstattung des Bundes: gemeinsam getragen RKI und DESTATIS Gesundheit in Deutschland
- Rodríguez, Isabel u. a.* (2007): Role of the CDKN1A/p21, CDKN1C/p57, and CDKN2A/p16 genes in the risk of atherosclerosis and myocardial infarction, in: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 6 (2007), S. 620–625, <https://doi.org/10.4161/cc.6.5.3927>
- Sacco, R. L., Kasner, S. E., Broderick, J. P., Caplan, L. R., Connors, J. J., Culebras, A., ... & Hoh, B. L.*: American Heart Association Stroke Council, Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; Council on Cardiovascular Radiology and Intervention; Council on Cardiovascular and Stroke Nursing; Council on Epidemiology and Prevention; Council on Peripheral Vascular Disease; Council on Nutrition, Physical Activity and Metabolism. An updated definition of stroke for the 21st century: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, <<https://scholar.google.de/scholar?cluster=>



- 15401424266112207881&hl=de&as\_sdt=2005&scioldt=0,5> [Zugriff 2019-07-24]
- Sadee, W. u. a. (2011): Pharmacogenomics of the RNA world: structural RNA polymorphisms in drug therapy, in: *Clinical pharmacology and therapeutics* 89 (2011), S. 355–365, <https://doi.org/10.1038/clpt.2010.314>
- Satoh, Kimio u. a. (01.05.2011): Cyclophilin A Promotes Cardiac Hypertrophy in Apolipoprotein E–Deficient Mice, <<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/ATVBAHA.110.214601>> [Zugriff 2018-10-18]
- Satoh, Kimio/Nigro, Patrizia/Berk, Bradford C. (2010): Oxidative stress and vascular smooth muscle cell growth: a mechanistic linkage by cyclophilin A, in: *Antioxidants & redox signaling* 12 (2010), S. 675–682, <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2875>
- Schütz, Bettina (10.04.2018): Erregeridentifizierung: MALDI-TOF Massenspektrometrie [Zugriff 09.09.19, 15:11]
- Seizer, Peter u. a. (2010): EMMPRIN and its ligand cyclophilin A regulate MT1-MMP, MMP-9 and M-CSF during foam cell formation, in: *Atherosclerosis* 209 (2010), S. 51–57, <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2009.08.029>
- Seizer, Peter u. a. (01.06.2011): Disrupting the EMMPRIN (CD147)–Cyclophilin A Interaction Reduces Infarct Size and Preserves Systolic Function After Myocardial Ischemia and Reperfusion, <<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/ATVBAHA.111.225771>> [Zugriff 2018-10-18]
- Seko, Yoshinori u. a. (2004): Hypoxia followed by reoxygenation induces secretion of cyclophilin A from cultured rat cardiac myocytes, in: *Biochemical and biophysical research communications* 317 (2004), S. 162–168, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.03.021>
- Sherry, B. u. a. (1992): Identification of cyclophilin as a proinflammatory secretory product of lipopolysaccharide-activated macrophages, in: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89 (1992), S. 3511–3515, <https://doi.org/10.1073/pnas.89.8.3511>
- Silbernagl, Stefan/Despopoulos, Agamemnon/Draguhn, Andreas (2018): *Taschenatlas Physiologie*, 9. Aufl., Stuttgart/New York: Georg Thieme Verlag, 2018
- Squire, Larry R. (Hrsg.) (2009): *Encyclopedia of neuroscience*, London: Academic Elsevier, 2009
- Stemmy, Erik J. u. a. (2011): Extracellular cyclophilin levels associate with parameters of asthma in phenotypic clusters, in: *The Journal of asthma : official journal of the Association for the Care of Asthma* 48 (2011), S. 986–993, <https://doi.org/10.3109/02770903.2011.623334>
- Suzuki, Jun u. a. (31.03.2006): Cyclophilin A Is Secreted by a Vesicular Pathway in Vascular Smooth Muscle Cells, <<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.RES.0000216405.85080.a6>> [Zugriff 2018-10-15]
- Tang, Fu-Cai u. a. (2017): Simvastatin attenuated rat thoracic aorta remodeling by decreasing ROCK2-mediated CyPA secretion and CD147-ERK1/2-cyclin pathway, in: *Molecular medicine reports* 16 (2017), S. 8123–8129, <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7640>
- Tegeger, I. u. a. (1997): Elevated Serum Cyclophilin Levels in Patients with Severe Sepsis, in: *Journal of Clinical Immunology* 17 (1997), S. 380–386, <https://doi.org/10.1023/A:1027364207544>

- Thomas, Mark R./Lip, Gregory Y. H.* (2017): Novel Risk Markers and Risk Assessments for Cardiovascular Disease, in: *Circulation research* 120 (2017), S. 133–149, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309955>
- Topol, Eric J. u. a.* (2006): Genetic susceptibility to myocardial infarction and coronary artery disease, in: *Human molecular genetics* 15 Spec No 2 (2006), R117-23, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl183>
- Twyman, R. M.* (2009): Single-Nucleotide Polymorphism (SNP) Analysis, in: *Larry R. Squire* (Hrsg.), *Encyclopedia of neuroscience*, 2009, S. 871–875, <https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.00866-4>
- W. Linß, J. Fanghänel* (Hrsg.) (1999): *Histologie: Zytologie, allgemeine Histologie, Mikroskopische Anatomie: Walter de Gruyter*, 1999
- Wang, Ping/Heitman, Joseph* (2005): The cyclophilins, in: *Genome biology* 6 (2005), S. 226, <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-7-226>
- Wang, Qing* (2005): Advances in the Genetic Basis of Coronary Artery Disease, in: *Current atherosclerosis reports* 7 (2005), S. 235–241
- WT Porter* (1893): On the results of ligation of the coronary arteries, in: *J° Physiol°* (1893), 15: 121
- Xu, Q. u. a.* (1992): Leukocyte chemotactic activity of cyclophilin, in: *The Journal of biological chemistry* 267 (1992), S. 11968–11971
- Yang, Hui u. a.* (2005): Effects of cyclophilin A on cell proliferation and gene expressions in human vascular smooth muscle cells and endothelial cells, in: *The Journal of surgical research* 123 (2005), S. 312–319, <https://doi.org/10.1016/j.jss.2004.08.026>
- Yarbrough, William M. u. a.* (2003): Selective targeting and timing of matrix metalloproteinase inhibition in post-myocardial infarction remodeling, in: *Circulation* 108 (2003), S. 1753–1759, <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000091087.78630.79>
- Yurchenko, Vyacheslav u. a.* (2002): Active site residues of cyclophilin A are crucial for its signaling activity via CD147, in: *The Journal of biological chemistry* 277 (2002), S. 22959–22965, <https://doi.org/10.1074/jbc.M201593200>
- Yurchenko, Vyacheslav/Constant, Stephanie/Bukrinsky, Michael* (2006): Dealing with the family: CD147 interactions with cyclophilins, in: *Immunology* 117 (2006), S. 301–309, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02316.x>

## 8. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen unter der Betreuung von Prof. Dr. med. Tobias Geisler durchgeführt.

*Studienkonzept und -design:*

Prof. Dr. med. Tobias Geisler, Dr. med. Dominik Rath, Katja Horstmann

*Akquise der Daten:*

Katja Horstmann, Mona Monzien

*Analyse und Interpretation der Daten:*

Katja Horstmann, Dr. med. Dominik Rath

*Abfassung des Manuskripts:*

Dominik Rath, Saskia von Ungern-Sternberg, David Heinzmann, Manuel Sigle, Mona Monzien, Katja Horstmann, Elke Schaeffeler, Stefan Winter, Karin Müller, Patrick Grogga-Bada, Monika Zdanyte, Oliver Borst, Alma Zerneck, Meinrad Gawaz, Peter Martus, Matthias Schwab, Tobias Geisler, Peter Seizer

*Betreuer:*

Dr. med. Dominik Rath

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

Tübingen, den 09.10.2020