

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
I. MEDIZINISCHE KLINIK UND POLIKLINIK
DEUTSCHES HERZZENTRUM MÜNCHEN
DES FREISTAATES BAYERN
(DIREKTOR: UNIV.-PROF. DR. A. SCHÖMIG)

Der Einfluss von TF-Genpolymorphismen PstI und MspI auf den klinischen und angiographischen Verlauf nach koronarer Stentimplantation

Anna Maria Tsotsoglou-Malowaniec

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender : Univ.-Prof. Dr. E.J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. I.V. Ott

2. Univ.-Prof.Dr. St. Massberg

Die Dissertation wurde am 05.04.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 07.03.2012 angenommen.

MEINER FAMILIE GEWIDMET

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

°C	Grad celsius
µl	Mikro Liter
µM	Mikro Mol
ACC	American College of Cardiology
ACE	Angiotensin converting enzyme
ACVB	Aortokoronarer venenbypass
AHA	American heart association
APC	Aktiviertes protein c
BMS	Bare metal stents
Bp	Basenpaare
DES	Drug eluting stents
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
EMBL	European molecular biology laboratory
FGF	Fibroblast growth factor
HDL	High density lipoprotein
kBp	Kilo Basenpaare
kDa	Kilo Dalton
KHK	Koronare Herzerkrankung
LAD	Left anterior descendens (Ramus interventricularis anterior)
LCx	Left circumflex (Ramus circumflexus)
LDL	Low density lipoprotein
MACE	Major adverse cardiac events
MI	Myokardinfarkt
MLD	Medial lumen diameter

mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
nM	Nano Mol
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGF	Platelet-derived growth factor
PTCA	Perkutane transluminale koronare Angioplastie
RCA	Right coronary artery
rTFPI	Rekombinanter TF-pathway inhibitor
SNP	Single nucleotide polymorphism
TF	Tissue factor
TGF	Transforming growth factor
TLR	Target lesion revascularisation

INHALTSVERZEICHNIS

WIDMUNG.....	1
INHALTSVERZEICHNIS.....	2
VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN.....	3
1 EINLEITUNG.....	7
1.1 KORONARE HERZERKRANKUNG.....	7
1.2 ÄTIOLOGIE.....	7
1.3 THERAPIE.....	8
1.4 RESTENOSE UND NEOINTIMAPROLIFERATION.....	9
1.5 TISSUE FACTOR.....	10
2 ZIELSETZUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT.....	12
3 PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN.....	13
3.1 PATIENTENKOLLEKTIV.....	13
3.2 STUDIENENDPUNKTE.....	14
3.3 DEFINITIONEN.....	14
3.4 DNA – ISOLIERUNG.....	15
3.5 DIE GENOTYPBESTIMMUNG.....	15
3.5.1 Genotypbestimmung mit dem TaqMan-Verfahren.....	16
3.5.2 Genotypbestimmung mittels Restriktionsenzymen.....	20
3.6 STATISTIK.....	23
3.7 GERÄTE UND MATERIALIEN.....	24
4 ERGEBNISSE.....	27
4.1 GENOTYPVERTEILUNG.....	27
4.1.1 Klinische Charakteristika bezogen auf den PstI-Genotyp.....	28

4.1.2	<i>Klinische Charakteristika bezogen auf die Mspl-Genotypen</i>	30
4.2	LÄSIONSBEOGENE UND INTERVENTIONELLE CHARAKTERISTIKA	32
4.2.1	<i>Läsions- und interventionelle Charakteristika bezogen auf die Pstl- Genotypen</i>	32
4.2.2	<i>Läsions- und interventionelle Charakteristika bezogen auf die Mspl- Genotypen</i>	34
4.3	KLINISCHES UND ANGIOGRAPHISCHES ERGEBNIS NACH DER STENTIMPLANTATION	37
4.3.1	<i>Klinisches 30-Tage-Ergebnis bezogen auf die Pstl-Genotypen</i>	37
4.3.2	<i>Klinisches 30-Tage-Ergebnis bezogen auf die Mspl-Genotypen</i>	39
4.3.3	<i>Angiographisches Ergebnis 6 Monate nach der Stentimplantation bezogen auf die Pstl- Genotypen</i>	40
4.3.4	<i>Angiographisches Ergebnis 6 Monate nach der Stentimplantation bezogen auf die Mspl- Genotypen</i>	41
4.3.5	<i>Ergebnisse 1 Jahr nach der Stentimplantation bezogen auf die Genotypen beider Polymorphismen</i>	42
5	DISKUSSION	45
5.1	DIE ROLLE DES TISSUE FACTOR BEI DER AUSBILDUNG EINER RESTENOSE	46
5.2	POLYMORPHISMEN UND IHRE BEDEUTUNG FÜR DIE AUSBILDUNG EINER RESTENOSE	50
5.3	BEDEUTUNG DER ERGEBNISSE	53
6	ZUSAMMENFASSUNG	56
7	LITERATURVERZEICHNIS	59
	DANKSAGUNG	70

1 Einleitung

1.1 Koronare Herzerkrankung

„Die koronare Herzerkrankung ist die Manifestation der Atherosklerose an den Herzkranzgefäßen, die entweder diffus oder isoliert befallen sein können. Die dadurch entstandene Verengung der Koronarien führt zu einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und –bedarf im Herzmuskel. Schweregrad und Dauer der hierdurch hervorgerufenen Ischämie bestimmen die Manifestation in Form von stabiler oder instabiler Angina pectoris, stummer Myokardischämie, ischämisch bedingter Herzinsuffizienz, Herzrhythmusstörungen und akutem Myokardinfarkt“ (Deutsche Gesellschaft für Kardiologie- Herz- u.Kreislaufforschung).

Weltweit ist die Koronare Herzerkrankung und ihre Folgen immer noch die häufigste Todesursache, so dass die Identifizierung und Behandlung der Risikofaktoren einen hohen Stellenwert hat (Farrall, M 2006).

1.2 Ätiologie

In der 1966 veröffentlichten Framingham-Studie, die einen großen Beitrag zum Verständnis der Pathogenese der koronaren Herzerkrankung(KHK) geleistet hat, wurden erstmals Risikofaktoren für die Entstehung der KHK beschrieben. Als sogenannte konventionelle Risikofaktoren zählen arterielle Hypertonie, Fettstoffwechsel-Störungen, dabei vor allem LDL-Cholesterin-Erhöhung und HDL-Cholesterin-Erniedrigung, Nikotinabusus und Diabetes mellitus, Alter und Adipositas (Grundy,S 1998, Dawber,TR 1966), die nicht selten

durch eine Änderung der Lebensgewohnheiten beeinflussbar sind. An neueren anderen Risikofaktoren werden Thrombophilie, Hyperhomocysteinämie, Infektionen, Lipoprotein(a)-Erhöhung und Familienangehörige I.Grades mit KHK oder Myokardinfarkt genannt (Lloyd-Jones,DM 2004, Grundy,S 1998). Der Einfluss dieser Risikofaktoren schwankt je nach Studie zwischen ungefähr 50% (Wilson,PW 1998) und 85% (Stamler,J 1986, Grundy,S 1998). Daneben spielen inflammatorische Prozesse (Libby,P 2002) und genetische Faktoren eine nicht unwesentliche Rolle (Lusis,AI 2004). Trotz großer Fortschritte in der Diagnostik und Therapie ist die koronare Herzerkrankung und ihre Folgen gegenwärtig die häufigste Todesursache in Deutschland wie auch in anderen westlichen Industrienationen. Obwohl die Mortalität der koronaren Herzkrankheit in Deutschland seit ca.1970 sinkt, steigt die Zahl der Patienten weiter an. Ähnliche Verhältnisse sind auch in anderen europäischen Ländern beobachtet worden (Sans,S 1995).

1.3 Therapie

Neben den bekannten konservativen und chirurgischen Behandlungsmethoden hat sich die Ballondilatation der Koronararterien mittels Katheter seit der erstmaligen Durchführung durch Andreas Grüntzig anno 1977 als sogenannte perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) (Gruentzig,A 1981) ermöglicht und durch die Einführung von über den Katheter eingebrachten Gefäßstützen (sog. Stents) erweiterte sich das Therapiespektrum (Sigwart,U 1987), so dass sich die PTCA nun ob mit oder ohne Stentimplantation als führendes Therapieverfahren etabliert hatte (Kastrati,A 2000). Ein Problem stellten die subakuten Gefäßthrombosen nach einer Koronarintervention dar, wobei hier die Komplikationsrate durch eine kombinierte antithrombozytäre Therapie gesenkt werden konnte (Gawaz,M 1996). Den Schwierigkeiten bei der Ballondilatation wie z.B. dem Auftreten von Dissektionen, die bis zum kompletten Verschluss des Gefäßes führen können, oder dem „elastic recoil“ direkt nach Dilatation, konnte meist erfolgreich mittels Stentimplantation entgegengewirkt werden (George,BS 1993, Schömig,A 1994). Die Stentimplantation

hat, verglichen mit der konventionellen PTCA, das Ergebnis der Patienten mit KHK verbessert. Der langfristige Vorteil dieses Verfahrens wird jedoch durch die Entstehung einer Restenose limitiert (Lincoff, A.M. 2000).

1.4 Restenose und Neointimaproliferation

Die Restenose ist charakterisiert durch die Bildung einer Neointima, die durch Einwanderung glatter Muskelzellen der Media in den Bereich der Intima proliferiert (Topol, E. 1998).

Während der Ballonaufdehnung oder einer Stentimplantation kommt es im Bereich der atherosklerotischen Plaque zu einer Verletzung der Gefäßwand und einem Aufbrechen der Plaque aufgrund meist mangelnder Dehnbarkeit, was Prozesse der Entzündung und Wundheilung in Gang setzt (Faxon, D.P. 1987). In der Regel kommt es im Verlauf zu einer kompletten Auskleidung des verletzten Gefäßes mit neuem Endothel (Grewe, P.H. 2001). Wenn dieser Prozess in überschießendem Maß verläuft, was in 20-50% der Fälle in den ersten sechs Monaten nach PTCA oder Stentimplantation der Fall ist, kommt es zur Ausbildung einer Restenose. Angiologisch ist diese definiert entweder als >50% Lumen-Verlust eines initial gewonnenen Lumendurchmessers oder eine Stenose $\geq 50\%$ (Levine, G.N. 1995). Je nach Ausmaß des Gefäßschadens scheint es zu einem mehr oder weniger grossen Maß an Thrombinbildung zu kommen. Die Exposition von Gerinnungsaktivatoren der Gefäßwand gegenüber zirkulierenden Gerinnungsfaktoren beschleunigt die Thrombusbildung, insbesondere nach Ausbildung einer Neointima (Moons, A.H.M. 2002). Das ist in sofern von klinischem Interesse, da es nach einer PTCA zur Ausbildung einer Neointima kommt und ein signifikant hoher Anteil der Patienten eines erneuten Eingriffs bedarf. Dieses Problem ist bislang zwar durch medikamentenbeschichtete Stents gemindert, je

doch immer noch nicht gelöst. Besonders nach Rapamycin-oder Paclitaxel-beschichteten Stents war eine Überexpression von TF-mRNA und TF-Aktivität in glatten Muskelzellen beobachtet worden, die für eine späte in-Stent-Thrombose verantwortlich sein könnte (Eisenreich,A. 2008).

1.5 Tissue factor

Tissue factor (TF), auch Gewebsthromboplastin genannt, ist ein 47 kDa Membran-gebundenes Glykoprotein, das sich aus einem extrazellulären, einem transmembranösen und einem kurzen intrazellulären Anteil zusammensetzt (Morrissey,J.H. 1987, Scarpati,E.M. 1987) und somit als oberflächengebundenes Glykoprotein keinen Kontakt zum Blutkreislauf hat. In gesunden Gefäßen wird TF überwiegend von Fibroblasten der gefäßumgebenden Adventitia und subendothelial von glatten Muskelzellen der Media hergestellt (Wilcox,J.N. 1989, Osterud,B. 1986) während es, getriggert durch bestimmte Entzündungsmediatoren, auch von Makrophagen und Endothelzellen exprimiert werden kann (Camerer,E. 1996). In arteriosklerotisch veränderten Gefäßen lässt sich TF sowohl in der Endothelzell- Schicht über der Plaque (Thiruvikraman,S.V. 1996) wie auch in den glatten Muskelzellen der Media und Intima sowie in Makrophagen nachweisen (Crawley,J. 2000). Desweiteren wurden deutliche Mengen an TF in der extrazellulären Matrix und dem nekrotischen Kern von fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques gefunden (Wilcox,J.N. 1989). Wenn TF in Kontakt mit Blut kommt wird die Gerinnungskaskade initialisiert, wobei TF durch allosterische Bindung an die Serin Protease Faktor VIIa dessen Aktivität erhöht und über limitierte Proteolyse die Faktoren IX und X aktiviert. Somit induziert TF indirekt die Entstehung von Thrombin (Edgington,T.S. 1997). Die TF-gesteuerte Thrombinbildung scheint eine führende Rolle in der Entstehung

einer Thrombose und möglicherweise auch Restenose nach einer perkutanen Koronarintervention zu spielen. Im Bestreben die Thrombinbildung kontrollieren zu können, war man auf der Suche nach dem Regulator-Gen, das die Genexpression von TF beeinflusst. Dabei haben (Mackman,N. 1989) den Aufbau des 12,4 kbp menschlichen TF Gens und seiner kompletten DNA-Sequenz ermittelt. Es besteht aus sechs Exons, die durch fünf Introns getrennt werden. Bei der Darstellung der kompletten TF-DNA fielen zum ersten Mal zwei, in Intron 5 gelegene, Polymorphismen auf, deren Rolle noch unklar ist (Mackman,N. 1989).

Mehrere Einzelnukleotidpolymorphismen wurden seither beschrieben, darunter die zuvor erwähnten MspI und PstI, sowie ein Polymorphismus mit einem Aminosäureaustausch von Valin 228 zu Alanin. Eine funktionelle Bedeutung wurde bisher nur für die -1208DI-, 1812CT- und 5466AG-Polymorphismen gezeigt. In klinischen Studien war der 5466AG-Polymorphismus mit einer erhöhten Mortalität bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom assoziiert. Aufgrund der zentralen Funktion von TF bei der Regulation der Hämostase und der nicht-hämostatischen Funktionen sowie auch der Nachweis von Assoziationen mit weiteren TF-Polymorphismen, liegt die Vermutung nahe, dass die noch nicht weiter untersuchten Polymorphismen MspI und PstI mit dem Risiko der Entwicklung einer Restenose nach Ballondilatation und Stentimplantation assoziiert sein könnten.

2 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, einen möglichen Zusammenhang zwischen den zuvor beschriebenen TF-Polymorphismen und der Restenose-Häufigkeit nach perkutaner transluminaler Koronarangioplastie mit Stentimplantation zu untersuchen. Unterschiede im angiographischen Langzeitergebnis sowie auch im klinischen Verlauf nach perkutaner koronarer Stentimplantation bei Trägern unterschiedlicher Allele der beiden TF-

Polymorphismen würden darauf hindeuten, dass ein Zusammenhang zwischen den Polymorphismen und der Entwicklung einer Restenose wahrscheinlich ist.

Hierzu wurden, nach entsprechender Fallzahlabeschätzung, konsekutiv 1850 kaukasische Patienten mit symptomatischer koronarer Herzerkrankung und koronarer Stentimplantation der TF-MspI-T/C- bzw. TF-PstI-G/A-Genotyp mittels Restriktionsenzymanalyse und dem TaqMan-Assay bestimmt und anschließend zusammen mit den anamnestischen, klinischen und angiographischen Daten einer statistischen Analyse unterworfen.

Insbesondere sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Gibt es einen Unterschied zwischen den Trägern unterschiedlicher Allele des PstI- bzw. MspI-Polymorphismus in der angiographischen Restenose nach koronarer Stentimplantation innerhalb eines Jahres?
- Zeigen Träger verschiedener Allele der TF-Polymorphismen MspI und PstI Unterschiede im klinischen Verlauf insbesondere in der Häufigkeit von Tod oder Myokardinfarkt?

3 Patienten, Material und Methoden

3.1 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv erstreckt sich auf 1850 kaukasische Patienten des Deutschen Herzzentrums München und der 1. Medizinischen Klinik, Krankenhaus Rechts der Isar, München, die aufgrund einer symptomatischen koronaren Herzerkrankung mittels einer Ballondilatation mit intrakoronarer Stentimplantation behandelt wurden. Bei 1556 Patienten (84%) erfolgte nach sechs Monaten eine Kontroll- Koronarangiographie, die restlichen Patienten waren inzwischen verstorben, hatten diesbezüglich Kontraindikationen oder haben den Eingriff abgelehnt. Alle Patienten erhielten nach Stent-Implantation *Aspirin* (100 mg, 2xtgl, auf unbestimmte Zeit) und *Ticlopidine* (250 mg, 2xtgl, für vier Wochen). Patienten mit einem höheren Risiko für in-stent-Thrombosen bekamen zusätzlich *Abciximab* als Bolusinjektion während der Stentimplantation und anschließend kontinuierlich per infusionem über 12 Stunden. Die Entscheidung darüber oblag dem Operateur. Für die vorliegende Studie wurden bei jedem Patienten 5ml EDTA- Blut entnommen und bei -20°C tiefgekühlt. Alle Patienten, die an der Studie teilgenommen hatten, waren zuvor ausführlich aufgeklärt worden und hatten eine schriftliche Einverständniserklärung zur Intervention, Kontroll-Koronarangiographie nach sechs Monaten und Genotypisierung unterzeichnet. Das Studienprotokoll entspricht der Deklaration von Helsinki und wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität München genehmigt.

3.2 Studienendpunkte

Primärer Endpunkt der Studie war das Auftreten einer angiographischen Restenose zum Zeitpunkt der geplanten Kontroll-Koronarangiographie sechs Monate nach erfolgter Stentimplantation.

Sekundärer Endpunkt der Studie waren die Kombination von Tod oder Myokardinfarkt innerhalb des Beobachtungszeitraums von einem Jahr.

3.3 Definitionen

Eine arterielle Hypertonie wurde dann diagnostiziert, wenn bei mindestens zwei Messungen die systolischen Blutdruckwerte über 140mmHg und/oder die diastolischen Blutdruckwerte über 90mmHg lagen (1). Als Diabetiker wurden Patienten, die insulinpflichtig waren oder orale Antidiabetika einnahmen bezeichnet, ebenso diätetisch behandelte Patienten, sofern diese erhöhte Nüchtern-Glucose-Werte in mindestens zwei Blutabnahmen und/oder einen pathologischen Glucosetoleranztest aufwiesen (2). Patienten, die während der letzten sechs Monate regelmäßig geraucht hatten, wurden als aktive Raucher bezeichnet. Hypercholesterinämie lag ab einer Gesamtcholesterinämie im Serum von über 240mg/dl zu Grunde gelegt. Ein Myokardinfarkt in der Vorgeschichte wurde anhand der charakteristischen Veränderungen im 12-Kanal-EKG diagnostiziert, Daten über eine evtl. koronare Bypassoperation wurden aus der Krankenakte des Patienten oder der Information des jeweiligen Hausarztes entnommen. Eine instabile Angina pectoris wurde definiert als Brustschmerz in Ruhe oder bei geringster körperlicher Aktivität sowie innerhalb des letzten Monats neu aufgetretene Brustschmerzen ohne Erhöhung der Creatinkinase (CK) im Labor oder Zeichen eines akuten Myokardinfarktes im 12-Kanal-EKG.

Ein akuter Myokardinfarkt wurde beim Auftreten einer neuen pathologischen Q-Welle im 12-Kanal-EKG (Q-Wave-MI) oder einem Anstieg der Creatinkinase-Werte inklusive zugehörigem MB-Isoenzym-Anteil auf einen über dreifachen Normwert (Non-Q-Wave-MI) diagnostiziert. Eine dringliche Revaskularisation des Zielgefäßes entweder mittels Ballondilatation oder durch koronare Bypassoperation erfolgte bei erneut aufgetretener Angina pectoris bzw. klinischem Nachweis einer Myokardischämie sowie angiographisch nachgewiesener Restenose im Interventionsbereich.

3.4 DNA – Isolierung

Die genomische DNA wurde mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Reagentien, sogenannten DNA-Präparationskits (QIAamp DNA Blood Kit (Qiagen); High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Applied Science)), aus Leukozyten des peripheren Blutes gewonnen. Die Lagerung der wässrigen DNA-Proben erfolgte bei -25°C. Für die hier vorliegende Studie wurden die bereits tiefgefrorenen Proben zur Verfügung gestellt.

3.5 Die Genotypbestimmung

Die beiden untersuchten Polymorphismen befinden sich im Intron 5` des TF-Gens und werden folgendermaßen bezeichnet:

SNP (single nucleotide polymorphism) 10622A/G (=PstI) und SNP 10822C/T (=MspI). PstI und MspI beziehen sich auf die gleichnamigen Restriktionsenzyme, die zur Genotypbestimmung eingesetzt werden können. Die Zahlenangaben beziehen sich auf die Positionen der SNPs in der Nukleotidsequenz des TF-Gens aus der EMBL- Datenbank („accession number“ J02846).

3.5.1 Genotypbestimmung mit dem TaqMan-Verfahren

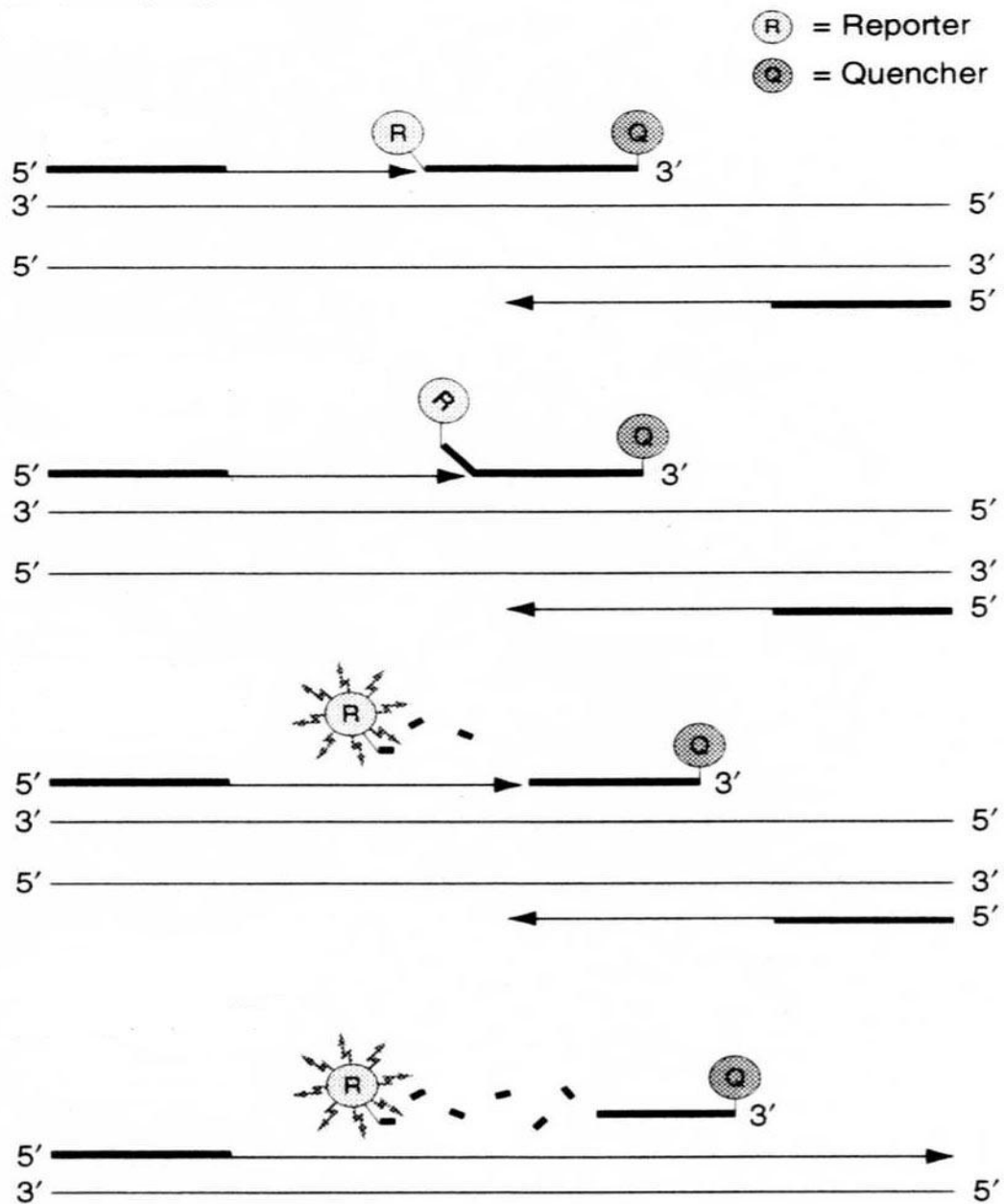
Die verwendete TaqMan-Methode zur Genotypisierung basiert auf dem Verfahren der Polymerase-Ketten-Reaktion („polymerase chain reaction“ - PCR) kombiniert mit dem 5'-Nuklease-Assay (Livak 1999). Mit Hilfe der PCR ist es möglich, einen bestimmten Abschnitt der DNA zu vervielfältigen (Amplifikation). Die PCR ist ein zyklisches Verfahren, bei dem nach jedem Zyklus die Anzahl der Moleküle eines definierten DNA-Abschnitts verdoppelt wird; somit kommt es zu einem exponentiellen Anstieg der DNA-Kopie. Weil jeder Zyklus eine Hitzedenaturierung enthält, wird eine thermostabile DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) verwendet. Für die Reaktion werden ein Primerpaar und zwei für die beiden Allele spezifische DNA-Sonden benötigt. DNA-Doppelstränge werden zunächst durch Erhitzen auf 95°C in Einzelstränge getrennt (Denaturierungsphase). Anschliessend wird die Temperatur auf 60°C abgesenkt, damit sich die zuvor zugegebenen Primer spezifisch an die Template-DNA anlagern können („Annealing“). Die Taq-Polymerase katalysiert die Verlängerung der Primer und ermöglicht somit die Synthese exakter Sequenzkopien. Die DNA-Sonden sind zum DNA-Abschnitt um die polymorphe Stelle einzelsträngige, komplementäre Oligonukleotide mit einer Länge von 22 bis 26 Nukleotiden. Sie werden mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, mit einem Reporterfarbstoff am 5'-Ende FAM (6-Carboxifluoreszein) oder mit VIC (Fluoreszenzfarbstoff der Firma Applied Biosystems, Darmstadt) sowie mit einem Quencher-(Q)Farbstoff TAMRA (6-Carboxitetramethylrhodamin) am 3'-Ende. Zwei spezifische Reporter-(R)Farbstoffe markieren die beiden allelspezifischen Sonden. Solange die Sonde intakt ist, unterdrückt die räumliche Nähe des Quencher-Farbstoffs (Q) zum Reporter-Farbstoff (R) die Fluoreszenz des R-Farbstoffs weitgehend. Die Taq-Polymerase besitzt eine 5'→3'-Exonuklease-aktivität, die eine während der PCR an den DNA-Strang hybridisierte komplementäre Sonde hydrolysiert. Durch die enzymatische Zerstörung der

fluorogenen Sondenmoleküle kommt es zur räumlichen Trennung des Q- und R-Farbstoffs und damit zu einer für die Messung entscheidenden Erhöhung der Fluoreszenzintensität des R-Farbstoffs (ABBILDUNG 1). Ein Anstieg des Fluoreszenzsignals nur eines Fluoreszenzfarbstoffes (FAM oder VIC) ist charakteristisch für die homozygoten Genotypen, ein Anstieg der Fluoreszenzsignale beider Farbstoffe ist kennzeichnend für den heterozygoten Genotyp.

In Abhängigkeit vom Fluoreszenzsignal führt die „Gene detection software“ des „ABI Prism 7700 Sequence Detection System“ automatisch eine Zuordnung des Genotyps zu einzelnen DNA-Proben und damit den Patienten durch. Zur Verarbeitung der Fluoreszenzsignale benötigt die „software“ den Einsatz von Standardproben, die die homozygoten Genotypen repräsentieren. Die Sequenzen der Primer und Sonden wurden mit Hilfe der Primer Express Software (Version 2.0.0; Applied Biosystems) im DHM bestimmt und anschließend von Applied Biosystems synthetisiert.

Abbildung1: Polymerisation

Schematische Darstellung des TaqMan-Verfahrens nach einer Abbildung im Protokoll für „TaqMan Universal PCR Master Mix“ (Applied Biosystems).



3.5.1.1 Primer- und Sondenkonzentrationen für die TaqMan- Reaktionen

Tabelle 1: Primersequenzen und Nukleotidsequenzen der Sonden für Amplifikation der polymorphen Sequenzen des TF-Gens

Polymorphismus	Primer und Sonden*
SNP 10622A/G (PstI)	Primer
	Primer TF101: 5' CACAGATTTCCCTGGGCATTT 3'
	Primer TF102: 5' CCCACAGTGGGTACTCACGAAT 3'
	TaqMan-Sonden
	FAM-TF100(A-Allel): 5' TGGACCAGCTGCA <u>A</u> CAGGACACA 3'
	VIC-TF100(G-Allel): 5' TGGACCAGCTGCAG <u>C</u> CAGGACAC 3'
SNP 10822C/T (MspI)	Primer
	Primer-TF111: 5' GGCGGACACGTGTGTGTACA 3'
	Primer-TF112: 5' TTGCAGCTTCCTGCAAGAGTCT 3'
	TaqMan- Sonden
	FAM-TF110 (G-Allel; komplementär zu C ^{**}): 5' CCCACAGCACTTCC <u>G</u> TTAGGGA 3'
	VIC-TF110 (A-Allel; komplementär zu T ^{**}): 5' CCCACAGCACTTCC <u>A</u> GTTAGGGACTG 3'

*FAM (6-Carboxifluoreszein) und VIC Fluoreszenzfarbstoffe der Firma Applied Biosystems

Die allelspezifischen Nukleotide sind unterstrichen.

**Die Sonden entsprechen der Sequenz des Gegenstrangs (G/A statt C/T). Die Sonden wurden so gewählt, dass die Sequenz nicht mehr G als C enthält (eine TaqMan-Regel).

Für die Genotypisierung mit Restriktionsenzymen wurden die Primer TF33 und TF53 verwendet. Mit diesem Primerpaar entsteht in der PCR ein Produkt der Länge 1430 bp. Durch das Schneiden des 1430-bp-Produkts mit PstI (Erkennungssequenz: 5'-CTGCAG-3') entstehen daraus entsprechend dem Genotyp charakteristische Fragmentmuster. Das A- und G-Allel des PstI-Polymorphismus sind durch die folgenden Fragmentlängen gekennzeichnet:

-Allel A (PstI schneidet an der polymorphen Stelle (5'-CTGCAA-3') nicht): 1213bp, 217bp

-Allel G (PstI schneidet an der polymorphen Stelle (5'-CTGCAA-3')): 793bp, 420bp, 217bp

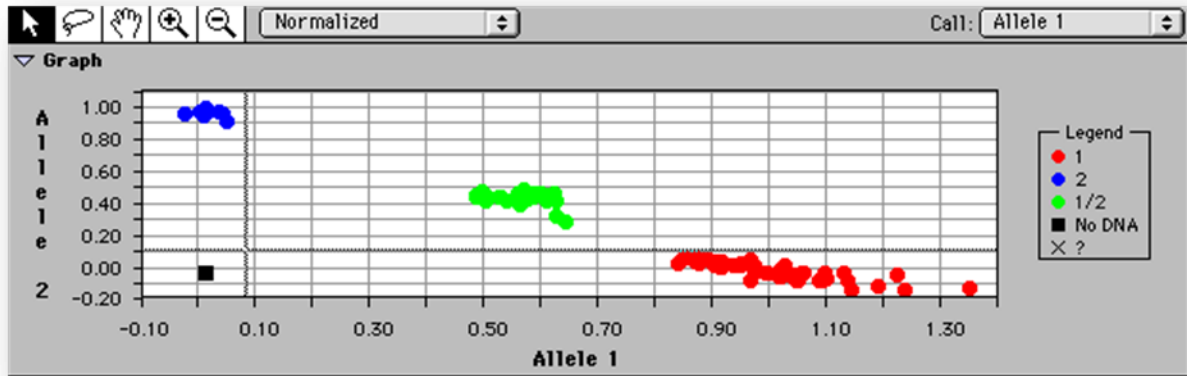
Aus dem gleichen 1430-bp-Produkt entstehen durch das Schneiden mit MspI (Erkennungssequenz: 5'-CCGG-3') je nach Allel die folgenden Fragmente:

-Allel C (MspI schneidet an der polymorphen Stelle (5'-CCGG-3')): 627bp, 472bp, 220bp, 92bp, 19bp

-Allel T (MspI schneidet an der polymorphen Stelle (5'-CCGG-3') nicht): 847bp, 472bp, 92bp, 19bp

Abbildung 2: Screenshots der TaqMan-Läufe für die PstI-/MspI-Genotypen

MspI

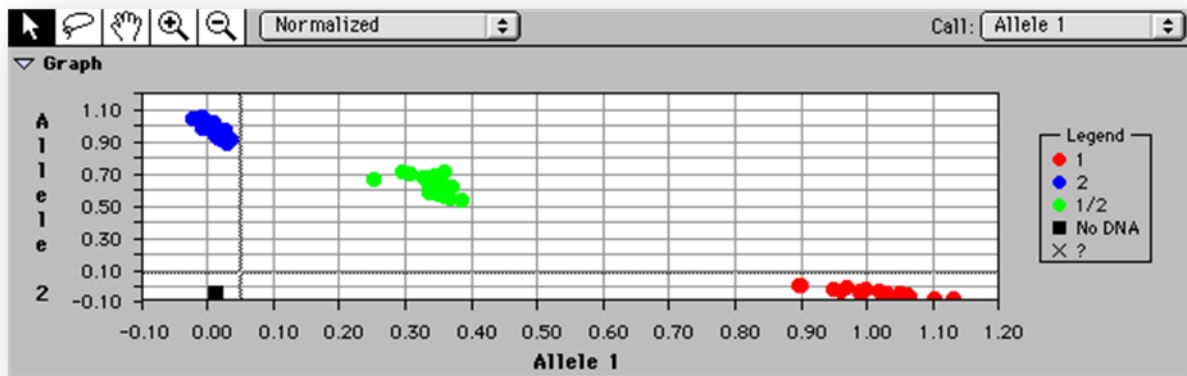


TT

CT

CC

PstI



GG

AG

GG

Darstellung zweier Screen shots, mit typischen Ergebnissen zweier TaqMan-Proben, so wie sie auf dem ABI PRISM 7700 Sequence Detection System nach Abschluß eines Durchlaufs erscheinen. Das Schaubild zeigt automatisch errechnete Auslesungen der 96-Loch Mikrotiter Platten, von denen jede zu Beginn des Experiments mit 72 DNA-Proben unbekanntem Genotyps, als Standards 8 Proben ohne DNA, weitere 8 Proben mit Matrizen-DNA homozygot für Allel 1 und 8 Proben mit Matrizen-DNA homozygot für Allel 2.

3.6 Statistik

Diskrete Variablen wurden als Zahl oder Prozentanteil angegeben und mittels „Chi-Quadrat-Test“ oder „Fisher exact test“ verglichen. Kontinuierliche Variablen wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben und mit dem nicht gepaarten, zweiseitigen t-Test oder einer Varianzanalyse für mehr als zwei Gruppen verglichen. Für die Risikoanalyse wurde jeweils die Odds Ratio und das 95%-Konfidenzintervall berechnet. Um feststellen zu können, ob eine Assoziation zwischen den Polymorphismen MspI bzw. PstI und einer angiographisch definierten Restenose nach perkutaner Koronarangioplastie auch unabhängig von anderen Faktoren bestand, wurden bei der multivariaten Analyse folgende Faktoren, die einen Einfluss haben könnten, berücksichtigt: Alter, Geschlecht, arterielle Hypertonie, aktives Rauchen, Hypercholesterinämie, akuter Myokardinfarkt, instabile angina pectoris, Myokardinfarkt in der Vorgeschichte, koronare Bypassoperation in der Vorgeschichte, Mehrgefässerkrankung, linksventrikuläre Ejektionsfraktion, betroffenes Herzkranzgefäss, Komplexität der Läsion, restenotische Läsion, chronischer Gefäßverschluss, Referenzdurchmesser, Länge der Läsion, Durchmesser der Stenose vor und Art der Intervention. Zusätzlich wurde der Stent-Typ als mögliche Störgröße mit einbezogen.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm S-Plus, Version 4.0 Professional (Mathsoft Inc., Seattle, Washington USA). Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert von $< 0,05$ gewertet.

3.7 Geräte und Materialien

Geräte

PCR:

Primus 96 plus	MWG Biotech, Ebersberg
GeneAmp PCR System 9600	Applied Biosystems
GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems
ABI Prism 7700 Sequence Detection System	Applied Biosystems

Zentrifugen:

Zentrifuge CR312	Jouan, St.Herblain, Frankreich
Tischzentrifuge A 14	Jouan

Mixer:

Vortex-Genie 2	Scientific Industries
----------------	-----------------------

Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterial

DNA-Isolierung:

QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
High Pure PCR Template Preparation Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

PCR-Reaktionslösung:

TaqMan Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems
---------------------------------	--------------------

Sonden:

Sonde FAM

Applied Biosystems

Sonde VIC

Applied Biosystems

PCR-Gefäße:

MicroAMP Optical Reaction Plate 96-Well

Applied Biosystems

Optical Adhesive Covers

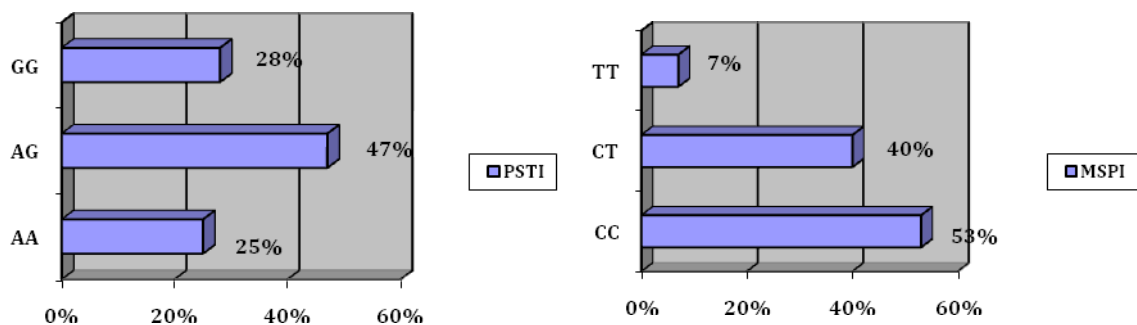
Applied Biosystems

4 Ergebnisse

4.1 Genotypverteilung

Bei den 1850 untersuchten Patienten wurde folgende Genotypverteilung mittels TaqMan-Methode festgestellt: der PstI-Polymorphismus wurde der AA-Genotyp bei 464 Patienten (25,0%), der AG-Genotyp bei 873 (47,0%) und der GG-Genotyp bei 513 Patienten (28,0%) nachgewiesen. Der MspI-Polymorphismus zeigte den CC-Genotyp bei 988 Patienten (53,4%), den CT-Genotyp bei 740 (40,0%) und den TT-Genotyp bei 122 Patienten (6,6%). Bezüglich der klinischen Charakteristika wiesen die unterschiedlichen Genotypen beider Polymorphismen (AA, AG und GG bzw. CC, CT und TT) keine signifikanten Unterschiede auf. Die Daten sind in Abbildung 3 aufgeführt.

Abbildung 3: Genotypverteilung der beiden Polymorphismen



Anhand der Genotypverteilung kann man sagen, dass man bei einer so gering ausgeprägten allelischen Kopplung davon ausgehen kann, dass beide Polymorphismen unabhängig voneinander vererbt werden.

4.1.1 Klinische Charakteristika bezogen auf den PstI-Genotyp

Die auf die verschiedenen Genotypen des PstI-Polymorphismus bezogenen Daten sind in der Tabelle 3 zusammengefasst. Das mittlere Alter der Patienten ($63,2 \pm 9,8$ für AA, $62,8 \pm 10,5$ für AG und $63,1 \pm 9,6$ für GG), der Anteil an Frauen (19,2% für AA, 21,9% für AG und 21,6% für GG; $p=0,49$), an Patienten mit arterieller Hypertonie (68,8% für AA, 66,3% für AG und 70,4% für GG; $p=0,28$), an Patienten mit Diabetes mellitus (18,5% für AA, 21,1% für AG und 23,0% für GG; $p=0,23$), an aktiven Rauchern (32,3% für AA, 30,5% für AG und 30,0% für GG; $p=0,71$) war zwischen den drei Genotypen gleich verteilt. Einzig für Patienten mit Hypercholesterinämie (39,9% für AA, 41,9% für AG und 47,0% für GG; $p=0,06$) ergab sich ein Trend dahingehend, dass mit steigender Anzahl der G-Allele auch die Anzahl der Patienten mit Hypercholesterinämie zunahm. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich kardialer Vorerkrankungen. Der Anteil der Patienten mit Myokardinfarkt in der Vorgeschichte betrug 26,9% beim AA-Genotyp, 27,0% beim AG-Genotyp und 26,3% beim GG-Genotyp ($p=0,96$), bei Patienten mit einer Bypass-Operation in der Vorgeschichte (10,8% für AA, 12,5% für AG und 9,0% für GG; $p=0,13$), bei Patienten mit einer reduzierten linksventrikulären Funktion (26,7% für AA, 30,1% für AG und 30,6% für GG; $p=0,34$), mit instabiler Angina pectoris (26,3% für AA, 27,4% für AG und 30,0% für GG; $p=0,39$), akutem Myokardinfarkt (19,6% für AA, 19,9% für AG und 21,4% für GG; $p=0,73$) und einer Mehrgefäßerkrankung (73,7% für AA, 71,4% für AG und 70,8% für GG; $p=0,55$) war unter den drei Genotypen gleich verteilt. Ebenso gab es keinen signifikanten Unterschied bei der Häufigkeitsverteilung mit Reopro® (19,4% für AA, 20,4% für AG und 18,7% für GG; $p=0,73$) vorbehandelten Patienten.

Tabelle 3: Klinische Charakteristika der Patienten bezogen auf die PstI-Genotypen

	PstI AA n=464	PstI AG n=876	PstI GG n=513	P
Alter (J)	63,2	62,8	63,1	
Frauen	89 (19,2)	191 (21,9)	111 (21,6)	0,49
Arterielle Hypertonie	319 (68,8)	579 (66,3)	361 (70,4)	0,28
Diabetes mellitus	86 (18,5)	184 (21,1)	118 (23)	0,23
Aktive Raucher	150 (32,3)	266 (30,5)	154 (30)	0,71
Hypercholesterinämie	185 (39,9)	366 (41,9)	241 (47)	0,06
Instabile angina pectoris	122 (26,3)	239 (27,4)	154 (30)	0,39
Akuter Myokardinfarkt	91 (19,6)	174 (19,9)	110 (21,4)	0,73
Reduzierte LV-Funktion	124 (26,7)	263 (30,1)	157 (30,6)	0,34
MI i.d. Vorgeschichte	125 (26,9)	236 (27)	135 (26,3)	0,96
ACVB i.d. Vorgeschichte	50 (10,8)	109 (12,5)	46 (9)	0,13
Mehrgefäßerkrankung	342 (73,7)	623 (71,4)	363 (70,8)	0,55
Therapie m. Reopro®	90 (19,4)	178 (20,4)	96 (18,7)	0,73

Zahlen in Klammern entsprechen den Prozentangaben. LV-Funktion=linksventrikuläre Funktion, MI=Myokardinfarkt, ACVB=Aorto-Coronarer-Venen-Bypass

4.1.2 Klinische Charakteristika bezogen auf die Mspl-Genotypen

Die auf die verschiedenen Genotypen des Mspl-Polymorphismus bezogenen Daten sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Das mittlere Alter der Patienten ($62,9 \pm 10,3$ für CC, $63,2 \pm 9,7$ für CT und $60,1 \pm 10,3$ für TT), der Anteil an Frauen (19,4% für CC, 25,9% für CT und 19,7% für TT; $p=0,26$), an Patienten mit arterieller Hypertonie (66,2% für CC, 69,6% für CT und 73,8% für TT; $p=0,12$), an Patienten mit Diabetes mellitus (19,9% für CC, 22,6% für CT und 19,7% für TT; $p=0,39$), an aktiven Rauchern (32,8% für CC, 28,5% für CT und 28,7% für TT; $p=0,14$) und an Patienten mit Hypercholesterinämie (41,1% für CC, 43,9% für CT und 50,0% für TT; $p=0,14$) war zwischen den drei Genotypen gleich verteilt. Es ergaben sich auch keine signifikanten Unterschiede bezüglich kardialer Vorerkrankungen. Der Anteil der Patienten mit Myokardinfarkt in der Vorgeschichte betrug 27,3% beim CC-Genotyp, 26,1% beim CT-Genotyp und 27,6% beim TT-Genotyp ($p=0,85$), bei Patienten mit einer Bypassoperation in der Vorgeschichte (11,1% für CC, 11,0% für CT und 11,5% für TT; $p=0,98$), bei Patienten mit einer reduzierten linksventrikulären Funktion (28,1% für CC, 31,2% für CT und 28,7% für TT; $p=0,37$), mit instabiler Angina pectoris (26,0% für CC, 29,9% für CT und 30,3% für TT; $p=0,17$), einem akuten Myokardinfarkt (20,5% für CC, 20,0% für CT und 19,7% für TT; $p=0,95$) und einer Mehrgefäßerkrankung (72,2% für CC, 70,7% für CT und 75,4% für TT; $p=0,52$) war gleich verteilt. Es ergab sich jedoch ein Trend bei der Häufigkeitsverteilung mit Reopro® vorbehandelter Patienten (19,8% für CC, 20,7% für CT und 12,3% für TT; $p=0,09$).

Tabelle 4: Klinische Charakteristika der Patienten bezogen auf die MspI-Genotypen

	MspI CC n=988	MspI CT n=740	MspI TT n=122	P
Alter (J)	62,9	63,2	60,1	
Frauen	(19,4)	(25,9)	(19,7)	0,26
Arterielle Hypertonie	654 (66,2)	515 (69,6)	90 (73,8)	0,12
Diabetes mellitus	197 (19,9)	167 (22,6)	24 (19,7)	0,39
Aktive Raucher	324 (32,8)	211 (28,5)	35 (28,7)	0,14
Hypercholesterinämie	406 (41,1)	325 (43,9)	61 (50)	0,13
Instabile angina pectoris	257 (26)	221 (29,9)	37 (30,3)	0,17
Akuter Myokardinfarkt	203 (20,5)	148 (20)	24 (19,7)	0,95
Reduzierte LV-Funktion	278 (28,1)	231 (31,2)	35 (28,7)	0,37
MI i.d. Vorgeschichte	270 (27,3)	193 (26,1)	33 (27,6)	0,85
ACVB i.d. Vorgeschichte	110 (11,1)	81 (11)	14 (11,5)	0,98
Mehrgefäßerkrankung	713 (72,2)	523 (70,7)	92 (75,4)	0,52
Therapie m. Reopro®	196 (19,8)	153 (20,7)	15 (12,3)	0,09

LV-Funktion=linksventrikuläre Funktion, MI=Myokardinfarkt, ACVB=Aorto-Coronarer-Venen-Bypass

4.2 Läsionsbezogene und interventionelle Charakteristika

Im Folgenden werden die läsionsbezogenen und während der Intervention erhobenen Daten in Abhängigkeit vom jeweiligen Genotyp präsentiert.

4.2.1 Läsions- und interventionelle Charakteristika bezogen auf die Pstl-Genotypen

Die Verteilung läsionsbezogener Charakteristika, wie die Aufteilung der Zielgefäße ($p=0,75$), und die Schweregrad- Klassifikation ($p=0,91$) unterschieden sich zwischen den drei Genotypgruppen (AA, AG, GG) nicht signifikant. Ebensovienig wie die Aufgliederung in komplexe ($p=0,54$), restenotische ($p=0,29$), chronische ($p=0,31$) und ostiale Läsionen ($p=0,42$). Die interventionellen Daten sind in Tab.5 aufgelistet.

Tabelle 5: Interventionscharakteristika bezogen auf die Pstl-Genotypen

	Pstl AA n=464	Pstl AG n=876	Pstl GG n=513	P
Zielgefäß				0,75
Linker Hauptstamm	3 (0,7)	17 (2,0)	7 (1,4)	
LAD	183 (39,4)	341 (39,1)	210 (40,9)	
LCx	99 (21,3)	172 (19,7)	98 (19,1)	
RCA	151 (32,5)	281 (32,2)	164 (32,0)	
Venöser Bypass	28 (6,03)	62 (7,1)	34 (6,6)	

ACC/AHA Klassifikation				0,91
A	35 (7,5)	58 (6,6)	35 (6,8)	
B1	91 (19,6)	155 (17,8)	95 (18,5)	
B2	222 (47,8)	437 (50,1)	263 (51,3)	
C	116 (25,0)	223 (25,5)	120 (23,4)	
Komplexe Läsionen B2 + C	338 (72,8)	660 (75,6)	383 (74,7)	0,54
Restenotische Läsion	125 (26,9)	202 (23,1)	122 (23,8)	0,29
Chronischer Verschluss	36 (7,8)	49 (5,6)	33 (6,4)	0,31
Ostiale Läsionen	28 (6,0)	67 (7,7)	32 (6,2)	0,42
Vor stent-Implantation				
Min. Lumendurchmesser (mm)	0,67 ± 0,52	0,64 +/- 0,49	0,61 +/- 0,49	
Referenzdurchmesser (mm)	3,02 +/- 0,54	3,04 +/- 0,53	3,05 +/- 0,53	
Durchmesser d. Stenose (%)	78,12 +/- 15,36	78,75 +/- 15,25	79,90 +/- 15,30	
Länge d. Stenose (mm)	12,07 +/- 6,66	11,90 +/- 6,42	12,43 +/- 7,31	
Während stent-Implantation				
Max. Ballondruck (atu)	13,79 +/- 3,29	13,78 +/- 3,31	14,01 +/- 3,24	
Verhältnis Ballon/Gefäß	1,07 +/- 0,09	1,07 +/- 0,10	1,07 +/- 0,09	
Anzahl der stents	1,85 +/- 1,22	1,77 +/- 1,17	1,76 +/- 1,15	

Direkt nach stent-Implantation

Min. Lumendurchmesser (mm)	2,92 +/- 0,52	2,93 +/- 0,53	2,94 +/- 0,50
Direkter Lumengewinn (mm)	2,25 +/- 0,63	2,29 +/- 0,65	2,33 +/- 0,62

Anm. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung oder Anzahl (Prozent) der Patienten angegeben. LAD (=ramus interventricularis anterior), LCx (ramus circumflexus), RCA (rechte Koronararterie), ACC (American College of Cardiology), AHA (American Heart Association).

4.2.2 Läsions- und interventionelle Charakteristika bezogen auf die MspI-Genotypen

Die Verteilung läsionsbezogener Charakteristika, wie die ZielgefäÙe ($p=0,53$), und die Schweregrad-Klassifikation ($p=0,78$) unterschieden sich zwischen den drei Genotypen (CC, CT, TT) nicht signifikant. Ebenso wenig wie die Unterteilung in komplexe ($p=0,44$), restenotische ($p=0,76$), chronische ($p=0,54$) und ostiale Läsionen ($p=0,44$).

Die interventionellen Daten sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: Interventionscharakteristika bezogen auf die MspI-Genotypen

	MspI CC n=988	MspI CT n=740	MspI TT n=122	P
Zielgefäß				0,53
Linker Hauptstamm	16 (1,6)	10 (1,4)	1 (0,8)	
LAD	401 (40,6)	278 (37,6)	55 (45,1)	
LCx	192 (19,4)	156 (21,1)	21 (17,2)	
RCA	314 (31,8)	249 (33,7)	33 (27,0)	
Venöser Bypass	65 (6,6)	47 (6,4)	12 (9,8)	
ACC/AHA Klassifikation				0,78
A	70 (7,1)	51 (6,9)	7 (5,7)	
B1	184 (18,6)	139 (18,8)	18 (14,8)	
B2	484 (49,0)	368 (49,7)	70 (57,4)	
C	250 (25,3)	182 (24,6)	27 (22,1)	
Komplexe Läsionen B2 + C	734 (74,3)	550 (74,3)	97 (79,5)	0,44
Restenotische Läsion	238 (24,1)	178 (24,1)	33 (27,0)	0,76
Chronischer Verschuß	63 (6,4)	50 (6,8)	5 (4,1)	0,54
Ostiale Läsionen	71 (7,2)	51 (6,9)	5 (4,1)	0,44

Vor stent-Implantation

Min. Lumen-Durchmesser (mm)	0,66 +/- 0,50	0,63 +/- 0,50	0,61 +/- 0,47
Referenzdurchmesser (mm)	3,03 +/- 0,52	3,05 +/- 0,54	3,04 +/- 0,57
	78,47 +/-	79,43 +/-	79,67 +/-
Durchmesser Stenose (%)	15,12	15,56	15,13
Länge d. Stenose (mm)	12,02 +/- 6,67	11,96 +/- 6,44	13,38 +/- 8,72

Während Stent-Implantation

Max. Ballondruck (atu)	13,88 +/- 3,32	13,78 +/- 3,29	13,96 +/- 3,01
Verhältnis Ballon/Gefäß	1,07 +/- 0,10	1,07 +/- 0,09	1,08 +/- 0,09
Anzahl der Stents	1,79 +/- 1,17	1,79 +/- 1,26	1,74 +/- 1,26

Direkt nach Stent-Implantation

Min. Lumendurchmesser (mm)	2,92 +/- 0,51	2,95 +/- 0,53	2,91 +/- 0,54
Direkter Lumengewinn (mm)	2,26 +/- 0,63	2,33 +/- 0,65	2,30 +/- 0,64

Anm. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung oder Anzahl (Prozent) der Patienten angegeben. LAD (=ramus interventricularis anterior), LCx (ramus circumflexus), RCA (rechte Koronararterie), ACC (American College of Cardiology), AHA (American Heart Association).

4.3 Klinisches und angiographisches Ergebnis nach der Stentimplantation

4.3.1 Klinisches 30-Tage-Ergebnis bezogen auf die PstI-Genotypen

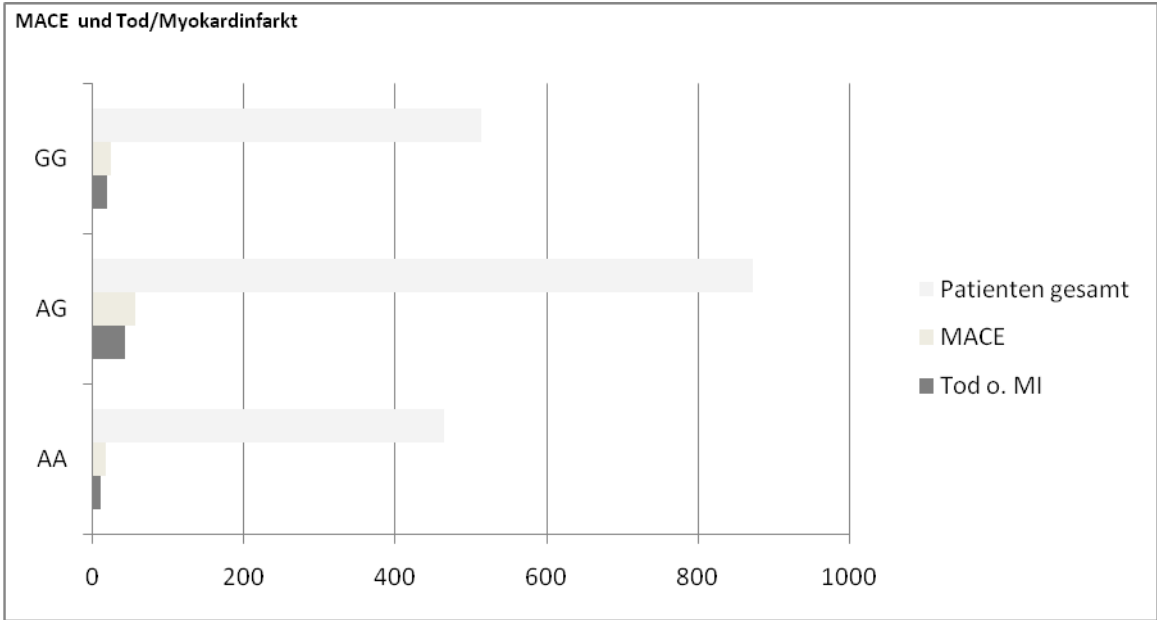
Die Träger des heterozygoten Genotyps (AG) zeigen eine positive Korrelation beim Auftreten von MACE ($p=0,08$) und Tod/Myokardinfarkt ($p=0,04$) im Vergleich zu den beiden anderen Genotypen. Keine statistisch signifikanten Unterschiede zeigten sich bei den drei Genotypen bezüglich der Kriterien Tod ($p=0,18$), Myokardinfarkt ($p=0,15$), ACVB ($p=0,28$), erneute PTCA ($p=0,48$) oder Revaskularisierung des betroffenen Gefäßes ($p=0,44$) für sich alleine betrachtet. Die korrespondierenden Daten sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: 30-Tage-Ergebnis nach Stentimplantation bezogen auf den PstI-Genotyp

	AA n= 464	AG n= 873	GG n= 513	P
Tod	1 (0,22)	10 (1,14)	6 (1,17)	0,19
Myokardinfarkt	11 (2,38)	46 (5,27)	20 (3,90)	
Q-wave-Myokardinfarkt	10 (2,16)	35 (4,01)	14 (2,73)	0,15
Tod oder Myokardinfarkt	10 (2,16)	43 (4,93)	19 (3,70)	0,04
Re-PTCA	9 (1,94)	26 (2,98)	12 (2,34)	0,49
Bypass-Operation	0	1 (0,12)	2 (0,39)	0,28
TLR	1,94	3,09	2,53	0,45

MACE	17 (3,66)	56 (6,41)	24 (4,68)	0,08
frühe Stentocclusion	6 (1,29)	18 (2,06)	8 (1,56)	0,56

Anm. Zahlen in Klammern entsprechen Prozentangaben, TLR=Revaskularisation am Zielgefäß, MACE=kardiovaskuläre Ereignisse



4.3.2 Klinisches 30-Tage-Ergebnis bezogen auf die MspI-Genotypen

Bei diesem Polymorphismus zeigten sich statistisch keine signifikanten Ergebnisse bezüglich der Kriterien Tod ($p=0,66$), Myokardinfarkt ($p=0,80$), erneute PTCA ($p=0,85$), ACVB ($p=0,61$), Revaskularisierung des betroffenen Gefäßes ($p=0,88$) oder irgendeines kardialen Ereignisses ($p=0,71$). Die einzelnen Daten sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: 30-Tage-Ergebnis nach Stentimplantation bezogen auf den MspI-Genotyp

	CC n= 988	CT n= 740	TT n= 122	P
Tod	8 (0,81)	7 (0,95)	2 (1,64)	0,66
Myokardinfarkt	46 (4,65)	27 (3,38)	6 (4,92)	
Q-wave-Myokardinfarkt	35 (3,54)	19 (2,57)	5 (4,10)	0,44
Tod oder Myokardinfarkt	40 (4,05)	26 (3,51)	6 (4,92)	0,71
Re-PTCA	25 (2,53)	18 (2,43)	4 (3,28)	0,86
Bypass-Operation	1 (0,10)	2 (0,27)	0	0,62
TLR	2,53	2,7	3,28	0,88
MACE	53 (5,36)	36 (4,86)	8 (6,56)	0,72
frühe Stentocclusion	21 (2,13)	9 (1,22)	2 (1,64)	0,36

Anm. Zahlen in Klammern entsprechen Prozentangaben, TLR=Revaskularisation am Zielgefäß, MACE=kardiovaskuläre Ereignisse

4.3.3 Angiographisches Ergebnis 6 Monate nach der Stentimplantation bezogen auf die PstI-Genotypen

Bei der angiographischen Kontrolluntersuchung, die etwa 6 Monate nach der Stentimplantation durchgeführt worden war, zeigten sich bezüglich der untersuchten Parameter „Restenose“ und „früher Stentverschluss“ keine signifikanten Werte. Details sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Angiographisches Ergebnis nach 6 Monaten bezogen auf die PstI-Genotypen

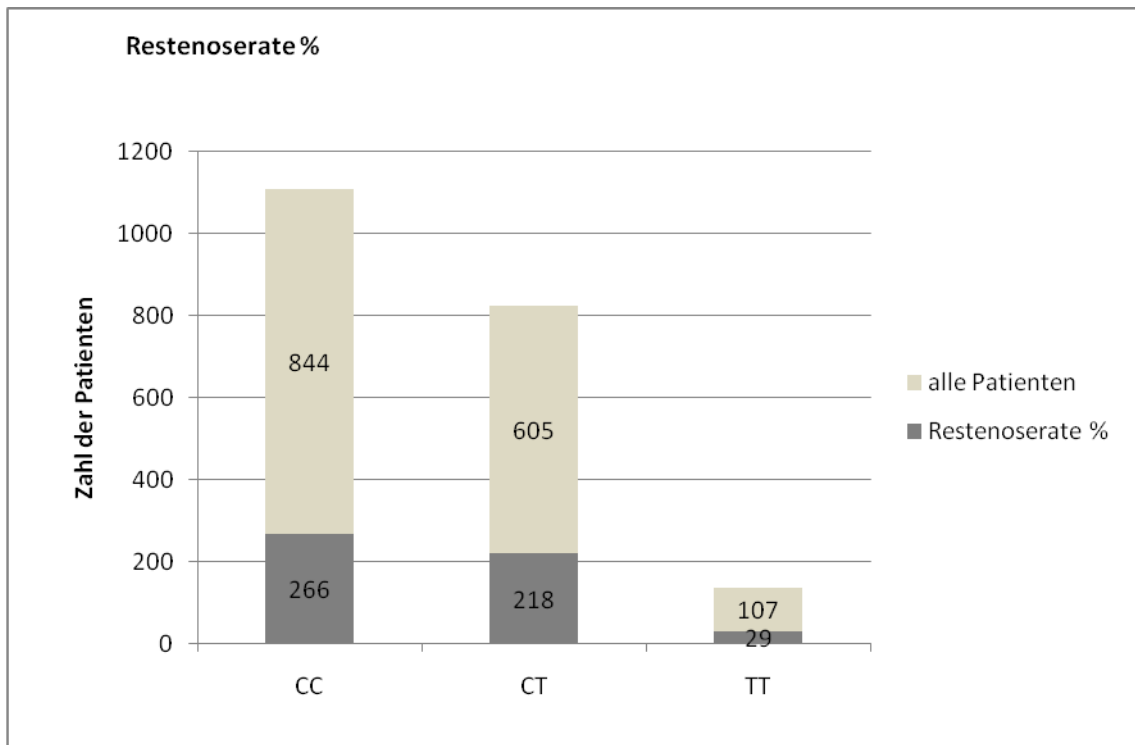
	AA n= 410	AG n= 725	GG n= 421	P
Stenose %	42,62 +/- 27,95	43,91 +/- 27,90	43,93 +/- 26,55	
MLD mm	1,76 +/- 0,94	1,72 +/- 0,95	1,73 +/- 0,89	
Lumenverlust mm	1,16 +/- 0,84	1,22 +/- 0,85	1,22 +/- 0,84	
L.-gewinn netto mm	1,08 +/- 0,95	1,05 +/- 1,00	1,08 +/- 0,93	
Restenose %	31,7	35,2	30,4	0,21
Frühe Stentocclusion %	1,29	2,06	1,56	0,56

4.3.4 Angiographisches Ergebnis 6 Monate nach der Stentimplantation bezogen auf die Mspl-Genotypen

Bei dem hier untersuchten Polymorphismus zeigte sich 6 Monate nach der Intervention ein Trend ($p= 0,08$) was die Restenosehäufigkeit betrifft. Die Werte für den frühen Stentverschluss waren nicht signifikant erhöht. Details sind Tabelle 10 zu entnehmen.

Tabelle 10: Angiographisches Ergebnis nach 6 Monaten bezogen auf die Mspl-Genotypen

	CC n= 844	CT n= 605	TT n= 107	P
Stenose %	42,54 +/- 27,42	45,03 +/- 28,16	43,52 +/- 24,65	
MLD mm	1,75 +/- 0,92	1,70 +/- 0,97	1,74 +/- 0,84	
Lumenverlust mm	1,17 +/- 0,82	1,26 +/- 0,88	1,18 +/- 0,76	
L.-gewinn netto mm	1,08 +/- 0,95	1,04 +/- 1,01	1,11 +/- 0,89	
Restenose %	31,5	36	27,1	0,08
Frühe Stentocclusion %	2,13	1,22	1,64	0,36



4.3.5 Ergebnisse 1 Jahr nach der Stentimplantation bezogen auf die Genotypen beider Polymorphismen

Hinsichtlich aller untersuchten Parameter wie Tod, Myokardinfarkt, ACVB, Re-PTCA oder irgendeines anderen gravierenden kardialen Geschehens zeigten sich weder beim Pstl- noch beim MspI-Polymorphismus signifikante Ergebnisse nach Ablauf eines Jahres. Die genauen Daten sind in den Tabellen 11 und 12 zusammengefasst.

Tabelle 11: Ergebnisse nach 1 Jahr bezogen auf die PstI-Genotypen

	AA n= 464	AG n= 873	GG n= 513	p
Tod	7 (1,51)	24 (2,75)	15 (2,92)	0,28
Kardial bedingter Tod	4 (0,86)	19 (2,18)	12 (2,34)	0,16
Myokardinfarkt	7 (1,51)	16 (1,83)	11 (2,14)	0,76
Tod oder Myokardinfarkt	21 (4,5)	61 (7,0)	31 (6,0)	0,2
ACVB	4 (0,86)	21 (0,24)	10 (1,95)	0,14
Re-PTCA	96 (20,7)	159 (18,2)	92 (17,9)	0,46
TLR	99 (21,3)	177 (20,3)	100 (19,5)	0,77
MACE	112 (24,1)	218 (25,0)	117 (22,8)	0,66

Anm. Zahlen in Klammern entsprechen Prozentangaben, ACVB=Aorto-coronarer-Venen-Bypass, TLR=Revaskularisation am Zielgefäß, MACE=kardiovaskuläre Ereignisse

Tabelle 12: Ergebnisse nach 1 Jahr bezogen auf die MspI-Genotypen

	CC n= 988	CT n= 740	TT n= 122	p
Tod	24 (2,43)	19 (2,57)	3 (2,46)	0,98
Kardial bedingter Tod	20 (2,02)	13 (1,76)	2 (1,64)	0,9
MI	20 (2,02)	12 (1,62)	2 (1,64)	0,81
Tod oder Myokardinfarkt	62 (6,28)	43 (5,81)	8 (6,56)	0,9
ACVB	16 (1,61)	18 (2,43)	1 (0,82)	0,31
Re-PTCA	184 (18,6)	139 (18,8)	24 (19,7)	0,96
TLR	195 (19,7)	156 (21,1)	25 (20,5)	0,78
MACE	235 (23,8)	183 (24,7)	29 (23,8)	0,89

Anm. Zahlen in Klammern entsprechen Prozentangaben, ACVB=Aorto-Coronarer-Venen-Bypass, TLR=Revaskularisation am Zielgefäss, MACE=kardiovaskuläre Ereignisse

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden 1850 Patienten, die sich einer Koronarintervention bei Zeichen einer Myokardischämie am Deutschen Herzzentrum München unterzogen haben im Hinblick auf einen möglichen Zusammenhang zwischen den beiden TF-Polymorphismen PstI und MspI und dem Auftreten einer Restenose wie auch dem klinischen Kurz- und Langzeitverlauf nach perkutaner Koronarintervention mit Stent-Implantation untersucht. Hierbei zeigte sich, dass der PstI-Polymorphismus keinerlei Assoziation mit der Entwicklung einer Restenose nach Koronarintervention aufweist, jedoch war die Häufigkeit von schwerwiegenden kardialen Ereignissen (MACE) wie Tod, Myokardinfarkt oder die Notwendigkeit einer Akut-Revaskularisation bei den Trägern des G-Allels erhöht. Betrachtet man nur die Ereignisse Tod oder Myokardinfarkt innerhalb der ersten 30 Tage nach Koronarintervention zeigt sich ein gerade statistisch signifikanter Unterschied. Der MspI-Polymorphismus zeigt zwar in der statistischen Auswertung bezüglich der Restenose nach 6 Monaten einen Trend ($p=0,08$), beim Vergleich der beiden Allele miteinander konnte jedoch kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Verglichen wurden jeweils CC und CT gegen TT sowie der umgekehrte Fall, TT und CT gegen CC.

5.1 Die Rolle des Tissue Factor bei der Ausbildung einer Restenose

Tissue factor aktiviert zusammen mit Faktor VIIa (FVIIa) den Gerinnungsfaktor FX zu FXa und initialisiert somit den extrinsischen Teil der Gerinnungskaskade. Üblicherweise wird Tissue factor nicht von zirkulierenden Leukozyten und von Endothelzellen exprimiert, die Transkription kann aber durch proinflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren, Scherkräfte und eine Balloon- verursachte Gefäßwandverletzung induziert werden (Mackman, N. 1995). TF findet sich in gesunden Gefäßen in Fibroblasten der Adventitia und der äusseren, glatten Muskelzellschicht der Media. In arteriosklerotisch veränderten Gefäßen lässt sich TF sowohl in der Endothelzell-Schicht über der Plaque (Thiruvikraman, S.V. 1996) wie auch in den glatten Muskelzellen der Media und Intima und in Makrophagen nachweisen (Crawley, J. 2000). Desweiteren wurden deutliche Mengen an TF in der extrazellulären Matrix, dem nekrotischen Kern von fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques gefunden (Wilcox, J.N. 1989). In der Neointima-Schicht ist Tissue Factor sowohl intrazellulär, hier hauptsächlich in den glatten Muskelzellen und Schaumzellen, aber auch extrazellulär reichlich vorhanden, wie die Studien von Wilcox und Moons zeigen (Moons, A.H.M. 2002, Wilcox, J.N. 1989). Eine Plaqueruptur, wie sie bei einem akuten Myokardinfarkt passiert, setzt TF aus der Gefäßwand, den im zirkulierendem Blut vorhandenen Gerinnungsfaktoren aus und führt somit zu einer lokalen Thrombose (Ardissino, D. 1997). Studien haben gezeigt, dass erhöhte TF-Blutspiegel ebenfalls einen Beitrag zur Gerinnungsaktivierung leisten könnten (Giesen, P.L. 1999, Rauch, U. 2000) und somit das Konzept der ausschließlichen perivaskulären TF-Expression und der strikten räumlichen Trennung von TF und zirkulierendem Blut verändert und erweitert. Thromben weisen, obwohl sie in einem TF-freien Gefäßwandmodell entstanden sind, TF-Antigen auf (Camera, M. 1999). Demnach muss im zirkulierenden Blut selbst TF vorhanden sein, so genannter Blood-borne-Tissue-Faktor. Nach aktuellen Kenntnissen setzt sich dieser Pool aus drei Quellen zusammen:

- TF auf zirkulierenden aktivierten Monozyten,
- TF-positive Mikropartikel sowie
- Löslicher TF (Steppich, B.A. 2006)

Mikropartikel sind ca. 100nm große apoptotische Membranvesikel, die aktiv von fast allen eukaryoten Zellen gebildet werden, vor allem aber von Monozyten, Endothelzellen, Granulo- und Thrombozyten. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Gerinnungsaktivierung, der Endothelfunktion und bei Entzündungsprozessen. Durch TF-Expression und Exposition von negativ geladenen Phospholipiden auf der Membranoberfläche werden Gerinnungsfaktoren gebunden und sowohl in vitro als auch in vivo die prokoagulatorische Aktivität gesteigert (Bombeli, T. 1997, Casciola-Rosen, L. 1996, Nieuwland, R. 2000). Unter anderem konnte in einer Studie von (Mallat, Z. 2000) gezeigt werden, daß Patienten im akuten Koronarsyndrom eine deutliche Zunahme an zirkulierenden prokoagulatorischen endothelialen Mikropartikeln im Vergleich zu Patienten mit stabiler Angina pectoris aufwiesen. Ferner geht aus einer anderen Studie von (Boulanger, C. 2001) hervor, daß Mikropartikel die Endothelfunktion beeinflussen können. In dieser Studie verringerten die Mikropartikel aus dem Blut von Patienten mit Myokardischämie die Endothelin-abhängige Relaxation zuvor kultivierter Aortenringe, wobei Mikropartikel von Kontrollpatienten ohne koronare Herzkrankheit keinen Einfluss zeigten.

Neueren Untersuchungen zufolge kodiert das TF-Gen neben dem zellulär exprimierten TF-Antigen auch noch für ein weiteres, lösliches TF-Antigen, das durch alternatives Splicing der primären TF-mRNA gebildet werden kann und weder eine transmembrane noch eine zytoplasmatische Domäne besitzt, sondern als Plasmaprotein im peripheren

Blut zirkuliert (Bogdanov,V. 2003). Proinflammatorische Zytokine können die Sekretion des löslichen TF in kultivierten Endothelzellen induzieren, wie eine Studie von (Szotowski,B. 2005) zeigte.

Mehrere Studien zeigten einen signifikanten positiven Zusammenhang zwischen erhöhten Spiegeln an zirkulierendem TF-Antigen und erhöhter katalytischer TF-Aktivität und dem akuten Koronarsyndrom gegenüber stabiler Angina pectoris (Misumi,K. 1998, Soejima,H. 1999). Erhöhte Tissue factor-Plasmaspiegel finden sich vor allem bei Patienten mit Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, Rauchern (Sambola,A. 2003) und bei Patienten mit Myokardinfarkt (Soejima,H. 1999) . Die pathophysiologische Bedeutung des zirkulierenden TF ist jedoch noch weitgehend unklar.

Genanalysen am TF-Promotor-Polymorphismus -603A/G zeigten, daß das G-Allel sowohl mit erhöhtem Risiko für Myokardinfarkt als auch mit gesteigerten Spiegeln an zirkulierendem TF assoziiert ist (Ott,I. 2004, Arnaud,E. 2000). Auch, wenn Mizuno et al. in einer relativ kleinen Studie mit 43 Patienten einen positiven Zusammenhang zwischen erhöhtem TF- Antigen nach perkutaner Angioplastie im Koronarsinusblut von Patienten mit einer Myokardischämie und einer späteren Restenose zeigten (Mizuno,O. 2001), stehen größere Studien, die die kardiologische Bedeutung von zirkulierendem TF untersuchen noch aus.

Abgesehen von seiner Bedeutung in der Gerinnungsaktivierung kann TF die Freisetzung bestimmter Wachstumsfaktoren wie z.B. des endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) begünstigen, ebenso wie die Migration glatter Muskelzellen. Beides scheinen entscheidende Schritte bei der Entstehung einer neointimalen Hyperplasie zu sein (Chen,J. 2001, Sato,Y. 1996).

Studien an Versuchstieren (Kaninchen und Ratten) zeigten, dass das von glatten Muskelzellen gebildete TF eine wichtige Rolle spielt in der Entstehung von Fibrin-reichen Thromben und anschließender Ausbildung einer Neointima nach Ballonaufdehnung einer Kaninchenaorta (Asada,Y. 1998). Eine Überexpression von TF aus glatten Muskelzellen

der arteriellen Neointima von Ratten beschleunigte die Reendothelialisierung und steigerte die Migration von glatten Muskelzellen autokrin sowohl in vitro wie auch in vivo, was letztendlich zu einer Intimaverdickung führte (Hasenstab,D. 2000).

In gesunden Kaninchen- und Rattenaortae verursachte eine Ballonaufdehnung einen schnellen Anstieg (innerhalb von 1-2 Stunden) von TF-mRNA, und das sowohl in der Media wie auch in der Adventitia, verbunden mit einer erhöhten TF- Aktivität in der Media (Taubmann,M.B. 1993, Marmur,J.D. 1993, Hatakeyama,K. 1998), die für 24 Stunden nach Intervention erhalten blieb (Marmur,J.D. 1993, Speidel,C.M. 1995). Darüberhinaus blieb die Expressierung von Tissue Faktor noch über die folgenden Wochen in den glatten Muskelzellen erhalten, die durch Proliferation nachfolgend die Neointima bildeten (Hatakeyama,K. 1998). In einer Studie (Gallo,R. 1995) wurde ein zweiphasischer Anstieg von TF-Antigen und -Aktivität in den glatten Muskelzellen der Media nach koronarer Angioplastie am Schwein gezeigt, und zwar einmal 1-24 Stunden nach der Aufdehnung und ein zweiter Anstieg vier Wochen post interventionem. In zwei Studien konnte gezeigt werden, daß sich in Komplex mit Faktor VIIa befindliches TF vergleichbar zu PDGF verhält, es induziert auf chemotaktische Art die Migration von kultivierten glatten Muskelzellen von Kaninchen (Sato,Y. 1996, Sato,Y. 1997). Weiterhin wurde im Schweine-Modell beobachtet, dass die Gabe von rekombinantem Tissue factor pathway Inhibitor (rTFPI) sowohl eine signifikante Wirkung auf die Reduktion der Ausbildung eines akuten Thrombus ($p < 0,05$) als auch auf die Intimadicke nach 28 Tagen hatte ($p < 0,01$) (Roque,M. 2000).

TFPI ist ein endogener physiologischer Inhibitor des TF-Pathways (Broze,G.J. 1995). Er bindet in Abhängigkeit von FXa kompetitiv den TF-FXa-Komplex und limitiert so die initiale Bildung von Thrombin. Erst wenn, über Rückkopplungsmechanismen via intrinsisches System, unabhängig von TF zusätzlich FXa gebildet wird, kommt es zur unlimitierten Prothrombinaktivierung; TFPI vermittelt so einen endogenen Schwellenwert, der sicherstellt, dass kleine, irrelevante prothrombotische Stimuli nicht zu einer unkontrollierten, thrombotischen Antwort führen. Störungen im Gleichgewicht zwischen TF

und TFPI scheinen auch beim akuten Koronarsyndrom die Thrombogenität von Plaque und zirkulierendem Blut zu beeinflussen und zu modulieren (Steppich,B.A. und Ott,I. 2010, Steppich,B.A. 2006).

Insgesamt gesehen deuten diese Studien darauf hin, daß Tissue factor nicht nur für eine schnelle prothrombotische Antwort verantwortlich ist, sondern auch zu Atherogenese, koronarer Restenose oder einer verlängerten Thrombinbildung nach Intervention führen kann (Moons,A.H.M. 2002).

5.2 Polymorphismen und ihre Bedeutung für die Ausbildung einer Restenose

Bei komplexen Erkrankungen zu denen auch Diabetes mellitus und die koronare Herzerkrankung zählen, ist die Ätiologie als multifaktoriell anzusehen, unter anderen spielen hierbei sehr wahrscheinlich auch genetische Faktoren eine wichtige Rolle. Mit dem Ziel für diese sehr häufigen Erkrankungen neue und andere Therapieansätze zu finden, werden seit Jahren Studien geführt, um genetische Komponenten zu identifizieren. Am häufigsten untersucht wurden hierbei sogenannte Polymorphismen, das sind häufig vorkommende Varianten der genomischen DNA in einer Population, die definitionsgemäß mit einer Auftretenshäufigkeit von mindestens einem Prozent vorkommen. Andernfalls wird von einer Mutation gesprochen. Am häufigsten untersucht wurden sogenannte SPSs (single nucleotide polymorphismus) oder Insertions-/Deletionspolymorphismen. SNPs sind durch den Austausch von Einzelbasen gekennzeichnet und kommen in ungefährem Abstand von 1000 Basen im menschlichen Genom vor. Bei Insertions-/Deletions-Poymorphismen unterscheiden sich die beiden Allele in der Anwesenheit oder Abwesenheit eines definierten Sequenzabschnittes der DNA. Polymorphismen können prinzipiell die Quantität oder die

Qualität des Genproduktes beeinflussen, wie zum Beispiel die Transkription und Expression eines Gens, wobei hier die Bindungsstelle der Transkriptionsfaktoren verändert wird (Van 't Hooft, F.M. 1999). Manchmal kommt es durch Polymorphismen auch zum Austausch einer Aminosäure oder der Aminosäuresequenz, wie am Beispiel der Faktor V Leiden Mutation bekanntgeworden ist. Diese molekular einem SNP entsprechende Missense-Mutation verursacht einen Austausch von Arginin zu Glutamin an Aminosäureposition 506 des Faktor-V-Proteins (Arg506Glu), wodurch seine physiologische Proteolyse durch APC etwa zehnfach verlangsamt wird und damit die prokoagulatorische Wirkung von Faktor V zunimmt (Camire, R.M. 1995). Anzunehmen ist auch, dass Genpolymorphismen nicht nur auf die Entstehung komplexer Erkrankungen Einfluss haben, sondern auch auf das Ansprechen auf bestimmte Therapieformen. In diesem Zusammenhang gut untersucht sind Genpolymorphismen, die die Verstoffwechslung von Medikamenten beeinflussen (Zhou, S.F. 2009).

Relevant für die vorliegende Arbeit ist der Einfluss von Genpolymorphismen auf das Auftreten bestimmter Komplikationen nach koronarer Stent-Implantation, insbesondere der Restenose. In einer Studie (Schömig, A. 1997) konnte gezeigt werden, dass das Restenose-Risiko von unbekanntem, möglicherweise genetischen Faktoren beeinflusst wird. Der Grad der Restenose zum Zeitpunkt der Kontrollangiographie sechs Monate nach Stentimplantation war bimodal verteilt: ein Gipfel des Histogramms zur Häufigkeitsverteilung lag bei 30%, der andere bei 70% Durchmesserstenose. Dieses Ergebnis spricht für zwei Subgruppen, die unterschiedliche Neigungen für die Ausbildung einer Restenose zu haben scheinen. Eine weitere Studie hob hervor, dass das Risiko der Restenose um das Zweieinhalbfache erhöht ist, wenn bei demselben Patienten bereits in einem anderen Gefäßabschnitt eine Restenose festgestellt wurde, wobei zuvor durch eine multivariate Analyse zum Beweis der Unabhängigkeit von bereits bekannten Risikofaktoren durchgeführt worden war (Kastrati, A.S. 1997).

Seit dem wurden einige Studien zur Untersuchung des Einflusses von Polymorphismen auf den klinischen Verlauf nach Stentimplantation durchgeführt. Die meisten Daten wur-

den in der Ära vor Einführung von Medikamenten-beschichteten Stents erhoben. Am genauesten untersucht wurde hierbei das Angiotensin converting enzym (ACE)- Gen, welches auf Chromosom 17 lokalisiert ist und einen Insertions-/Deletions-Polymorphismus in Intron 16 aufweist (Cambien, F. 1992). Die Genotypen werden mit II, ID und DD bezeichnet, abhängig von der Homo- bzw. Heterozygotie für die Insertion/Deletion. Es wurde bewiesen, dass der DD-Genotyp eng mit hohem ACE-Level im Plasma (Rigat, B. 1990, Tiret, L. 1992) und im Gewebe assoziiert ist (Costerousse, O. 1993). Angiotensin II ist ein Wachstumsfaktor für glatte Gefäßmuskelzellen, der abhängig ist von den gegenseitigen Wechselwirkungen der Expression anderer Faktoren, wie PDGF, TGF und FGF. Deswegen wurde vermutet, dass der ACE-Spiegel eine Schlüsselrolle in der Kontrolle der Neointimabildung nach Katheterintervention spielen könnte, und somit auch eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Restenose (Agema, W. 2001). In mehreren weltweiten Studien wurde dieser Einfluss untersucht, jedoch mit unterschiedlichen Ergebnissen. Bei einer Studie von (Ohishi, M. 1993), die eine positive Assoziation bezüglich der D-Allel Homozygoten und Restenose nach PTCA zeigte, muss bei dem Ergebnis berücksichtigt werden, dass keine multivariate Analyse bezüglich Alter oder Diabetes mellitus, beides bekannte Risikofaktoren, durchgeführt worden ist. Desweiteren waren nur Patienten japanischer Herkunft eingeschlossen, was nicht unmittelbar auf andere ethnische Gruppen übertragbar ist. Der zuvor erwähnte Zusammenhang konnte in einer groß angelegten, bei uns durchgeführten Studie mit 1850 konsekutiven Patienten nicht bestätigt werden. Bei 33% der Patienten konnte angiographisch eine Restenose nachgewiesen werden, der I-/D-Polymorphismus hatte darauf jedoch keinen Einfluss.

Ebenso gut untersucht sind mehrere Polymorphismen der Thrombozytenmembran. Auf dieser Membran sind verschiedene Bindungsrezeptoren lokalisiert, die eine Aggregation der Blutplättchen erst möglich machen. Einer davon, der Glykoprotein IIb/IIIa- Rezeptor ist essentiell für die Bindung von Fibrinogen und dem von Willebrand Faktor, die für die Thrombozytenaggregation und die Entstehung einer Thrombose unabkömmlich sind.

Auch für weitere Polymorphismen in Genen kardiovaskulärer Schlüsselproteine konnte in Studien eine Assoziation gezeigt werden.

In anderen Studien (Walter, D.H. 1997, Kastrati, A. 2000) konnte man nachweisen, dass das PI^{A2} Allel des Glykoprotein IIIa (eine der beiden Untereinheiten des Fibrinogenrezeptors GP IIb/ IIIa) einerseits mit dem gehäuften Auftreten von thrombotischen Ereignissen assoziiert ist und gleichzeitig mit einer erhöhten Restenoserate einhergeht. Für einen Polymorphismus (894GT) im Gen der Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase konnte in einer Studie nachgewiesen werden, dass homozygote Träger des T-Allels gegenüber dem Genotyp GT oder GG eine erhöhte Gesamtmortalitätsrate zeigten und ein signifikant höheres Risiko für das Auftreten eines akuten Myokardinfarktes im Zeitfenster eines Jahres aufwiesen (Gorchakova, O. 2003). Es gibt aber auch Polymorphismen, deren Allele mit positiven Effekten einhergehen. Den Trägern des Allel-2 des Gens des Interleukin-1-Rezeptor-Antagonisten (IL-RN*2) konnte eine geringere Restenoserate nach koronarer Stentimplantation zugeschrieben werden (Kastrati, A. 2000).

5.3 Bedeutung der Ergebnisse

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen dem Tissue factor PstI- bzw. MspI-Polymorphismus und der Entwicklung einer Restenose nach Stentimplantation. Der MspI-Polymorphismus zeigte zwar in der statistischen Auswertung bezüglich der Restenose nach 6 Monaten einen Trend ($p=0,08$), beim Vergleich der beiden Allele miteinander konnte jedoch kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden und somit war auch kein Risiko-Allel identifizierbar. Im klinischen Langzeitverlauf nach Stentimplantation gab es in der statistischen Auswertung einen Trend ($p=0,08$) für den PstI-Polymorphismus bezüglich der Häufigkeit von schwerwiegenden kardialen Ereignissen (MACE) wie Tod, Myokardinfarkt oder der Notwendigkeit einer Akut-Revaskularisation bei den Trägern des G-Allels. Betrachtet man nur die

Ereignisse Tod oder Myokardinfarkt innerhalb der ersten 30 Tage nach Koronarintervention zeigte sich ein schwach signifikanter Zusammenhang ($p=0,04$).

Im weiteren Vergleich scheinen G-Allel Träger ein höheres Risiko für schwere kardiale Ereignisse zu tragen, als A-Allel Träger ($p=0,025$). Dieses Ergebnis gehört jedoch weiter diskutiert.

1. In dieser Studie wurden nur Patienten kaukasischer Herkunft eingeschlossen. Da möglicherweise die Genotypverteilung in den unterschiedlichen Völkergruppen variieren kann, können die Ergebnisse nicht unmittelbar auf andere ethnische Gruppen übertragen werden.
2. Ist die vorliegende Studie mit 1850 Patienten vielleicht auf die Fragestellung des klinischen Langzeitverlaufes nicht genügend gepowert und sollte an einem größeren Patientenkollektiv überprüft werden. Gerade den Tod oder Myokardinfarkt betreffend stehen in dieser Studie nur geringe Fallzahlen zur Verfügung (62 gegen 10)
3. Alle Patienten wurden mit BMS behandelt. Heute verwendet man überwiegend DES. Es ist sehr gut möglich, daß die Restenoserate bei DES geringer gewesen wäre und der Nachweis einer Assoziation unwahrscheinlich
4. Eine genomweite Analyse zur Restenose nach Stentimplantation gibt es (noch) nicht. Das Studiendesign – die Untersuchung eines Gens, des TF-Gens, als Kandidatengen für die Restenose – entspricht nicht mehr dem heute verwendeten

Standard, nämlich der genomweiten Analyse. Es ist nicht ausgeschlossen, dass andere Faktoren gleichzeitig den Neointima-Aufbau unterdrücken und somit dem Effekt der hier untersuchten Polymorphismen entgegenwirken. Die mögliche Bedeutung von Haplotypen – Allelkombinationen zweier oder mehrerer Polymorphismen eines Gens – für die Restenose wurde hier nicht untersucht. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass die hier untersuchten Polymorphismen in Kooperation mit weiteren mit dem klinischen und angiographischen Ergebnis nach der koronaren Stentimplantation assoziiert sein könnten.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss zweier, in Intron fünf des TF-Gens gelegener Polymorphismen auf die Entwicklung einer Restenose sowie auf den klinischen Kurz- und Langzeitverlauf nach perkutaner Stentimplantation untersucht. Die perkutane Ballondilatation mit Stentimplantation stellt derzeit ein etabliertes Verfahren zur Therapie koronarer Herzerkrankungen. Ein ungelöstes Problem ist bisher noch die postinterventionelle Ausbildung einer Restenose verursacht durch Neointimaproliferation und sogenanntes „vascular remodeling“. Dieses ist bislang zwar durch medikamentenbeschichtete Stents verbessert, jedoch immer noch nicht gelöst worden. Während der Ballonaufdehnung oder Stentimplantation kommt es im Bereich der atherosklerotischen Plaque zu einer Verletzung der Gefäßwand und einem Aufbrechen der Plaque, wodurch es zu einem mehr oder weniger großen Maß an Thrombinbildung kommt.

Tissue factor, ein oberflächengebundenes Glykoprotein, wird in gesunden Gefäßen überwiegend in Fibroblasten der gefäßumgebenden Adventitia und subendothelial von glatten Muskelzellen der Media hergestellt. In arteriosklerotisch veränderten Gefäßen lässt sich TF sowohl in der Endothelzellschicht über der Plaque im nekrotischen Kern sowie in den glatten Muskelzellen der Media und Intima nachweisen. Sobald TF in direkten Kontakt mit Blut tritt, wird die Gerinnungskaskade initialisiert und indirekt die Entstehung von Thrombin.

Bei der Darstellung der kompletten TF-DNA fielen zum ersten Mal zwei, in Intron 5 gelegene, Polymorphismen auf, deren Rolle noch unklar ist, auf (Mackman,N. 1989).

Mehrere Einzelnukleotidpolymorphismen wurden seither beschrieben, darunter die zuvor erwähnten MspI und PstI, sowie ein Polymorphismus mit einem Aminosäureaustausch von Valin 228 zu Alanin.

Aufgrund der zentralen Funktion von TF bei der Regulation der Hämostase und der nicht-hämostatischen Funktionen, wie auch des Nachweises von Assoziationen mit weiteren TF-Polymorphismen, liegt die Vermutung nahe, dass die noch nicht weiter untersuchten

Polymorphismen MspI und PstI mit dem Risiko der Entwicklung einer Restenose nach Ballondilatation und Stentimplantation assoziiert sein könnten. Um diesen Zusammenhang zu untersuchen, wurden 1850 Patienten, bei denen aufgrund einer symptomatischen koronaren Herzerkrankung eine perkutane Ballondilatation mit Stentimplantation durchgeführt wurde, in die Studie eingeschlossen.

Primärer Endpunkt der Studie war das Auftreten einer angiographisch diagnostizierten Restenose zum Zeitpunkt der geplanten Kontroll-Koronarangiographie sechs Monate nach erfolgter Stentimplantation. Sekundärer Endpunkt der Studie waren die Inzidenz der Kombination von Tod oder Myokardinfarkt innerhalb des Beobachtungszeitraums von einem Jahr. Bei allen Patienten wurden die Genotypen der PstI- und MspI-Polymorphismen mit Hilfe des TaqMan-Verfahrens bestimmt. Sechs Monate später wurde bei 80% der Patienten eine Kontrollangiographie durchgeführt und über den Zeitraum von einem Jahr erfolgte bei allen in die Studie eingeschlossenen Patienten ein regelmässiges klinisches „follow up“.

Das wichtigste Ergebnis der Studie ist, dass beide Polymorphismen nicht mit der Häufigkeit der Entwicklung einer Restenose nach Stentimplantation assoziiert sind.

Im klinischen Langzeitverlauf nach Stentimplantation gab es in der statistischen Auswertung einen Trend ($p=0,08$) für den PstI-Polymorphismus bezüglich der Häufigkeit von schwerwiegenden kardialen Ereignissen (MACE) wie Tod, Myokardinfarkt oder der Notwendigkeit einer Akut-Revaskularisation bei den Trägern des G-Allels. Betrachtet man nur die Ereignisse Tod oder Myokardinfarkt innerhalb der ersten 30 Tage nach Koronarintervention zeigte sich ein schwach signifikanter Zusammenhang ($p= 0,04$).

Im weiteren Vergleich scheinen G-Allel Träger ein höheres Risiko für schwere kardiale Ereignisse zu tragen, als A-Allel Träger ($p=0,025$). Dieses Ergebnis gehört jedoch weiter diskutiert, vor allem muss man bedenken, dass in dieser Studie nur BMS verwendet wurden, wohingegen heute vorwiegend DES Verwendung finden. Es ist sehr gut möglich,

dass die Restenoserate bei DES geringer gewesen wäre und der Nachweis einer Assoziation unwahrscheinlich.

Zusammenfassend muss man sagen, dass beide Polymorphismen isoliert betrachtet sich nicht als prognostisch relevant erweisen. Da die Entwicklung einer postinterventionellen Restenose aber ein multifaktorielles Geschehen ist, wirkt sich eine Veränderung in nur einem der Faktoren möglicherweise nicht auf den klinischen Verlauf aus, sondern erst eine bestimmte Kombination mehrerer Komponenten.

7 Literaturverzeichnis

- Agema W, Jukema J, Pimstone S, Kastelein J. Genetic aspects of restenosis after percutaneous coronary interventions-towards more tailored therapy. *Eur Heart J.* 2001;22: 2058-2074.
- Ardissino D, Merlini PA, Ariens R, Coppola R, Bramucci E, Manucci PM. Tissue-factor antigen and activity in human coronary atherosclerotic plaques. *Lancet* 1997;349: 769-771.
- Arnaud E, Barbalat V, Nicaud V, Cambien F, Evans A, Morrison C, Arveiler D, Luc G, Ruidavets JB, Emmerich J, Fiessinger JN, Aiach M. Polymorphism in the 5' regulatory region of the tissue factor gene and the risk of myocardial infarction and venous thromboembolism: the ECTIM and PATHROS studies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20: 892-898.
- Asada Y, Hara S, Tsuneyoshi A, Hatakeyama K, Kisanuki A, Marutsuka K, Sato Y, Kamikubo Y, Sumiyoshi A. Fibrin-rich and platelet rich thrombus formation on neointima: recombinant tissue factor pathway inhibitor prevents fibrin formation and neointimal development following repeated balloon injury of rabbit aorta. *Thromb Haemost.* 1998;80: 506-511.
- Bogdanov V, Balasubramanian V, Hathcock J, Vele O, Lieb M, Nemerson Y. Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. *Nat Med.* 2003;9: 458-462.
- Bombeli T, Karsan A, Tait JF, Harlan JM. Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. *Blood.* 1997;89: 2429-2442.
- Boulanger C, Scoazec A, Ebrahimian T, Henry P, Mathieu E, Tedgui A, Mallat Z. Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. *Circulation.* 2001;104: 2649-2652.

- Broze, GJ. Tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost.* 1995;74: 90-93.
- Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D, Luc G, Bard JM, Bara L, Ricard S. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature.* 1992;359: 641-644.
- Camera M, Giesen PL, Fallon J, Aufiero BM, Taubmann M, Tremoli E, Nemerson Y. Cooperation between VEGF and TNF-alpha is necessary for exposure of active tissue factor on the surface of human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19: 531-537.
- Camerer E, Kolsto AB, Prydz H. Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. *Thromb Rest* 1996;81: 1-41.
- Camire RM, Kalafatis M, Cushman M, Tracy RP, Mann KG, Tracy PB. The mechanism of inactivation of human platelet factor Va from normal and activated protein C- resistant individuals. *J Biol Chem.* 1995;270: 20794-20800.
- Casciola-Rosen L, Rosen A, Petri M, Schlissel M. Surface blebs on apoptotic cells are sites of enhanced procoagulant activity: Implications for coagulation events and antigenic spread in systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93: 1624-1629.
- Chen J, Bierhaus A, Schiekofer S, Andrassy M, Chen B, Stern DM, Nawroth PP. Tissue factor: a receptor involved in the control of cellular properties, including angiogenesis. *Thromb Haemost.* 2001;86: 334-345.
- Costerousse O, Allegrini J, Lopez M, Alhenc Gelas F. Angiotensin I- converting enzyme in human circulating mononuclear cells: genetic polymorphism of expression in T-lymphocytes. *Biochem J.* 1993;290: 33-40.
- Crawley J, Lupu F, Westmuckett AD, Severs NJ, Kakkar VV, Lupu C. Expression, localization and activity of tissue factor pathway inhibitor in normal and atherosclerotic human vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20: 1362-1373.

Dawber TR, Kannel WB. The Framingham study. An epidemiological approach to coronary heart disease. *Circulation*.1966;34: 553-555.

Deutsche Gesellschaft für Kardiologie- Herz-u.Kreislaufforschung,
Prof.J.Meyer(Mainz)Prof.G.Breithardt(Münster)Prof.R.Erbel(Essen)Prof.E.Erdmann(Köln)Prof.H.Gohlke(Bad Krotzingen)Prof.P.Hanrath(Aachen)Dr.F.Sonntag(Henstedt-Rhen)Prof.G.Steinbeck(München). Leitlinie: Koronare Herzkrankheit / Angina pectoris. Deutsche Gesellschaft für Kardiologie.

Edgington TS, Dickinson CD, Ruf W. The structural basis of funktion of the TF VIIa complex in the cellular initiation of coagulation. *Thromb Haemost*. 1997;78: 401-405.

Eisenreich A, Celebi O, Goldin-Lang P, Schultheiss HP, Rauch U. Upregulation of tissue factor expression and thrombogenic activity in human aortic smooth muscle cells by irradiation, rapamycin and paclitaxel. *Int Immunopharmacol*. 2008;8: 307-311.

Farrall M, Green F, Peden J, Olsson P, Clarke R, Hellenius ML, Rust S, Lagercrantz J, Franzosi M, Schulte H, Carey A, Olsson G, Assmann G, Togoni G, Gollins R, Hamsten A, Watkins H. Genome-wide mapping of susceptibility to coronary artery disease identifies a novel replicated locus on chromosome 17.“ *PLoS Genetics* 2. 2006.

Faxon DP, Sanborn TA. Mechanism of angioplasty and its relation to restenosis. *Am J Cardiol*. 1987;60: 5B-9B.

Gallo R, Fallon JT, Toschi V. Bi-phasic increase of Tissue factor activity after angioplasty in porcine coronary arteries. *Circulation*. 1995;92: 1-354.

Gawaz M, Neumann FJ, Ott I, May A, Schömig A. Platelet activation and coronary stent implantation. Effect of antithrombotic therapy. *Circulation*. 1996;94: 279-285.

George BS, Voorhees WD 3rd, Roubin GS, Fearnot NE, Pinkerton CA, Raizner AE, King SB, Holmes DR, Topol EJ, Kereiakes DJ . Multicenter investigation of coronary

- stenting to treat acute or threatened closure after percutaneous transluminal coronary angioplasty: clinical and angiographic outcomes. *J Am Coll Cardiol.* 1993;22: 135-43.
- Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, Kling D, Roqué M, Fallon JT, Badimon JJ, Hember J, Riederer MA, Nemerson Y. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96: 2311-2315.
- Gorchakova O, Koch W, von Beckerath N, Mehili J, Schömig A, Kastrati A. Association of a genetic variant of endothelial nitric oxide synthase with the 1 year clinical outcome after coronary stent placement. *Europ Heart J.* 2003;24: 820-827.
- Grewe PH, Deneke T, Müller KM. Stent-induced changes of coronary morphology-- pathologic-anatomic and experimental findings after balloon expansion. *Z Kardiol.* 2001;90: 630-636.
- Gruentzig A. Percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Semin Roentgenol.* 1981;16: 152-153.
- Grundy SM, Balady GJ, Criqui MH, Fletcher G, Greenland P, Hiratzka LF, Houston-Miller N, Kris-Etherton P, Krumholz HM, LaRosa J, Ockene IS, Pearson TA, Reed J, Washington R, Smith SC jr. Primary prevention of coronary heart disease: guidance from framingham : a statement for healthcare professionals from the AHA task force on risk reduction. *Circulation.* 1998;97: 1876-1887.
- Hasenstab D, Lea H, Hart CE, Lok S, Clowes AW. Tissue factor overexpression in rat arterial neointima models- thrombosis and progression of advanced atherosclerosis. *Circulation.* 2000;101: 2651-2657.
- Hatakeyama K, Asada Y, Marutsuka K, Kataoka H, Sato Y, Sumiyoshi A. Expression of Tissue factor in the rabbit aorta after balloon injury. *Atherosclerosis* 1998;139: 265-271.
- Kastrati A, Schömig A, Dirschinger J, Mehili J, Dotzer J, von Welse N, Neumann FJ, Investigators, for the ISAR-SMART Study. A randomized trial comparing stenting with

balloon angioplasty in small vessels in patients with symptomatic coronary artery disease. *Circulation*. 2000;102: 2593-2598.

Kastrati A, Koch W, Berger PB, Mehili J, Stephenson K, Neumann FJ, von Beckerath N, Böttiger C, Duff GW, Schömig A. Protective role against restenosis from an interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in patients treated with coronary stenting. *J Am Coll Cardiol*. 2000;36: 2168-2173.

Kastrati A, Koch W, Berger PB, Mehili J, Stephenson K, Neumann FJ, von Beckerath N, Böttiger C, Duff GW, Schömig A. Protective role against restenosis from an interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in patients treated with coronary stenting. *J Am Coll Cardiol*. 2000;36: 2168-2173.

Kastrati A, Schömig A, Elezi S, Schühlen H, Dirschinger J, Hadamitzky H, Wehinger A, Hausleiter J, Walter H, Neumann FJ. Predictive factors of restenosis after coronary stent placement. *J Am Coll Cardiol*. 1997;30: 1428-1436.

Levine GN, Chodos A, Loscalzo J. Restenosis following coronary angioplasty: clinical presentations and therapeutic options. *Clin Cardiol*. 1995;18: 693-703.

Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420: 868-874.

Lincoff AM. Stent scrutiny. *J Am Med Assoc*. 2000;284: 1839-1841.

Livak KJ. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genet Anal* 1999;14: 143-149.

Lloyd-Jones DM, Wilson PW, Larson MG, Beiser A, Leip EP, D'Agostino RB, Levy D. Framingham risk score and prediction of lifetime risk for coronary heart disease. *Am J Cardiol* 2004;94: 20-24.

Löwel H, Hörmann A, Döring A, Heier M, Meisinger C, Schneider A, Kaup U, Gösele U, Hymer H. Koronare Herzkrankheit und akuter Myokardinfarkt. *Gesundheitberichterstattung des Bundes, Robert Koch Institut, Statistisches Bundesamt*, August 2006: 17-18.

- Lusis AI, Mar R, Pajukanta P. Genetics of atherosclerosis. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2004;5: 189-218.
- Mackman N, Morrissey JH, Fowler B, Edgington TS. Complete sequence of the human tissue factor gene, a highly regulated cellular receptor that initiates the coagulation protease cascade. *Biochemistry* 1989;28: 1755-1762.
- Mackman Nigel. Regulation of the tissue factor gene. *FASEB J.* 1995;9: 883-889.
- Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steq PG, Freyssinet JM, Tedqui A. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation.* 2000;101: 841-843.
- Marmur JD, Rossikhina M, Guha A, Fyfe B, Friedrich V, Mendlowitz M, Nemerson Y, Taubmann MB . Tissue factor is rapidly induced in arterial smooth muscle after balloon injury. *J clin Invest.* 1993;91: 2253-2259.
- Misumi K, Ogawa H, Yasue H, Soejima H, Suefuji H, Nishiyama K, Takazoe K, Kugiyama K, Tsuji I, Kumeda K, Nakamura S. Comparison of plasma tissue factor levels in unstable and stable angina. *Am J Cardiol.* 1998;81: 22-26.
- Mizuno O, Ikeda U, Hojo Y, Fujikawa H, Katsuki T, Shimada K. Tissue factor expression in coronary circulation as a prognostic factor for late restenosis after coronary angioplasty. *Cardiology.* 2001;95: 84-89.
- Moons AHM, Levi M, Peters RJG. Tissue factor and coronary artery disease. *Cardiovascular Research.* 2002;53: 313-325.
- Morrissey JH, Fakhrai H, Edgington TS. Molecular cloning of the cDNA for tissue factor, the cellular receptor for the initiation of the coagulation protease cascade. *Cell.* 1987;50: 129-135.

- Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, Böing AN, Romijn FP, Westendorp RG, Hack CE, Sturk A. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood*. 2000;95: 930-935.
- Ohishi M, Fujii K, Minamino T, Higaki J, Kamitani A, Rakugi H, Zhao Y, Mikami H, Miki T, Ogihara T. A potent genetic risk factor for restenosis. *Nat Genet*. 1993;5: 324-325.
- Osterud B, Bajaj MS, Bajaj SP. Sites of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) and tissue factor expression under physiologic and pathologic conditions. on behalf of the subcommittee on tissue factor pathway inhibitor (TFPI) of the scientific and standardization committee of the ISTH." *Thromb Rest*. 1986;41: 873-875.
- Ott I, Koch W, von Beckerath N, de Waha R, Malawaniec A, Mehilli J, Schömig A, Kastrati A. Tissue factor promotor polymorphism is associated with increased risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 2004;177: 189-191.
- Ott I Tissue Factor (TF). *Haemostaseologie: Grundlagen, Diagnostik und Therapie*, von Madlener Pötzsch, 130. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2010.
- Rauch U, Nemerson Y. Circulating tissue factor and thrombosis. *Curr opin Hematol*. 2000;7: 273-277.
- Rigat B, Hubert C, Alhenc Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990;86: 1343-1346.
- Roque M, Reis E, Fuster V, Padurean A, Fallon J, Taubman M, Chesbro J, Badimon J. Inhibition of tissue factor reduces thrombus formation and intimal hyperplasia after porcine coronary angioplasty. *J Am Coll of Cardiol*. 2000;36: 2303-2310.
- Sambola A, Osende J, Hathcock J, Degen M, Nemerson Y, Fuster V, Crandall J, Badimon JJ. Role of risk factors in the modulation of tissue factor activity and blood thrombogenicity. *Circulation*. 2003;107: 973-977.

- Sans S, Kesteloot H, Krohout D. the burden of cardiovascular diseases mortality in europe, task force of the european society of cardiology on cardiovascular mortality and morbidity statistics in europe. *European Heart Journal*. 1995;18: 1231-1248.
- Sato Y, Asada Y, Marutsuka K, Hatakeyama K, Sumiyoshi A. Tissue factor induces migration of cultured aortic smooth muscle cells. *Thromb Haemost*. 1996;75: 389-392.
- Sato Y, Asada Y, Marutsuka K, Hatakeyama K, Kamikubo Y, Sumiyoshi A. Tissue Factor pathway inhibitor inhibits aortic smooth muscle cell migration induced by tissue factor/factor VIIa complex. *Thromb Haemost*. 1997;78: 1138-1141.
- Scarpati EM, Wen D, Broze GJJr, Miletich JP, Flandermeyer RR, Siegel NR, Sadler JE. Human tissue factor: cDNA sequence and chromosome localization of the gene. *Biochemistry*. 1987;26: 5234-5238.
- Schömig A, Kastrati A, Mudra H, Blasini R, Schühlen H, Klauss V, Richardt G, Neumann FJ. Four-year experience with palmaz-schatz stenting in coronary angioplasty complicated by dissection with threatened or present vessel closure. *Circulation*. 1994;90: 2716-24.
- Schömig A, Neumann F-J, Kastrati A, Schühlen H, Blasini R, Hadamitzky M, Walter H, Zitzmann-Roth E-M, Richardt G, Alt E, Schmitt C, Ulm K. A randomized comparison of antiplatelet and anticoagulant therapy after the placement of coronary-artery stents. *N Engl J Med*. 1996;334: 1084-1089.
- Schömig A, Kastrati A, Elezi S, Schühlen H, Dirschinger J, Dannegger F, Wilhelm M, Ulm K. Bimodal distribution of angiographic measures of restenosis six months after coronary stent placement. *Circulation*. 1997;96: 3880-3887.
- Sigwart U, Puel J, Mirkovitch V, Joffre F, Kappenberger L. Intravascular stents to prevent okklusion and restenosis after transluminal angioplasty. *N Engl J Med*. 1987;12: 701-706.

- Soejima H, Ogawa H, Yasue H, Kaikita K, Takazoe K, Nishiyama K, Misumi K, Miyao Y, Yoshimura M, Kugiyama K, Nakamura S, Tsuji I. Angiotensin-converting enzyme inhibition reduces monocyte chemoattractant protein- 1 and tissue factor levels in patient with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 1999;34: 983-988.
- Soejima H, Ogawa H, Yasue H, Kaikita K, Nishiyama K, Misumi K, Takazoe K, Miyamoto S, Yoshimura M, Kugiyama K, Nakamura S, Tsuji I, Kumeda K. Heightened tissue factor associated with tissue factor pathway inhibitor and prognosis in patients with unstable angina. *Circulation.* 1999;99: 2908-2913.
- Speidel CM, Eisenberg PR, Ruf W, Edington TS, Abendschein DR. Tissue factor mediates prolonged procoagulant activity on the luminal surface of balloon injured aortas in rabbits. *Circulation* 1995;92: 3323-3330.
- Stamler J, Wentworth D, Neaton JD. Is the relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356, 222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *JAMA.* 1986;256: 2823–2828.
- Steppich BA, Ott I. Tissue-faktor im akuten koronarsyndrom. *Hämostaseologie.* 2006;2: 147-153.
- Steppich BA, Ott I. Tissue factor pathway inhibitor- TFPI. *Hämostaseologie: Grundlagen, Diagnostik und Therapie*, von Katharina Madlener Bernd Pöttsch, 146-157. Berlin Heidelberg: Springer, 2010.
- Szotowski B, Antoniak S, Poller W, Schultheiss HP, Rauch U. Procoagulant soluble tissue factor is released from endothelial cells in response to inflammatory cytokines. *Circ Res.* 2005;96: 1233-1239.
- Taubmann, MB. Tissue factor regulation in vascular smooth muscle:a summery of studies performed using in vivo and in vitro models. *Am J Cardiol.* 1993;72: 55c-60c.

- Thiruvikraman SV, Guha A, Roboz J, Taubman MB, Nemerson Y, Fallon JT. In situ localisation of tissue factor in human atherosclerotic plaques by binding of digoxigenin-labeled factors VIIa and X. *Lab Invest.* 1996;75: 451-461.
- Tiret L, Rigat B, Visvikis S, Breda C, Corvol P, Cambien F, Soubrier F. Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) controls plasma ACE levels. *Am J Hum Genet.* 1992;51: 197-205.
- Topol EJ, Serruys WJ. Frontiers in Interventional Cardiology. *Circulation.* 1998;98: 1802-1820.
- Topol EJ, Mark DB, Lincoff AM, Cohen E, Burton J, Kleiman N, Talley D, Sapp S, Booth J, Cabot CF, Anderson KM, Califf RM. Outcomes at 1 year and economic implications of platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade in patients undergoing coronary stenting: results from a multicentre randomised trial. EPISTENT investigators. Evaluation of platelet IIb/IIIa inhibitor for stenting. *Lancet.* 1999;354: 2019-2024.
- Van 't Hooft FM, von Bahr SJ, Silveira A, Iliadou A, Eriksson P, Hamsten A. Two common, functional polymorphisms in the promoter region of the beta fibrinogen gene contribute to regulation of plasma fibrinogen concentration. *Arterioscler Thromb vasc Biol.* 1999;19: 3063- 3070.
- Walter DH, Schächinger V, Elsner M, Dimmeler S, Zeiher AM. Platelet glycoprotein IIIa polymorphisms and risk of coronary stent thrombosis. *Lancet* 1997;350: 1217-1219.
- Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM, Gordon D. Localisation of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Nat Acad Sci USA.* 1989;86: 2839 - 2843.
- Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation.* 1998;97: 1837-1847.

Zhou SF. Polymorphism of human cytochrome P4502D6 and its clinical significance: part

II. *Clin Pharmacokinet.* 2009;48: 761-804.

Danksagung

Für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit zur Promotion sowie die geduldige Betreuung möchte ich mich bei Frau Prof. Ilka Ott bedanken.

Herrn Dr. Werner Koch danke ich für die freundliche Unterstützung und die wertvollen Ratschläge, ebenso allen Mitarbeitern des Labors der experimentellen Kardiologie des Deutschen Herzzentrums meinen herzlichen Dank.