

Klinik für Herz- und Kreislauferkrankungen,  
Deutsches Herzzentrum München des Freistaates Bayern, Technische Universität München  
(Direktor : Univ. Prof. Dr. A. Schömig)

Einfluss des IFNG T874A Genpolymorphismus und der IFNGR1 C-56T und IFNGR2 A839G  
Polymorphismen auf den klinischen Verlauf nach koronarer Stentimplantation

Judith Lengdobler

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Zahnheilkunde  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation :

1. Priv.-Doz. Dr. N. von Beckerath
2. Univ.-Prof. Dr. K.-L. Laugwitz
3. Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. (UMF  
Temeschburg) H.-H. Horch

Die Dissertation wurde am 10.07.2007 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 23.05.2007 angenommen.

**GEWIDMET**

**meinen ELTERN**

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>5</b>
1.1 Koronare Herzerkrankung .....	6
1.2 Koronare Stentimplantation .....	7
1.3 Restenose nach Stentimplantation .....	8
1.4 Thrombotische Ereignisse nach Stentimplantation .....	10
1.5 Möglicher Einfluss genetischer Faktoren bei der Entwicklung von Restenose und Thrombose nach Stentimplantation .....	12
1.6 Das Interferon- Gamma (IFN- $\gamma$ ) .....	14
1.7 IFN- $\gamma$ Polymorphismen.....	15
1.8 Fragestellung und Ziel der Studie .....	19
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>20</b>
2.1 Patienten und Kontrollen .....	20
2.2 Definitionen .....	21
2.3 Sequenzierung und DNA- Isolierung .....	22
2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	23
2.5 Das TaqMan – Assay.....	24
2.6 Angiographische Analyse .....	29
2.7 Material und Geräte .....	30
2.8 Studienendpunkte.....	32
2.9 Statistik .....	33

<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>34</b>
3.1 <i>Charakteristika der Patienten</i> .....	35
3.2 <i>Charakteristika der Läsionen und der Interventionen</i> .....	38
3.3 <i>Restenose</i> .....	41
3.4 <i>Akute und subakute thrombotische Ereignisse nach Stentimplantation</i> .....	43
3.5 <i>Langfristiger klinischer Verlauf (1 Jahr) nach Stentimplantation</i> .....	44
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>46</b>
4.1 <i>Restenose</i> .....	48
4.2 <i>Thrombotische Ereignisse</i> .....	49
4.3 <i>Andere Befunde zur Bedeutung der Polymorphismen im Interferon- <math>\gamma</math> Signalweg</i> .....	50
4.4 <i>Ergebnisbewertung</i> .....	51
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	<b>53</b>
<b>6. Danksagung</b> .....	<b>56</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>57</b>

## **1. Einleitung**

Perkutane Koronarinterventionen nehmen derzeit eine zentrale Rolle bei der Behandlung der koronaren Herzerkrankung ein. Nachdem die meisten technischen Probleme gelöst werden konnten, stellt die Restenose (erneute Verengung im Interventionsbereich) eine der wichtigsten Herausforderungen der interventionellen Kardiologie dar. Zahlreiche Studien belegen die entscheidende Rolle von Entzündungsmechanismen bei der Entstehung einer Restenose nach perkutaner Koronarintervention, ausgehend von einer überschießenden Proliferation der Neointima, die auf die Migration glatter Gefäßmuskelzellen aus der Mediaschicht der verletzten Gefäßwand zurückzuführen ist (Farb et al., 1999, Farb et al., 2002, Zohlhöfer et al., 2001).

Die Signaltransduktionskaskade des Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) spielt für Entzündungsmechanismen eine wichtige Rolle. Humanes IFN- $\gamma$  und sein Rezeptor, der sich aus zwei Untereinheiten zusammensetzt (IFNGR1 und IFNGR2), bilden den Ausgangspunkt für die komplexe Interaktion jener Moleküle, die für das gesteigerte Entzündungsgeschehen verantwortlich sind (Billiau, 1996). In verschiedenen Studien konnte der Einfluss genetischer Faktoren auf die Intensität entzündlicher Reaktionen des Körpers gezeigt werden (Billiau, 1996, Zohlhöfer et al., 2001).

Diese Thematik aufgreifend, überprüfen wir in dieser Arbeit die Hypothese, dass Polymorphismen einzelner Nukleotide der Gene, die das IFN- $\gamma$  und seine Rezeptoruntereinheiten IFNGR1 und IFNGR2 kodieren, nach vorausgegangener koronarer Stentimplantation mit dem Auftreten von Restenose, Myokardinfarkt beziehungsweise Tod assoziiert sind. Diese Hypothese basiert auf dem Ergebnis einer früheren Studie aus unserem Institut. An Gewebe aus Restenosematerial, welches man post implantationem mittels Atherektomie gewann, wurde gentechnisch die Expression von 2435 Genen analysiert.

Es zeigten sich in dieser Untersuchung 223 unterschiedlich exprimierte Gene im Vergleich zu Kontrollen aus muskulären Arterien des Gastrointestinaltraktes und aus unauffälligen Koronararterien von Patienten nach Herztransplantation (Zohlhöfer et al., 2001). 37 dieser Gene spiegelten die Aktivierung der IFN- $\gamma$  Signaltransduktionskaskade in glatten Gefäßmuskelzellen der Neointima (SMCs) wieder. In gezüchteten, glatten Muskelzellen verhinderte IFN- $\gamma$  die Apoptose. Darüber hinaus konnte an einem Restenose – Mausmodell gezeigt werden, dass eine genetische Unterbrechung der IFN- $\gamma$  Signaltransduktion die Gefäßproliferation signifikant verringert (Gupta et al., 1997).

Davon ausgehend wird vermutet, auch angesichts der wichtigen Rolle bei der Entwicklung der Arteriosklerose, dass IFN- $\gamma$  eine entscheidende Funktion bei der Entwicklung einer Restenose übernimmt (Gupta et al., 1997, Tellides et al., 2000).

## **1.1 Koronare Herzerkrankung**

Die koronare Herzerkrankung ist die Manifestation der Arteriosklerose an den Herzkranzgefäßen. Sie kann über einen multifaktoriellen Prozess, der zu einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffverbrauch (Ischämie) führt, als Angina pectoris, Myokardinfarkt, Herzrhythmusstörung, plötzlicher Herztod oder Herzinsuffizienz auftreten. Beeinflussbare Faktoren wie Hypercholesterinämie, Bluthochdruck, Tabakgenuss, körperliche Inaktivität, Diabetes mellitus wie auch nicht beeinflussbare Faktoren wie erbliche Belastung, männliches Geschlecht und zunehmendes Alter zählen zu den Risikofaktoren (Fuster et al., 1996). Trotz wesentlicher Fortschritte in Diagnostik und Therapie ist diese Krankheit gegenwärtig die häufigste Todesursache, besonders bei Männern über dem 40. und bei Frauen über dem 50. Lebensjahr. Studien

zeigen, dass eine familiäre Belastung bei ca. 30% der Erkrankten eine Rolle spielt (Myers et al., 1990), mit zunehmendem Alter jedoch die Gewichtung der umweltbedingten, beeinflussbaren Faktoren zunimmt (Ardissino et al., 1999).

## **1.2 Koronare Stentimplantation**

Neben der medikamentösen und chirurgischen Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen ist die Dilatation der Koronararterienstenosen mittels eines Ballonkatheters seit 1977 möglich, die sog. perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA). Diese Methode wurde von Andreas Grüntzig erstmals durchgeführt. Perkutane Koronarinterventionen nehmen seither eine zentrale Rolle bei der Behandlung koronarer Herzerkrankungen ein. 1987 wurde dieses Therapiespektrum mit der Einführung von Gefäßstützen (Stents) in die interventionelle Kardiologie (Sigwart et al., 1987) erweitert. Bereits seit 1969 waren Stents als feststehender Begriff durch Charles Dotter bekannt.

Durch randomisierte Studien wurde später (Serruys et al., 1994) gezeigt, dass der Einsatz von Gefäßstützen im Vergleich zur alleinigen Ballondilatation die Komplikationsrate senken und die klinischen Ergebnisse verbessern kann und die Restenoserate reduziert. Dies war möglich, da wesentliche Probleme der PTCA wie Dissektion der Koronararterie und akuter Koronarverschluss durch die Stentimplantation besser therapiert werden konnten. Vor, während, und nach der PTCA und Stentimplantation wird eine kombinierte antithrombozytäre Therapie eingesetzt, wodurch das Auftreten thrombotischer Frühkomplikationen signifikant reduziert werden konnte (Gawaz et al., 1996, Schömig et al., 1996). Trotz dieser Fortschritte werden die Erfolge immer noch durch das Auftreten von thrombotischen Verschlüssen

(Stentthrombosen, bis zu 1%) und die erneute Verengung (Restenose) des behandelten Gefäßabschnittes limitiert.

Die Entwicklung einer Restenose kann man bei etwa 20% der behandelten Patienten beobachten - v. a. Patienten mit Diabetes mellitus haben ein erhöhtes Risiko ( Schühlen et al., 2001).

### **1.3 Restenose nach Stentimplantation**

Nach der PTCA kommt es als Folge der durch die Dilatation verursachten Gefäßverletzung zu einem Verlust des initial erreichten Lumengewinns, der Ausmaße annehmen kann, in Abhängigkeit von der PTCA- Technik, den Stenosekriterien und individuellen Gegebenheiten, die von klinischer Bedeutung sind.

Das Substrat der Restenose ist die überschießend neu gebildete Intima (Neointima), welche sich aus glatten Gefäßmuskelzellen ableitet. Diese glatten Gefäßmuskelzellen, sog. SMCs (smooths muscle cells) wandern aus der Mediaschicht der Gefäßwand heraus in die verletzte Gefäßwand, vermehren sich und synthetisieren extrazelluläre Matrix (Farb et al., 1999, Grewe et al., 1997, Kearney et al., 1997). Diese ablaufenden Prozesse werden stark von Entzündungsmechanismen und Zytokinen beeinflusst (Schwartz 1998). Ursächlich für die Entwicklung einer Restenose ist primär die interventionsbedingte Endothelverletzung mit nachfolgender Plättchenaggregation und dadurch ausgelöste Freisetzung von Wachstumsfaktoren (z.B. „platelet derived growth factor“, PDGF) anzusehen. Als weitere mögliche Faktoren werden die initiale Interaktion von Thrombozyten mit der verletzten Gefäßwand und die Infiltration von Leukozyten diskutiert, denn ca. eine Woche nach Stentimplantation kommt es zu einer Entzündungsreaktion in der Gefäßwand mit einer

massiven Infiltration von Leukozyten. Dieser Prozess kann weitere, aktivierend wirkende Substanzen, wie z.B. FGF (Fibroblast Growth Factor) freisetzen, die zu einer zusätzlichen Stimulation der glatten Gefäßmuskelzellen führen. Farb und Grewe konnten zeigen, dass erst 3 Monate nach dem Eingriff eine vollständige Abdeckung der inneren Gefäßwand mit Endothel erreicht wird (Grewe et al., 2000). Diese Feststellung führt zu der Annahme, dass das Fehlen des Endothels in der Früh- und Intermediärphase der Stenteinheilung ein Kofaktor für die exzessive Proliferation der glatten Muskelzellen darstellt (Walter et al., 1997). Den oben beschriebenen Mechanismen kann eine Entdifferenzierung der ortständigen und kontraktile glatten Muskelzellen der Media folgen, die daraufhin in der Lage sind, in Richtung Intima zu wandern, und große Mengen an extrazellulärer Matrix zu synthetisieren (Hoffmann et al., 1996, MacLeod et al., 1994). Circa 14 Tage post implantationem ist die Ausbildung dieser Neointima in histologischem Material nachweisbar (Grewe et al. 2000, Komatsu et al., 1998). Der initial durch die Stentimplantation erreichte Lumenzuwachs kann durch eine überschießende Entwicklung des neointimalen Gewebes wieder teilweise verloren gehen und es kann zu einer relevanten Restenosierung kommen. Kastrati et al. (1993) und Grewe et al. (2000) stellten in klinischen und pathologisch- anatomischen Studien fest, dass der Prozess der Neointimabildung durchschnittlich 3- 6 Monate dauert.

Definitionsgemäß (angiographisch) liegt eine Restenose vor, wenn es innerhalb der ersten sechs Monate nach Implantation zu einer Lumeneinengung mit einer mehr als 50%ger Reduktion des Gefäßdurchmessers im dilatierten Abschnitt gekommen ist (Schömig et al., 1997). Folgende Faktoren erhöhen zudem die Restenoserate :

- Implantation mehrerer Stents in eine Stenose
- Implantation in Gefäße mit einem Durchmesser von  $\leq 3,0$  mm
- Langstreckige Stenosen und Koronarverschluss
- Diabetes mellitus Erkrankung

Die Rate an notwendig gewordenen Reinterventionen während der ersten 12 Monate nach erfolgtem Eingriff stellen ein alternatives Maß für eine Restenose dar ( klinische Restenose ). Exakt definiert sich die klinische Restenose als eine angiographische Restenose mit der Notwendigkeit zur Reintervention oder Bypass- OP aufgrund von klinischen Zeichen der Ischämie wie zum Beispiel Angina pectoris Beschwerden des Patienten.

Bei 15 - 20% aller mit Gefäßstützen therapierten Patienten kann diese Komplikation beobachtet werden (Schühlen et al., 2001).

#### ***1.4 Thrombotische Ereignisse nach Stentimplantation***

Der thrombotische Verschluss des mit einem Stent behandelten Gefäßsegmentes innerhalb der ersten 30 Tage nach Intervention (subakute Stentthrombose) ist eine der gefährlichsten Komplikationen nach koronarer Implantation und bei ca. 1% aller Patientenfälle zu verzeichnen. In klinischen Studien wird für die Analyse der thrombotischen Frühkomplikationen oft ein zusammengesetzter Endpunkt, bestehend aus Tod, Myokardinfarkt, angiographisch dokumentierter Stentthrombose und dringlicher Revaskularisierung des Zielgefäßes innerhalb der ersten 30 Tage verwendet. Durch dieses Vorgehen werden alle relevanten thrombotischen Ereignisse erfasst. Thrombotische Ereignisse können aber auch noch später auftreten. Untersuchungen an verstorbenen Patienten haben gezeigt (Grewe et al., 2001), dass durch das Einsetzen eines ballonexpandierten Stents die Endothelschicht weitgehend zerstört wird; thrombogene Strukturen des Subendothels wie Kollagen, Fibronectin und Laminin werden somit an die Oberfläche transportiert.

Versuche im Tiermodell und an pathologisch - anatomischen Präparaten belegen die Theorie, dass eine ausgeprägte Verletzung des Endothels in der frühen Phase nach dem invasiven

Eingriff die Ausbildung einer dünnen, membranösen Thrombusschicht auf der verletzten Gefäßwand bedingt; hinzu kommt die Thrombogenität der metallenen Stentoberfläche (Hermann et al., 1998), die bereits in der Frühphase zur Ausbildung einer dünnen Thrombusschicht auf der Oberfläche der Stentstreben führt (Gonschior et al., 1995, Grewe et al., 1997). Zeitgleich mit ihrer Adhäsion werden die Thrombozyten aktiviert und verschiedene vasoaktive Substanzen (z.B. Serotonin, Thromboxan A<sub>2</sub>) und auch Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF, epidermaler Wachstumsfaktor, transformierender Wachstumsfaktor-β) werden freigesetzt (Gawaz et al., 1996). Zusätzlich werden auch Leukozyten durch die bereits aktivierten Thrombozyten angeregt (Mc Ever, 1994, Neumann et al., 1996, Ott et al., 1996). Bei akutem Koronarsyndrom (Myokardinfarkt, instabile Angina pectoris) sind die Thrombozyten zum Teil aber bereits vor Intervention aktiviert (Gawaz et al., 1996). Mitentscheidend für das Auftreten einer subakuten Stentthrombose ist demnach das Ausmaß der Thrombozytenaktivierung und der resultierenden Degranulation im Verlauf nach der Stentimplantation (Gawaz et al., 1996). Diese Erkenntnisse verdeutlichen die Bedeutung der Thrombozytenfunktion im frühen Verlauf nach koronarer Stentimplantation für die Entwicklung thrombotischer Komplikationen. Somit ist es einleuchtend, dass durch den Einsatz einer kombinierten antithrombozytären Therapie (ASS und Ticlopidin bzw. ASS und Clopidogrel) die Inzidenz subakuter Stentthrombosen und anderer thrombotischer Ereignisse – im Vergleich zu früher verwendeten Antikoagulantien- drastisch gesenkt werden konnte (Gawaz et al., 1998, Lefkovits et al., 1997, Neumann et al., 1996, Schömig et al., 2000, The EPISTENT Investigators, 1998 ).

### **1.5 Möglicher Einfluss genetischer Faktoren bei der Entwicklung von Restenose und Thrombose nach Stentimplantation**

Komplexe Erkrankungen wie Diabetes mellitus, rheumatoide Arthritis und auch die koronaren Herzerkrankungen entstehen durch das Zusammenspiel exogener Faktoren und, sehr wahrscheinlich, einer Vielzahl genetischer Faktoren. Aus diesem Grund wird seit Jahren versucht, genetische Faktoren bei der Entstehung dieser Erkrankungen zu identifizieren mit dem langfristigen Ziel, neue Therapieansätze zu schaffen.

Dabei sind vor allem Genpolymorphismen interessant- es handelt sich hierbei um häufig vorkommende Varianten der genomischen DNA. Per definitionem kommt das seltenste Allel mit einer Frequenz  $> 1\%$  in der untersuchten Population vor. Die meisten der untersuchten Polymorphismen fallen unter den Begriff der Einzelbasenpolymorphismen (single nucleotide polymorphism, SNPs), die im Abstand von etwa 1000 Basen im menschlichen Genom vorkommen. Prinzipiell kann ein Polymorphismus die Quantität und/ oder die Qualität des Genproduktes verändern. Beispiele zeigen, dass Polymorphismen eines Gens Transkription und Expression des Gens beeinflussen können (van 't Hooft et al, 1999) - hierbei verändert sich häufig die Bindungsstelle für einen oder mehrere Transkriptionsfaktoren. In anderen Fällen konnte gezeigt werden, dass Genpolymorphismen einen Einfluss auf die Stabilität und das Zuschneiden der Messenger RNA (mRNA) haben können (Siffert et al., 1998). Auch sind Austausch einer Aminosäure (AS) oder andere Veränderungen der Aminosäuresequenz des Genproduktes basierend auf Polymorphismen bekannt. Folge sind erhebliche Veränderungen der Proteinfunktion. Des Weiteren kann der Austausch einer AS zum Einfügen (Tesauro et al., 2000) oder Wegfallen (Nicolaes et al., 2002) einer Schnittstelle für Proteasen führen. Dadurch kann wiederum die Menge an verfügbarem Genprodukt beeinflusst werden. Anzunehmen ist auch, dass Genpolymorphismen nicht nur Einfluss auf die Entstehung

komplexer Erkrankungen haben, sondern auch auf das Ansprechen der Patienten auf die verschiedenen Therapieformen.

Relevant für die vorliegende Arbeit ist der Einfluss von Genpolymorphismen auf das Auftreten bestimmter Komplikationen nach koronarer Stenimplantation: Am Beispiel der Ausbildung der Restenose gelang es unserer Arbeitsgruppe bereits vor einigen Jahren zu zeigen, dass personengebundene, aber unbekannte (möglicherweise genetische) Faktoren das Restenosierisiko beeinflussen (Schömig et al., 1997). Das Ausmaß der Restenosierung 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 sprach für zwei Untergruppen, die unterschiedliche Neigungen für die Ausbildung einer Restenose aufwiesen. Eine andere Studie hob hervor, dass das Risiko der Restenose um das Zweieinhalbfache erhöht ist, wenn bei demselben Patient bereits in einen anderen Gefäßabschnitt eine Restenose festgestellt wurde. Wichtig zu erwähnen ist hierbei, dass zuvor eine multivariate Analyse durchgeführt worden war, um die Unabhängigkeit dieses Einflusses von anderen bekannten Risikofaktoren für die Ausbildung einer Restenose wie z. B. Diabetes mellitus zu belegen (Kastrati et al., 1997).

Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass einige Polymorphismen in Genen von kardiovaskulären Schlüsselproteinen tatsächlich mit einem günstigen / ungünstigen Verlauf nach koronarer Stentimplantation assoziiert sind: Das P1<sup>A2</sup> Allel des Glykoprotein III a (eine der beiden Untereinheiten des thrombozytären Fibrinogenrezeptors GP II/ IIIa) ist mit einer erhöhten Inzidenz von thrombotischen Ereignissen (Kastrati et al., 2000, Walter et al., 1997) sowie mit einer erhöhten Restenoserate (Kastrati et al., 1999) assoziiert. Zudem gelang es unserer Arbeitsgruppe zu zeigen, dass das Allel 2 des Gens des Interleukin1- Rezeptor-

Antagonisten (II-1RN\*<sup>2</sup>) vor der Ausbildung einer Restenose nach Stentimplantation schützen kann (Kastrati et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit haben wir die mögliche Assoziation dreier funktionell bedeutsamer Polymorphismen innerhalb des IFN- $\gamma$ , IFN- $\gamma$  Rezeptor 1 und des IFN- $\gamma$  Rezeptor 2 Gens (IFNG, IFNGR1 und IFNGR2) mit dem klinischen Verlauf nach koronarer Stentimplantation untersucht. IFN- $\gamma$  spielt eine bedeutende Rolle in dem komplexen Entzündungsgeschehen das zur Restenose führt. Unseren Überlegungen vorausgegangen waren die Ergebnisse der Forschungsgruppe um Frau Dr. Zohlhörer (2001), die bei der Analyse der Expression von 2435 Genen in restenotischem Material 223 unterschiedlich exprimierte Gene identifizieren konnte, von denen 37 Gene bei der Aktivierung der IFN- $\gamma$  Signaltransduktionskaskade in neointimalen SMCs eine Rolle spielen.

## **1.6 Das Interferon- Gamma (IFN- $\gamma$ )**

Der Namen Interferon beschreibt die Beobachtung, dass diese Proteine mit der viralen Replikation „interferieren“. Die Einteilung erfolgt in drei Gruppen, Interferon - $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ . Beim IFN- $\gamma$  tritt diese antivirale Wirkung eher in den Hintergrund. Stattdessen wirkt es aktivierend auf mononukleäre Zellen. Im Organismus wird das IFN- $\gamma$  primär von aktivierten T- Zellen produziert und zusammen mit IL- 2 freigesetzt. Es bindet an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche von Monozyten und Makrophagen, die so für die Abwehr von Pathogenen und für die Elimination von entarteten Zellen aktiviert werden.

So werden jene zur Produktion von Proteasen, Interleukin-1, Tumornekrosefaktor und Plättchenaktivierenden-Faktor (PAF) stimuliert. Zusätzlich steigert IFN- $\gamma$  die

Phagozytoseleistung von Monozyten und Makrophagen durch Induktion des sogenannten Respiratory burst, bei dem toxische Sauerstoffderivate ausgeschüttet werden, wodurch die Makrophagen eine gesteigerte bakterizide, fungizide und protoizide Wirkung entfalten können. Ferner induziert und steigert das IFN- $\gamma$  die Expression von MHC (major histocompatibility complex)- Molekülen der Klassen I und II, die Aktivität natürlicher Killerzellen und die antikörperabhängige zellvermittelnde Zytotoxizität. Dieses Zytokin ist schließlich auch an der Bildung zytotoxischer T- Lymphozyten sowie an der Reifung und Differenzierung von B- Lymphozyten beteiligt.

IFN- $\gamma$  ist ein Glykoprotein, das aus 146 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von ca. 22 kDa (1kDa = 1000 Dalton) besitzt. Zwei identische Proteinketten assoziieren in vivo zu einem aktiven Dimer. Das kodierende Gen ist auf Chromosom 12q14.1 lokalisiert und beinhaltet 5 Exons (Aminosäure kodierende Sequenzen) und 4 Introns ( nicht kodierende Sequenzen). Die Rezeptoruntereinheit 1 (IFNGR1) setzt sich aus 7 Exons und 6 Introns zusammen und findet sich auf dem Chromosom 6q23.2. Das Gen der Rezeptoruntereinheit 2 (IFNGR2) besteht ebenfalls aus 7 Exons und ist auf Chromosom 21q22.11 lokalisiert. IFN- $\gamma$  Rezeptor 2 ist ein Mitglied der Zytokin- Rezeptor- II Familie. Jedes der Gene weist Polymorphismen in der Struktur auf (Pravica et al., 2000).

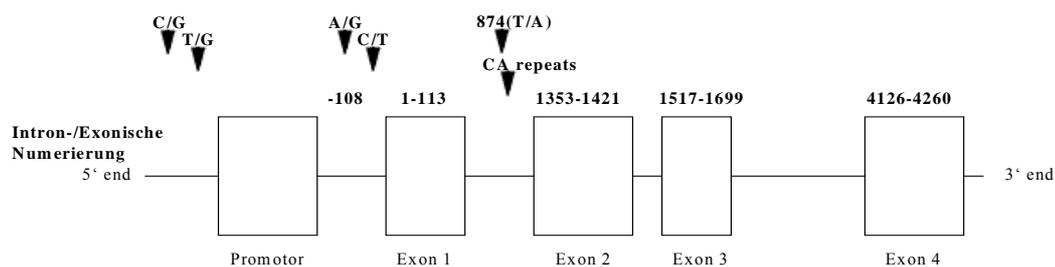
### **1.7 IFN- $\gamma$ Polymorphismen**

Zur Evaluation der Rolle genetischer Einflüsse auf den klinischen Verlauf nach koronarer Stentimplantation kommen eine große Anzahl verschiedene Genpolymorphismen der Gene dieser Signaltransduktionskaskade primär in Frage. Die Auswahl wird eingeschränkt durch die Verteilung dieser Polymorphismen sowie die Qualität und Quantität der vorbeschriebenen

funktionellen Daten. Für die weitere Eingrenzung und Auffinden von erfolgsversprechenden Polymorphismen haben wir das IFN- $\gamma$  Gen sequenziert. Die Ergebnisse werden im Ergebnisteil weiter behandelt. Nach Evaluation unserer Daten sowie der vorhandenen funktionellen Daten haben wir den IFN- $\gamma$  Einzelbasenpolymorphismus (Single nucleotide Polymorphism SNP) mit Austausch des Nukleotids T mit A an Position 874 im ersten Intron des humanen IFN- $\gamma$  Gens in unserer Studie untersucht. Dieses liegt am 5' Ende einer polymorphen CA- Wiederholungssequenz mit unterschiedlicher Anzahl der Wiederholungen (Repeats) sowie innerhalb einer NF $\kappa$ B- Bindungsstelle mit spezieller Assoziation von NF $\kappa$ B zu jener Allelsequenz, die ein T an der 874 Position enthält (T874A) (Pravica et al., 2000). Weiterhin besteht eine Assoziation des 874 T Allels mit dem Vorhandensein der 12 CA Wiederholungseinheiten, für die in vitro bereits eine erhöhte IFN- $\gamma$  Produktion gezeigt werden konnte (Pravica et al., 1999).

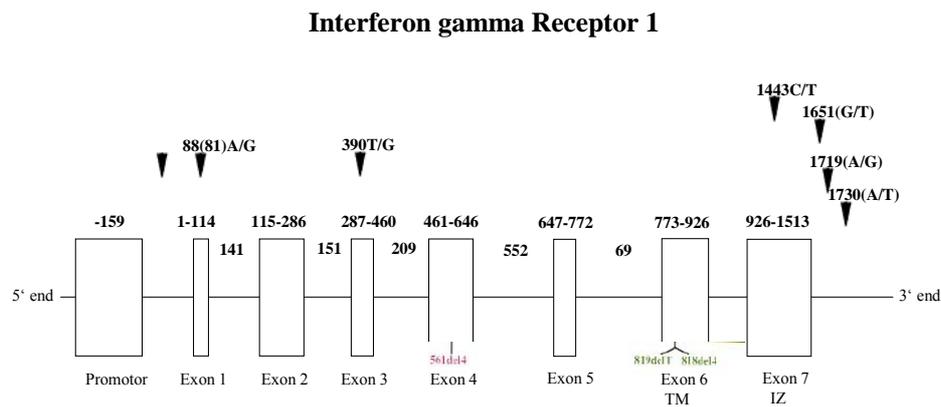
### Abbildung 1 :

#### Interferon gamma



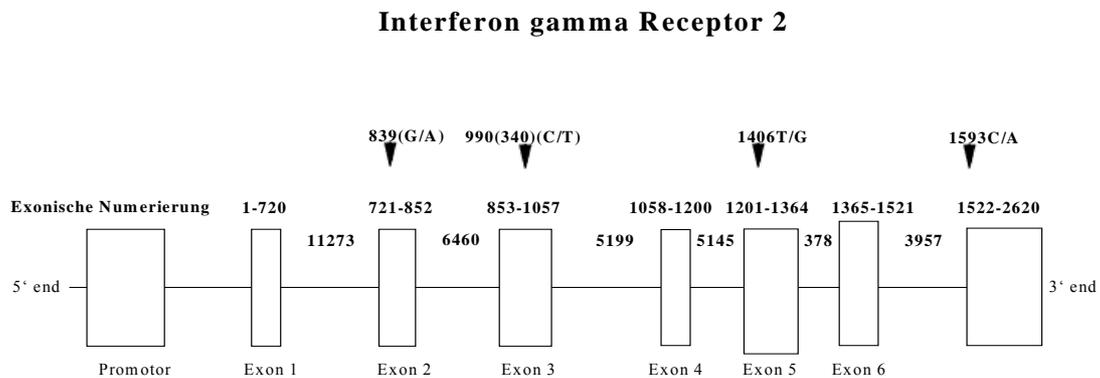
Der IFNGR1 C-56T Polymorphismus befindet sich in der Promoterregion von IFNGR1. Das T Allel ist mit einer geringere Morbidität gegenüber einer *Helicobacter pylori* Infektion und mit einer erhöhte Konzentration an anti- *Helicobacter pylori* Antikörpern assoziiert. Dies kann auf eine Verschiebung des Th1/ Th2 Gleichgewichtes der T- Helferzellen in Richtung Th2 zurück zu führen sein, die wiederum auf eine verminderte IFN- $\gamma$  Rezeptor 1 Funktion beruht (Tye et al., 2003).

### Abbildung 2:



Der IFNGR2 Polymorphismus (A839G) ist Teil eines Genpools, der weitere Rezeptorgene einschließt, unter anderem das den Interleukin- (IL-) 10 Rezeptor kodierende Gen (Reboul et al., 1999). Der für uns relevante IFNGR2 Polymorphismus ist im zweiten Exon lokalisiert, konnte aber funktionell noch nicht endgültig charakterisiert werden. Er führt zu einem Austausch der Aminosäuren Glutamin und Arginin an Position 64.

### **Abbildung 3 :**



Weitere Assoziationen der untersuchten Polymorphismen IFN- $\gamma$ , IFNGR1 und IFNGR2 zu verschiedenen Erkrankungen wurden in anderen Studien abgehandelt (z.B. Nakao et al., 2001, Nakashima et al., 1999).

Somit wurden der gut charakterisierte und gleichmäßig verteilte Polymorphismus T874A des IFN- $\gamma$  Gens, von dem eine Assoziation mit der IFN- $\gamma$  Protein Produktion gezeigt werden konnte (Pravica et al., 1999), der IFNGR1 C-56T Promoterpolymorphismus und der zu einem Aminosäureaustausch führende Polymorphismus A839G des IFN- $\gamma$  Rezeptor 2 Gens für die weiteren Untersuchungen ausgewählt.

## **1.8 Fragestellung und Ziel der Studie**

Obwohl viel über Polymorphismen in Zytokinen berichtet wird, ist immer noch relativ wenig über die funktionelle Bedeutung für die Transkription, mRNA- Prozessierung und Translation und den daraus entstehenden Einfluss auf kardiovaskuläre Ereignisse bekannt.

Vorrangiges Ziel der vorliegenden Arbeit war es also, bestehende Zusammenhänge des IFN- $\gamma$  Polymorphismus und den Polymorphismen der IFN- $\gamma$  Rezeptor 1 und 2 Untereinheiten (IFNGR1, IFNGR2) mit Restenose und anderen kardiovaskulären Ereignissen nach koronarer Stentimplantation zu untersuchen. Den Anstoß für unsere Arbeit lieferte die Arbeitsgruppe um Frau Dr. Zohlhöfer (2001) mit den Ergebnissen ihrer Genexpressionsstudie, die an restenotischem Gefäßmaterial- mittels Atherektomie gewonnen- eine gesteigerte Expression von Genen, die in unmittelbarem Zusammenhang mit IFN- $\gamma$  stehen nachwies. Angesichts der funktionellen Daten analysierten wir die Hypothese, dass Einzelbasenpolymorphismen innerhalb dieser Gene mit restenotischen und thrombotischen Ereignissen assoziiert sind. Hierzu wurden in einem Kollektiv von 2591 konsekutiven Patienten mit koronarer Herzerkrankung (KHK) und koronarer Stentimplantation der jeweilige Genotyp mittels allelspezifischer Fluoreszenzfarbstoff-markierter DNA-Sonden bestimmt, die anamnestischen, klinischen und angiographischen Daten erfasst und diese Daten mittels statistischer Analysen untersucht.

Unsere Studie, basierend auf die oben genannten Daten, ist unseren Wissens nach die erste Arbeit, die an einer umfassenden Patientenpopulation doppelblind die Auswirkung von Polymorphismen der IFN- $\gamma$  Signaltransduktionskaskade auf den klinischen Verlauf nach koronarer Stentimplantation untersucht.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Patienten und Kontrollen**

Die Studie umfasst 2591 konsekutive Patienten kaukasischen Ursprungs mit koronarer Herzerkrankungen, bei denen am Deutschen Herzzentrum München oder der 1. Medizinischen Klinik des Klinikums Rechts der Isar der Technischen Universität München eine Koronarangiographie und eine koronare Stentimplantation durchgeführt wurden. Alle Patienten, die an der Studie teilgenommen haben, gaben nach eingehender Aufklärung Ihr schriftliches Einverständnis für die Angiographie, die Intervention und für die Genotypisierung. Die Einteilung erfolgte nach Alter, Geschlecht und kardiovaskulären Risikofaktoren. Ausschlusskriterien waren das Alter über 75 Jahre waren oder ein Myokardinfarkt als Grund für die Koronarintervention.

Vor der Stentimplantation erhielten alle Patienten 500mg Acetylsalicylsäure ASS i.v. sowie Heparin i.v. als Bolus (5000 IE). Die perinterventionelle Therapie bestand aus der Gabe von Heparin i.v. als Bolus (10000 UE) mit anschließender Infusion über 12 Stunden (1000 UE/Stunde). Die koronare Stentimplantation erfolgte wie bereits in früheren Arbeiten beschrieben (Schömig et al., 1994, Schömig et al., 1996). Die postoperative Therapie umfasste 2 x 100 mg Acetylsalicylsäure auf Dauer und Ticlopidin 2 x 250 mg/d (Tiklyd, Sanofi-Winthrop, München), oder Clopidogrel 75 mg (Iscover, Sanofi- Winthrop, München) 1-mal täglich für 4 Wochen. Patienten mit erhöhtem Thromboserisiko erhielten eine zusätzliche Gabe des Glykoprotein IIb/IIIa Rezeptorantagonisten Abciximab als Bolusinjektion während der Stentimplantation und als anschließende Infusion über 12 h (ReoPro, Lilly Deutschland GmbH, Bad Homburg). Die Entscheidung, Abciximab zu verabreichen unterlag allein dem Operateur.

Bei 76,8% der Patienten konnte 6 Monate nach Stentimplantation eine erneute Koronarangiographie durchgeführt werden. Postinterventionell wurden die Kreatinkinase (CK) Spiegel und mögliche EKG-Veränderungen systematisch über 48 Stunden bestimmt. Weiterhin erfolgte eine systematische Nachverfolgung der klinischen Ereignisse über den Zeitraum eines Jahres nach Intervention.

Das Untersuchungsprotokoll stimmte mit der Deklaration von Helsinki überein und wurde vom internationalen Ethikkomitee genehmigt.

## **2.2 Definitionen**

Die Diagnose eines Myokardinfarktes wurde im 12-Kanal EKG durch das Auftreten einer neuen, pathologischen Q-Welle gestellt, des weiteren durch ein Ansteigen der CK und der CK-MB Isoenzyme auf mehr als das Dreifache des oberen Normwertes. Ein Myokardinfarkt wurde als akut definiert, wenn der Abstand von Schmerzbeginn bis zum Zeitpunkt der Intervention nicht länger als 72h war und ST-Hebungen ( $> 2\text{mm}$ ) in zwei benachbarten EKG-Ableitungen dokumentiert wurden. Eine systemische, arterielle Hypertonie wurde bei systolischen Blutdruckwerten  $\geq 140\text{ mmHg}$  und/ oder diastolischen Blutdruckwerten  $\geq 90\text{ mmHg}$  bei mindestens zwei separaten Messungen diagnostiziert. Als Diabetiker wurden die Patienten eingestuft, wenn sie insulinpflichtig waren oder orale Antidiabetika einnahmen; entsprechend den WHO Kriterien wurde diese Diagnose auch für diätetisch eingestellte Diabetiker vergeben, wenn der Glukosetoleranztest pathologisch ausfiel und / oder während des Klinikaufenthaltes bei zwei stressfreien Blutentnahmen (nüchtern) erhöhte Blutzuckerwerte ( $>140\text{ mg/dl}$ ) festgestellt werden konnten (World Health Organisation Study Group, 1985). Die Personen, die während der letzten 6 Monate regelmäßig rauchten, galten

als Raucher. Eine Hypercholesterinämie lag vor bei einer Serumcholesterinkonzentration (nüchtern)  $\geq 240$  mg/ dl.

### **2.3 Sequenzierung und DNA- Isolierung**

Zur Evaluation relevanter Polymorphismen wurde bei 22 zufällig ausgewählten Patienten unseres Institutes der gesamte, etwa 6500 Basenpaare (bp) umfassende IFNG Locus sequenziert. 25 verschiedene Primer mit einem Intervall von 250- 350 Basenpaaren, die eine Spanne von 6650 bp und die dazwischen gelegenen 4 Exons und Introns umfassten, wurden dafür selektiert. Die Sequenz beider DNA- Stränge (vorwärts, rückwärts) wurden mit Hilfe des BigDye<sup>®</sup> Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Pat. Nr. 4336776) und dem ABI Prism 3100 Kapillar- Sequenzierungssystem (Applied Biosystems, Weiterstadt) bestimmt.

Dabei wurden 8 Polymorphismen gefunden; keiner führte zu einem Austausch einer Aminosäure. Die Verteilung der jeweiligen Allele war für die statistische Aussagekraft des IFNG Intron 1 T874A Polymorphismus am besten ausgeglichen mit etwa gleichem Vorkommen des T und des A Allels, so dass eine ausreichende Genhäufigkeit für eine statistische Auswertung mit entsprechender Power in unserer Population ermöglicht wurde. Aufgrund der Ergebnisse der IFNG Locus Sequenzierung, wurde beim IFNGR1- und 2 Gen auf eine aufwendige Sequenzierung verzichtet und der am jeweils besten charakterisierte Polymorphismus mit der günstigsten Verteilung, der C-56T Polymorphismus (IFNGR1) und der A839G Polymorphismus (IFNGR2), für die weitere Analyse gewählt. Unsere analysierten Sequenzen wurden mit den früher beschriebene Sequenzen (GenBank accession

no.AF375790) verglichen und die festgestellten polymorphen Stellen mit denjenigen verglichen, die in NCBI's dbSNP verfügbar sind.

Zur Genotypisierung wurde die genomische DNA aus 200µl peripherem Blut gewonnen, verwendet wurden dabei handelsübliche Extraktionssysteme (Qiagen, Hilden, und Roche Molecular Biochemicals., Mannheim). Folgende Stadien wurden durchlaufen: Lyse der Zellen, Bindung der DNA, Reinigung, Isolierung. Die reinen DNA – Proben wurden bei –18° C gelagert. Genotypischen Analysen erfolgten unter Verwendung von fluoreszierenden Oligonucleotidsonden (TaqMan Assay) oder Restriktionsenzymen. Beide Methoden basieren auf der Polymerasekettenreaktion (PCR).

## **2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die PCR erlaubt als zyklischen Verfahren die in vitro Amplifizierung von spezifischen Nukleinsäure-Fragmenten. In dem PCR- Gerät (Thermocycler) wird der DNA – Doppelstrang zunächst durch Erhöhung der Temperatur auf 95°C denaturiert; anschließend wird das Gemisch auf ca. 60°C abgekühlt und zwei aus ca. 15- 25 Basen bestehende synthetische Oligonucleotide (Primer) binden an die jeweiligen Enden des einen DNA- Stranges bzw. des komplementären Gegenstranges (Annealing). Somit sind zwei Startpunkte für die Polymerasereaktion definiert, wobei die Richtungen dieser beiden Polymerasereaktionen aufeinander zu und schließlich überlappend verlaufen. Durch die thermostabile Taq- (DNA) Polymerase, welche man heute aus verschiedenen, thermophilen Archaeobakterien isoliert, werden die beiden Einzelstränge in einer geeigneten Pufferlösung zum jeweiligen Doppelstrang komplementär gebildet. Als Bausteine dienen die ebenfalls im Puffer gelösten Nukleotide (dNTP).

Diese Reaktionszyklen werden mehrfach wiederholt; daraus ergibt sich ein exponentieller Anstieg der amplifizierten DNA-Moleküle.

## **2.5 Das TaqMan – Assay**

Diese Methodik basiert auf dem 5' Nuklease Assay (34). Für die Reaktion sind ein Primerpaar und zwei für die beiden Allele spezifische DNA- Sonden erforderlich. Die beiden Sonden sind Oligonucleotide, die jeweils zum DNA- Abschnitt mit der polymorphen Stelle komplementär sind. Sie werden mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (Reporterfarbstoff am 5' Ende und Quencherfarbstoff am 3' Ende) markiert (siehe Abbildung 4).

Die Taq-DNA-Polymerase besitzt eine 5'-3'-Exonuklease- Aktivität, die eine, während einer PCR an einen DNA-Strang hybridisierte, komplementäre Sonde schneidet und zerstört. Schneiden der fluoreszierenden Sonde führt zur räumlichen Trennung der beiden Farbstoffe und damit zu einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität des Reporterfarbstoffes. Die Nähe des Quencherfarbstoffes zum Reporterfarbstoff unterdrückt die Fluoreszenz bei der nicht komplementären, somit nicht gebundenen und damit intakten Sonde (siehe Abbildung 4). Die Sondenfragmente werden dann entfernt und die PCR wird fortgesetzt. Die Bestimmung des Genotyps erfolgt durch Auswertung der allelspezifischen Fluoreszenzsignale. Verwendung findet dabei das ABI Prism Sequence Detection System 7700 (Livak et al., 1999). Die Primer und die komplementären Sonden wurden mit Hilfe der „Primer Express“ Software ausgewählt, basierend auf Sequenzen, die zu einem früherem Zeitpunkt analysiert worden waren (GenBank accession no. AF375790 für IFNG, AY594694 für IFNGR1 und NM 005534 für IFNGR2). Von jedem Sondenpaar wurde je eine Sonde mit dem fluoreszierenden

Reporter-Farbstoff 6- Carboxyfluoreszin (FAM), die andere mit dem Reporter- Farbstoff VIC (PE Biosystems, Patent ausstehend) am 5'-Ende markiert. Für jedes der Gene ( IFNG, IFNGR1 und IFNGR2) wurden jeweils zwei Primer (Vorwärtsprimer, Rückwärtsprimer) und zwei Sonden verwendet. In Tabelle 1 ist die Aufeinanderfolge der Primer und der mit FAM und VIC markierten Sonden ersichtlich.

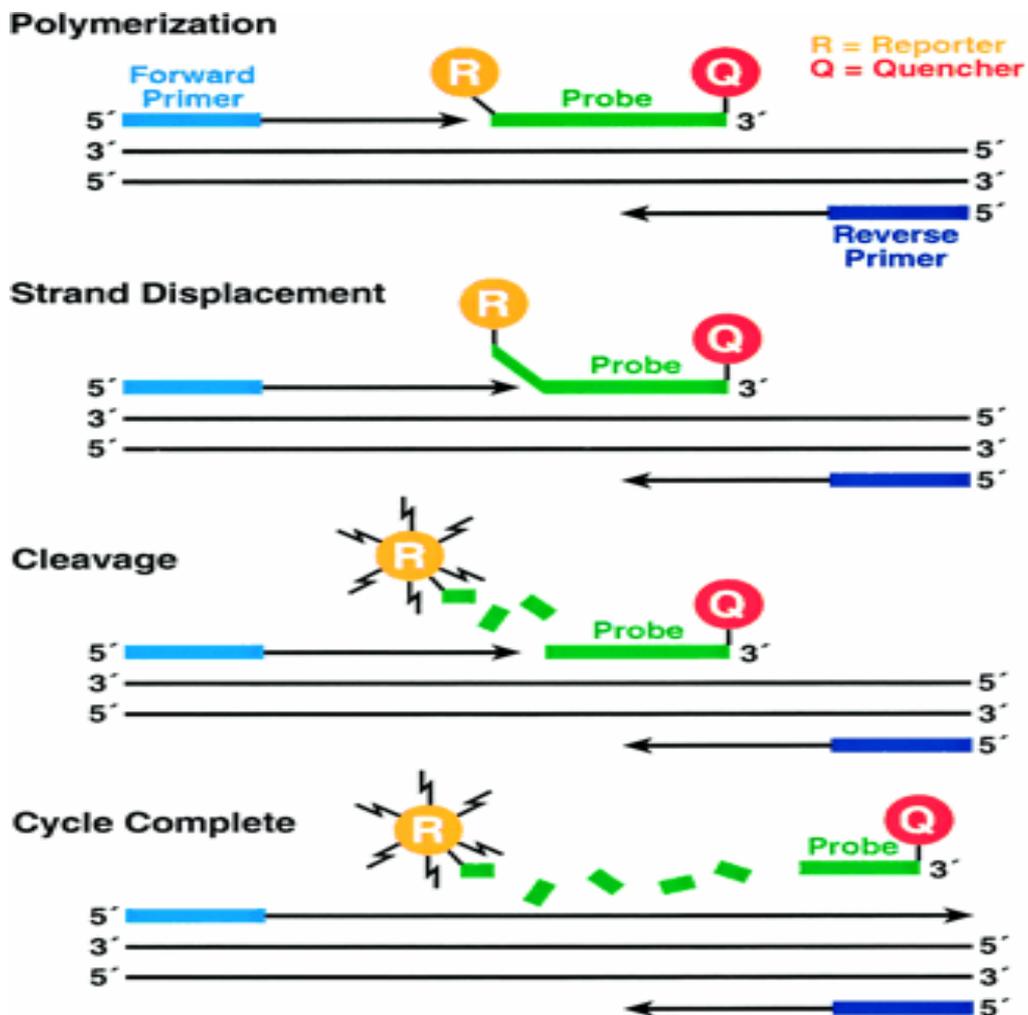
**Tabelle 1** Nukleotidsequenzen der Primer und Sonden für IFNG T874A, IFNGR1 C-56T und IFNGR2 A839G

<b>Beschreibung</b>	<b>Primersequenz</b>
Vorwärts-Primer IFN- $\gamma$	5'-GCT GTT ATA ATT ATA GCT GTC ATA ATA ATA TTC AGAC
Rückwärts-Primer IFN- $\gamma$	5'-AGG GTA TTA TTA TAC GAG CTT TAA AAG ATA GTT C
IFN- $\gamma$ Sonde (FAM)	5'-A ATC AAA TCT CAC ACA CAC
IFN- $\gamma$ Sonde (VIC)	5'-ATC AAA TCA CAC ACA CAC
Vorwärts-Primer IFNGR1	5'- ACG GTC GCT GGC TCC AA
Rückwärts-Primer IFNGR1	5'- CGG TGA CGG AAG TGA CGT AAG
IFNGR1 Sonde (FAM)	5'-CAG CCC AGC GCT GCC CTC
IFNGR1 Sonde (VIC)	5'-ACC AGC CCA GCA CTG CCC TC
Vorwärts-Primer IFNGR2	5'-GGT CCT GAG TTG GGA GCC A
Rückwärts-Primer IFNGR2	5'-GGA TCC AAC AGA AAT ACC GGC
IFNGR2 Sonde (FAM)	5'-GAGGC CTG TTG TCT ACC AAG TGC AGT TT
IFNGR2 Sonde (VIC)	5'-GGC CTG TTG TCT ACC GAG TGC AGT TT

**Abbildung 4 :**

Grundlegendes Prinzip des TaqMan Verfahrens :

Während der PCR werden die sich zuvor angelagerten DNA- Sonden aufgrund der 3`- 5` Aktivität der Taq- DNA- Polymerase abgespaltet, was zur räumlichen Trennung von Reporter- (R) und Quencher- (Q) Farbstoff und damit zum Anstieg der allelspezifischen Fluoreszenz führt.



Der TaqMan Assay wurde mit dem in Tabelle 2 dargestellten Reaktionsmix durchgeführt. Von diesem Mix, der sowohl Primer als auch Sonden enthielt, wurden 20 µl in jedes Abteil der 96-Loch-Platte gegeben. Anschließend wurden jeweils 20 µl gelöste DNA beziehungsweise Wasser (Negativstandard) hinzugefügt. Die Anordnung der Proben war wie folgend: 8 Kontrollen mit Wasser, Standard DNA- jeweils 8 für die Homozygoten, gefolgt von 72 Patientenproben mit unbekanntem Genotyp.

**Tabelle 2:** Bestandteile des Reaktionsmixes

H <sub>2</sub> O (deionisiert)	790µl
Universal Master Mix	1100µl
Forward Primer	33µl
Reverse Primer	33µl
FAM- markierte Sonde	22µl
VIC- markierte Sonde	22µl

Das PCR Protokoll bestand aus folgenden Schritten:

50 °C für 2 Minuten und 95 °C für 10 Minuten, gefolgt von 40 Zyklen der Denaturierung bei 95 °C für 15 sec, anschließend Anlagerung und Verlängerung der Primer bei 65° C für 1 min ( IFNG und IFNGR2) beziehungsweise bei 60 °C für 1 min bei der IFNGR1 Analyse. Nach dem PCR Lauf erfolgte die Analyse der Proben im ABI Prism 7700 Sequence Detection System. Dabei wurde die akkumulierte Fluoreszenz gemessen und ausgewertet. Charakteristisch für Homozygotie zeichnete sich ein isolierter Signalanstieg der FAM oder VIC Fluoreszenz ab. Ein Ansteigen beider Signale verwies auf Heterozygotie der untersuchten DNA.

Die Genotypisierung erfolgte ohne Kenntnis der klinischen/ angiographischen Patientendaten. Zur Kontrolle des Ergebnisses wurde bei 20% der Patienten eine erneute unabhängige Bestimmung des jeweiligen Genotyps unter Verwendung von DNA durchgeführt, die getrennt aus den originalen Blutproben isoliert wurde. Zwei voneinander unabhängige Mitarbeiter nahmen die Auswertung aller TaqMan Assays vor.

Die DNA, die von zwei gesunden Freiwilligen gewonnen wurde, wurde für jeden der drei untersuchten Polymorphismen als Referenz- DNA für die TaqMan Analysen verwendet. Diese initialen Genotypen wurden mittels Restriktionsanalysen aus 50 DNA- Proben von gesunden Freiwilligen ermittelt- HaeII war das Restriktionsenzym zur Bestimmung der Standardproben für IFNGR1, MunI kam bei der Analyse der IFNGR2 Standardproben zum Einsatz. Die Sequenzierung des IFNG Polymorphismus erfolgte unter Verwendung des ABI PRISM 3100 Kapillar- Sequenzierungssystems (Applied Biosystems, Foster City CA) und des BigDye Terminator v1.1. Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Pat. Nr. 4336776). Verwendung fanden dabei dieselben Primer wie in Tabelle 1 dargestellt.

Als Genotyp wurde die Kombination der jeweiligen Allele auf den beiden Chromosomen definiert.

## **2.6 Angiographische Analyse**

Die quantitativen angiographischen Analysen erfolgten auf einem separaten Computersystem (CMS, Medis Medical Imaging Systems, Nuenen, Niederlande); dieses ermöglichte durch exakte Fokussierung die Begrenzung der jeweils behandelten Läsion. Den Untersuchern waren die Genotypen der Patienten nicht bekannt.

Die qualitative Beurteilung der Läsionsmorphologie erfolgte gemäß den modifizierten Bestimmungen der American Heart Association/ American College of Cardiology und wurde in die Typen A, B1, B2 und C klassifiziert. Die Läsionen vom Typ B2 und C wurden als komplexe Läsionen bewertet (Kastrati et al., 2000). Für jeden einzelnen Patienten wurden die Parameter Stenosenlänge, minimaler Lumendurchmesser der Stenose vor Intervention (MLD), maximaler Durchmesser des entfalteten Ballons während des Eingriffes, minimaler Lumendurchmesser innerhalb des Stents und Referenzdurchmesser nach Intervention erhoben. Die angiographischen Daten wurden vor, während und unmittelbar nach dem Eingriff aufgenommen, eine Kontrollangiographie erfolgte zwischen 6- 12 Monaten. Der aktuelle Lumenzuwachs errechnete sich aus der Differenz des minimalen Lumendurchmessers (MLD) vor und nach Intervention. Zur Bestimmung des späten Lumenverlustes (late loss) wurde von dem MLD, der unmittelbar nach dem Eingriff gemessen wurde (MLD akut), der MLD, der in der Kontrollangiographie feststellbar war, subtrahiert. Das Verhältnis von late loss zu MLD akut ergab den Verlustindex.

## 2.7 Material und Geräte

### Geräte

PCR- Thermocycler:	Authorized thermal Cyclers for PCR (Hybaid, Heidelberg) Primus 96 plus (MWG-Biotech, Ebersberg) GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystem, Weiterstadt) GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem, Weiterstadt) ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Weiterstadt)
Zentrifugen:	Zentrifuge CR3- 12 (Jouan, St. Herblain, Frankreich) Zentrifuge A 14 (Jouan, St. Herblain, Frankreich) Biofuge fresco (Heraeus Instruments, Hannau)
Mixer:	Vortexer (Genio2 tm Bender&Obein AGV Zürich, Schweiz) Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg)
Elektrophoresekammer:	Xcell II ( Novex, Karlsruhe)
Spannungsquelle:	Power N Pac 300 ( Bio Rad, München)

## Verbrauchsmaterialien

Primer und Sonden für das TaqMan – Verfahren wurden von Applied Biosystems bezogen.

- PCR- Gefäße:                    PCR Tubes, 0,5ml ultradünn (Eppendorf, Hamburg)  
     MicroAmp® Optical 96- Well Reaction Plate  
     (Applied Biosystems, Weiterstadt)  
     MicroAmp® Optical Caps (8 Caps/ Strip)  
     (Applied Biosystems, Weiterstadt)
- DNA- Isolierung:                QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden)  
     High Pure PCR Template Preparation Kit  
     (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
- Gel:                                    10% Polyacrylamidgel (Novex, Karlsruhe)
- Enzyme:                            TaqMan Universal PCR Master Mix  
     (Applied Biosystems, Weiterstadt)  
     Taq- Pol (Qiagen GmbH, Hilden)  
     Restriktionsendonukleasen ( MBI Fermentas, St. Leon- Rot)
- Puffer:                                10 x PCR- Puffer (Qiagen GmbH, Hilden)
- Desoxyribonukleotidmischung (10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP )  
 (GeneAmp Gibco BRL, Karlsruhe)

Molekulargewichtsmarker VIII (Roche Diagnostics, Mannheim)

Ethidiumbromidlösung (1%): 1g Ethidiumbromid ad 100 ml aqua dest (Serva, Mannheim)

Ladepuffer für Gelelektrophorese: 10 mM TBE- Puffer (Gibco BRL, Karlsruhe)

## **2.8 Studienendpunkte**

Primärer Endpunkt dieser Studie war das Auftreten einer Restenose. Angiographische Restenose wurde definiert als eine Durchmesserstenose  $\geq 50\%$  zum Zeitpunkt der Kontrollangiographie 6 Monate nach Intervention, klinische Restenose als die dringliche Revaskularisierung (TVR) des behandelten Gefäßes durch PTCA und gegebenenfalls Stentimplantation beziehungsweise durch eine Bypass Operation innerhalb der ersten 12 Monate nach Intervention aufgrund von Angina pectoris in Anwesenheit einer angiographischen Restenose. Sekundärer Endpunkt der Studie waren weitere bedeutende adverse cardiale Ereignisse (MACE), einschließlich Mortalität und Myokardinfarkt während des ersten Jahres nach Stentimplantation.

## 2.9 Statistik

Kontinuierliche Variablen wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $\pm$  S.D.) angegeben und mit dem ungepaarten, zweiseitigen t- Test oder einer Varianzanalyse für mehr als zwei Gruppen verglichen. Diskrete Variablen wurden entweder als Zahlen oder als Prozentanteil (%) angegeben und mittels Chi- Quadrat oder exaktem Test nach Fischer verglichen. In den Hauptanalysen wurden jeweils die Ereignisse der jeweiligen Genotypen, also der homozygoten A Allel Träger mit den homo- oder heterozygoten T Allel Trägern (IFNG T874A) bzw. mit den homo- oder heterozygoten G Allel Trägern (IFNGR2 A839G) verglichen. Für den IFNGR1 C-56T Polymorphismus erfolgte der Vergleich zwischen den homozygoten C Allel Trägern und den homo- oder heterozygoten T Allel Trägern. Es erfolgte eine Powerkalkulation, so dass die Wahrscheinlichkeit, eine 8%ige Differenz zwischen den einzelnen Genotypen mit der jeweils höchsten und der geringsten Restenoserate richtigerweise ermitteln zu können, 83% für den IFNG T874A, 80% für den IFNGR1 C-56T und 50% für den IFNGR2 A839G Polymorphismus betrug.

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software S- Plus, Version 4.0 Professionell (Mathsoft, Inc., Seattle, Washington). Mögliche Übereinstimmung mit dem Hardy- Weinberg Äquilibrium wurde mittels Pearsons'  $\chi^2$  Test überprüft. P Werte  $< 0,05$  wurden als signifikant angenommen.

### 3. Ergebnisse

Zur Evaluation relevanter Polymorphismen wurden bei 22 zufällig ausgewählten Patienten unseres Institutes der gesamte, etwa 6500bp umfassende IFNG Locus sequenziert, einschließlich aller Exons und der kompletten Sequenz aller Introns. Dabei konnten wir 8 SNPs identifizieren, 7 davon waren in der Datenbank NCBI's als dbSNP schon beschrieben (Tabelle 3). Keiner der entdeckten Polymorphismen führte jedoch zu einer Aminosäuresequenzänderung. Da auch keiner dieser 8 SNP's in oder nahe einer Splicing-Stelle der Exons/ Introns lokalisiert war, entschieden wir uns den bereits funktionell charakterisierten und gleichmäßig verteilten IFNG Intron 1 T874A Polymorphismus in unserer Vergleichsstudie zu analysieren.

**Tabelle 3**: Identifizierung jener 8 Polymorphismen nach Sequenzierung des IFNG Locus bei 22 Patienten und die jeweilige Genotypverteilung

<b>Polymorphe Position</b>	<b>Homozygote Allele</b>	<b>Heterozygote Allele</b>	<b>seltene homozyg. Allele</b>
rs2069707/Pos.- 892	18 CC	4 CG	0 GG
rs2430561/Pos.T874A	6 AA	12 AT	4 TT
rs1861494/Pos.1984	12 AA	8 AG	2 GG
rs1861493/Pos.2197	12 TT	8 TC	2 CC
rs2069716/Pos.2578	20 AA	2 AG	0 GG
rs2069733/Pos.3161	14 GG	7 G-	1 --
rs2069718/Pos.3232	10 CC	10 CT	2 TT
Pos. 4150	10 CC	12 CT	0 TT

G- und -- kennzeichnen als heterozygote beziehungsweise homozygote Träger die Deletionsstellen.

Zusammen mit der rs Nummer und der Position des Startcodons in der IFNG Sequenz der GenBank accession no. AF375790 wurden die Polymorphismen in 5'- 3' Richtung aufgelistet

Beim IFNGR1 und IFNGR2 Gen wurde aufgrund der Ergebnisse der Sequenzierung des IFN- $\gamma$  Locus auf eine aufwendige Sequenzierung verzichtet und der am Besten charakterisierte Polymorphismus mit der günstigsten Verteilung, der IFNGR1 C-56T und der IFNGR2 A839G Polymorphismus, für die weitere Analyse verwendet.

Für den IFNG T874A Polymorphismus war die Genotypverteilung in unserer Population von 2591 Patienten wie folgt (Prozentangaben in Klammern): 599 TT (23,1%), 1213 TA (46,8%) und 779 AA (30,1%). Für den IFNGR1 C-56T Polymorphismus ergab sich folgende Verteilung: 450 CC (17,4%), 1260 CT ( 48,6%) und 881 TT (34,0%). Die IFNGR2 A839G Genotypverteilung ergab 1998 AA (77,1%), 548 AG (21,2%), 45 GG (1,7%). Die Genotypverteilung entsprach mit  $P = 0,99$  für den IFNGR1 Polymorphismus und mit  $P = 0,30$  für den IFNGR2 Polymorphismus dem Hardy- Weinberg- Gesetz; dies galt nicht für den IFNG T874A Polymorphismus ( $P = 0,003$ ).

### **3.1 Charakteristika der Patienten**

Die grundlegenden Charakteristika der Patienten zeigten keine statistisch signifikante Unterschiede bezüglich der Genotypverteilung der Polymorphismen (Tabelle 4).

Folgende Verteilung der Charakteristika fand sich für die Genotypen des IFNG T874A Polymorphismus. Das Alter zwischen TT- , TA- und AA- Patienten wies keinen signifikanten Unterschied auf. Der Anteil an Frauen und an Diabetikern war bei den TT und TA Patienten geringfügig niedriger ausgefallen als bei AA- Allel Trägern. Ähnlich war bei Patienten mit arterielle Hypertonie kein signifikanter Unterschied erkennbar.

Der Anteil aktiver Raucher war bei homozygoten T Allel Trägern mit 25,7% minimal höher als bei TA - (22,8%) und AA- Patienten (22,0%). Patienten, die eine Hypercholesterinämie

aufwiesen, waren unter den Genotypen gleichermaßen verteilt (76,5% TT, 75,8 % TA, 76,1% AA). TT Patienten hatten mit 23,0% geringfügig häufiger einen akuten Myokardinfarkt erlitten als TA Patienten (20,9%) und homozygoten AA Trägern (20,2%). Eine instabile Angina pectoris war relativ gleichmäßig mit 31,9% bei TT Patienten, mit 33,9% bei TA Trägern und mit 32,9% bei AA Patienten aufgetreten. Der Anteil von Patienten mit Myokardinfarkt in der Vorgeschichte und zurückliegender Bypass- OP wies ebenso keinen signifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Genotypen auf.

Ähnlich verhielt es mit den Ergebnissen der IFNGR1 C-56T und IFNGR2 A839G Versuchsreihen, es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede für die einzelnen Genotypen. Das Alter der beteiligten Patienten war in allen sechs Genotypen beinahe übereinstimmend. Der Anteil an Frauen, an Patienten mit arterieller Hypertonie sowie der Anteil an Diabetikern waren gleichmäßig verteilt. Aktive Raucher waren beim GG Genotyp des IFNGR2 A839G Polymorphismus mit einer geringeren Prozentzahl (15,6%) ohne statistische Signifikanz registriert worden als bei A Allel tragenden Patienten (23,5% und 22,8%). Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich bei Patienten mit Hypercholesterinämie, ein signifikanter Unterschied war nicht erkennbar. Der Anteil an Patienten mit akutem Myokardinfarkt war bei den allen Genotypen gleichmäßig verteilt. Die Prävalenz einer instabilen Angina pectoris, eines Myokardinfarktes und einer Bypass- OP in der Vorgeschichte waren bei allen Patienten mit gleicher Häufigkeit registriert worden.

**Tabelle 4 :** Klinische Eigenschaften der Patienten

	IFNG T874A			IFNGR1 C-56T			IFNGR2 A839G		
	TT n=599	TA n=1213	AA n=779	CC n=450	CT n=1260	TT n=881	AA n=1998	AG n=548	GG n=45
<b>Alter, Jahre</b>	65±11	65±11	66±12	64±12	66±11	65±12	65±11	66±12	66±9
<b>Frauen</b>	23,9	23,1	27,7	24,9	25,6	23,2	24,4	26,1	20,0
<b>Arterielle Hypertonie</b>	73,6	75,1	77,4	74,9	75,1	76,3	74,8	78,3	71,1
<b>Diabetes mellitus</b>	19,4	21,4	24,1	20,2	22,8	21,1	22,6	19,0	17,8
<b>Aktive Raucher</b>	25,7	22,8	22,0	25,3	23,0	22,4	23,5	22,8	15,6
<b>Hypercholesterinämie</b>	76,5	75,8	76,1	75,6	76,7	75,5	75,8	77,9	64,4
<b>Akuter MI</b>	23,0	20,9	20,2	23,6	20,6	20,8	22,0	18,1	20,0
<b>Instabile Angina pectoris</b>	31,9	33,6	32,9	30,7	34,0	32,7	33,0	33,4	28,9
<b>Zustand nach MI</b>	28,4	32,2	31,1	31,3	31,5	30,2	31,2	31,0	24,4
<b>Zustand nach Bypass-Operation</b>	13,7	12,0	11,3	13,1	11,8	12,3	11,9	13,9	6,7
<b>Anzahl der beteiligten Gefäße</b>									
<b>1</b>	28,4	28,9	29,9	30,9	28,1	29,5	29,5	27,7	26,7
<b>2</b>	29,6	31,1	30,6	31,8	29,9	30,9	30,9	29,4	28,9
<b>3</b>	41,6	39,7	39,3	36,7	41,7	39,3	39,1	42,7	44,4

P – statistisch nicht signifikant für alle Vergleiche; Alter ist als Mittelwert ± SD (Standardabweichung) angegeben; die anderen Variablen sind als prozentuale Anteile der jeweiligen Patientenzahl aufgeführt.

Da keiner unserer ermittelten P-Werte unter 0,05 lag, wurde eine multivariate Analyse als nicht notwendig betrachtet.

### **3.2 Charakteristika der Läsionen und der Interventionen**

Die Charakteristika der Läsionen und die periprozeduralen Charakteristika zeigten für alle 3 Polymorphismen IFNG T874A, IFNGR1 C-56T und IFNGR2 A839G eine ausgeglichene Verteilung bezüglich der untersuchten Genotypen.

Die betroffenen Koronararterien waren bei allen Polymorphismen gleichmäßig verteilt; dezente Abweichungen waren lediglich bei GG Patienten des IFNGR2 A839G Polymorphismus zu erkennen- diese waren auf die geringe Patientenzahl ( $n = 45$ ) jenes Genotyps zurückzuführen und statistisch nicht signifikant. Chronische Verschlüsse wurden in annähernd gleicher Anzahl bei allen Polymorphismen diagnostiziert und behandelt (6,2% - 7,8%), nur die GG Träger (IFNGR2 A839G) zeigten aus oben genanntem Grund eine nicht relevante Abweichung (15,6%). Komplexe Läsionen wurden innerhalb der verschiedenen Genotypen gleich häufig festgestellt (78%- 82,4%).

Auch bei den Interventionscharakteristika gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen und den untersuchten Polymorphismen. Während sich im Bereich der Läsionslänge beim IFNG T874A nur für die AA Genotypen mit  $14,4\text{mm} \pm 8,2\text{mm}$  (vgl.  $13,9\text{mm} \pm 7,9\text{mm}$  TT und  $13,7\text{mm} \pm 7,9\text{mm}$  TA) ein geringer Trend nach oben abzeichnete, waren kaum Unterschiede bei IFNGR1 C-56T festzustellen. Etwas deutlicher, aber dennoch ohne Signifikanz waren die Unterschiede bei dem IFNGR2 A839G Polymorphismus ( $13,9\text{mm} \pm 7,7\text{mm}$  AA,  $14,5\text{mm} \pm 8,9\text{mm}$  AG und  $12,3\text{mm} \pm 7,0\text{mm}$  GG.) Die Messungen sowohl des initialen MLD als auch des finalen MLD lieferten bei allen drei Polymorphismen beinahe identische Ergebnisse, ebenso war die Anzahl der implantierten Stents ohne Unterschied. Eine Therapie mit Abciximab erfolgte bei 26% der Patienten mit dem TT Genotyp und bei 23% der TA- und AA Patienten des IFNG T874A Polymorphismus. Ohne Signifikanz war ebenfalls die Häufigkeit der Abciximab Therapie bei den Patienten mit

den unterschiedlichen Genotypen des IFNGR1 C-56T Polymorphismus ( 21,6% CC, 24,6% CT, 23,8% TT ) und des IFNGR2 A839G Polymorphismus ( 24,6% AA, 21,4% AG und 20,0%GG).

**Tabelle 5: Läsionsbezogene Charakteristika zum Zeitpunkt der Intervention**

	IFNG T874A			IFNGR1 C-56T			IFNGR2 A839G		
	TT n=599	TA n=1213	AA n=779	CC n=450	CT n=1260	TT n=881	AA n=1998	AG n=548	GG n=45
<b>Lage der implantierten Stents</b>									
LAD (%)	43,7	43,1	43,2	45,1	42,9	42,9	44,0	40,5	46,7
LCx (%)	18,0	18,2	19,3	18,2	18,7	18,3	18,5	18,4	17,8
Hauptstamm (%)	1,7	2,6	1,9	2,2	2,1	2,3	2,0	2,1	6,7
RCA (%)	30,9	29,6	29,9	29,1	30,6	29,6	29,7	31,0	28,9
<b>Venöse Bypassgrafts (%)</b>	5,7	6,5	5,7	5,4	5,7	6,9	5,7	8,0	0,0
<b>Restenotische Läsionen (%)</b>	3,0	3,4	3,7	3,1	3,7	3,1	3,4	3,7	0,0
<b>Chronische Okklusionen (%)</b>	6,8	6,6	7,8	6,2	6,5	7,5	6,7	6,4	15,6
<b>Komplexe Läsionen (%) (ACC/AHA Klasse B2 oder C)</b>	79,3	79,6	82,4	78,0	81,0	80,8	80,0	81,9	80,0
<b>Läsionslänge (mm)</b>	13,9±7,9	13,7±7,9	14,4±8,2	14,4±8,2	14,1±8,0	13,8±7,7	13,9±7,7	14,5±8,9	12,3±7,0
<b>Referenz- durchmesser (mm)</b>	3,04± 0,52	3,02± 0,56	3,00± 0,56	2,99± 0,56	3,02± 0,55	3,02± 0,51	3,01± 0,55	3,03± 0,56	3,01± 0,44
<b>Minimaler Lumen- durchmesser initial</b>	0,69± 0,57	0,74± 0,61	0,69± 0,57	0,70± 0,61	0,71± 0,58	0,71± 0,56	0,71± 0,59	0,72± 0,57	0,71± 0,63
<b>Anzahl der Stents</b>	1,37± 0,68	1,35± 0,73	1,37± 0,69	1,35± 0,67	1,36± 0,71	1,36± 0,74	1,35± 0,69	1,39± 0,73	1,47± 0,84
<b>Länge des gestenteten Gefäßsegments (mm)</b>	22,9± 11,5	22,6± 11,7	23,4± 11,9	23,6± 11,8	22,8± 11,5	23,2± 12,2	22,8± 11,5	23,4± 12,8	22,8± 9,4
<b>Therapie mit Abciximab (%)</b>	26,0	23,0	23,0	21,6	24,6	23,8	24,6	21,4	20,0
<b>Minimaler Lumendurchmesser nach Stenting</b>	2,94± 0,52	2,93± 0,54	2,91± 0,55	2,89± 0,55	2,94± 0,54	2,92± 0,54	2,92± 0,54	2,95± 0,52	3,01± 0,42
<b>Unmittelbare Lumenzunahme</b>	2,25± 0,66	2,19± 0,66	2,22± 0,69	2,18± 0,68	2,23± 0,66	2,20± 0,66	2,20± 0,67	2,24± 0,68	2,30± 0,67

P= statistisch nicht signifikant für alle Vergleiche; Angaben sind Mittelwerte ± SD bzw. die absolute Anzahl der Patienten in Prozentangaben, Lumendurchmesser in mm

LAD steht für R. interventrikularis anterior, LCx für R. circumflexus und RCA für A. coronaria dextra.

### **3.3 Restenose**

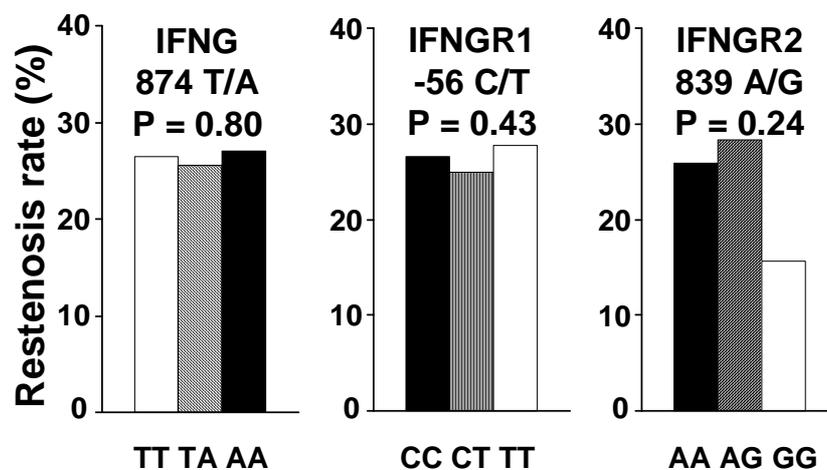
Bei 1965 Patienten (76,8% der ursprünglich eingeschlossenen Population) konnte eine Kontrollangiographie 6 Monate nach der Intervention in unseren Kliniken durchgeführt werden. Die Patientengruppen mit vollständigen angiographischen Daten stimmten mit der Ausgangspopulation hinsichtlich der Genotypverteilung überein, was mit Hilfe des Chi-Quadrat Testes festgestellt werden konnte.

Die quantitativen, angiographischen Ergebnisse lieferten uns keine signifikanten Unterschiede für die angiographischen Restenoserate, unser primären Endpunkt, bezüglich der Verteilung für die einzelnen Genotypen der unterschiedlichen Polymorphismen ( $P \geq 0.23$ ). Andere Indizes angiographischer Restenose wie der späte Lumenverlust zeigten ebenfalls eine ähnliche Verteilung; die Ergebnisse waren auch vergleichbar zwischen den verschiedenen Genotypen des IFNG T874A Polymorphismus und des IFNGR1 C-56T Polymorphismus. Eine geringe Abweichung zeichnete sich beim GG Genotyp für IFNGR2 A839G ab. Während die angiographische Restenoserate 6 Monate nach Stentimplantation bei den IFNG T874A Genotypen zwischen 25,5% und 27% variierte ( $P= 0,80$ ) und sich für den IFNGR1 C-56T Polymorphismus Werte zwischen 24,9% und 27,8% ( $P= 0,43$ ) ergaben, betrug diese bei dem IFNGR2 A839G Polymorphismus für Patienten mit dem GG Genotyp nur 15,6% im Vergleich zu AA Patienten mit 25,0% und AG Patienten mit 28,3% ( $P= 0,24$ ). Dieser prozentuale Unterschied resultiert am ehesten aus der geringen Patientenzahl der GG Gruppe und erscheint in der Auswertung als nicht signifikant. Die entsprechenden Daten sind der Tabelle 6 zu entnehmen.

**Tabelle 6 :** Ergebnisse der Kontrollangiographie 6 Monate nach Intervention (n= 1965)

	IFNG T874A			IFNGR1 C-56T		IFNGR2 A839G			
	TT n=452	TA n=917	AA n=596	CC n=335	CT n=507	TT n=680	AA n=1516	AG n=417	GG n=32
<b>Minimaler Lumen-durchmesser</b>	1,86± 0,85	1,86± 0,85	1,83± 0,85	1,77± 0,86	1,87± 0,85	1,85± 0,83	1,84± 0,84	1,87± 0,87	2,23± 0,80
<b>Lumenverlust (mm)</b>	1,12± 0,75	1,07± 0,74	1,11± 0,74	1,10± 0,74	1,09± 0,75	1,10± 0,75	1,09± 0,73	1,12± 0,79	0,85± 0,57
<b>Verlustindex</b>	0,54± 0,40	0,53± 0,56	0,52± 0,41	0,53± 0,55	0,53± 0,46	0,52± 0,37	0,53± 0,50	0,53± 0,43	0,40± 0,30
<b>Angiographische Restenoserate (%)</b>	26,5	25,5	27,0	26,6	24,9	27,8	25,0	28,3	15,6

P = statistisch nicht signifikant für alle Vergleiche ; Lumendurchmesser in mm

**Abbildung 5:** Graphische Gegenüberstellung der ermittelten, angiographischen Restenosen der untersuchten Polymorphismen IFNG T874A, IFNGR1 C-56T und IFNGR2 A839G

### **3.4 Akute und subakute thrombotische Ereignisse nach Stentimplantation**

Die Inzidenz thrombotischer Ereignisse während der ersten 30 Tage nach Stentimplantation, die als sekundäre Endpunkte definiert wurden, war bei allen neun Genotypen der drei analysierten Polymorphismen ähnlich verteilt (ersichtlich in Tabelle 7).

Zunächst sollen die Ergebnisse der IFNG T874A Versuchsreihe dargestellt werden. Die Mortalität innerhalb der ersten 30 Tage war bei Patienten mit den Genotypen AA 4,4%, sowie 2,5% für TT und 2,7% für TA und somit nicht signifikant unterschiedlich in den jeweiligen Gruppen. Ein Myokardinfarkt trat jeweils bei 1,0% der TT- und der AA Patienten und bei 1,6% der TA Patienten auf, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festzustellen war. Die Rate dringlicher Revaskularisierungen war bei TT Trägern etwas geringer (1,5%) als bei TA – (2,3%) und AA Patienten (2,2 %). Geringfügig erhöht war der Prozentsatz eingetretener pathologischer Ereignisse bei AA Patienten (6,6% vs. 4,0% TT und 5,6% TA,  $P > 0,12$ ). Beim IFNGR1 C-56T und IFNGR2 A839G Polymorphismus waren die Ergebnisse ähnlich verteilt. Die Mortalität unterschied sich nicht signifikant zwischen den verschiedenen Genotypen (IFNGR1 2,8%- 4,2% und IFNGR2 2,2%- 3,2%), ebenso gleichmäßig verteilt war die Rate dringlicher Revaskularisierungen (IFNGR1 und IFNGR2 2,0%- 2,2%). Die Myokardinfarktrate lag für IFNGR1 zwischen 1,2% und 1,6% und für IFNGR2 zwischen 2,0% und 2,1%, mit der Ausnahme des GG Genotypes des IFNGR2 Polymorphismus mit 0,0% Myokardinfarktrate, die sich aber aufgrund der geringen Trägerzahl als nicht signifikant erwies.

Zusammenfassend lieferten diese Ergebnisse keine statistisch signifikanten Unterschiede in unseren untersuchten Patientengruppen. Weder IFNG T874A ( 4,0%- 6,6%), noch IFNGR1 C-56T (4,4%- 5,7%) und IFNGR2 A839G (4,4%- 5,7%) zeigten eine Signifikanz für frühe thrombotische Ereignisse, wie in Tabelle 7 dargestellt.

**Tabelle 7** : Klinische Ereignisse innerhalb der ersten 30 Tage nach Stentimplantation (n = 2591)

	IFNG T874A			IFNGR1 C-56T			IFNGR2 A839G		
	TT n=599	TA n=1213	AA n=779	CC n=450	CT n=1260	TT n=881	AA n=1998	AG n=548	GG n=45
<b>Tod</b>	2.5	2.7	4.4	4,2	2,8	3,2	3.5	2.2	2.2
<b>MI</b>	1.0	1.6	1.0	1,2	1,6	0,0	1.2	1.6	0.0
<b>Dringliche TVR</b>	1.5	2.3	2.2	2,1	2,0	2,2	2.1	2.0	2.2
<b>Irgendein pathologisches Ereignis</b>	4.0	5.6	6.6	5,7	4,9	4,4	5.7	4.9	4.4

P = nicht statistisch signifikant für alle Vergleiche; Daten sind als prozentuale Patientenzahlen angegeben.

MI = Myokardinfarkt; TVR = target vessel revascularization/ dringliche Revaskularisierung

### **3.5 Langfristiger klinischer Verlauf (1 Jahr) nach Stentimplantation**

Die untersuchten Polymorphismen IFNG T874A , IFNGR1 C-56T und IFNGR2 A839G zeigen keinen Einfluss auf den langfristigen klinischen Verlauf nach der Intervention. Für die Genotypen des IFNG T874A Polymorphismus zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Mortalität (7,2% für die AA Träger vs. 6,0% für die TT und 5,9% für die TA Träger). Bei den weiteren sekundären Endpunkten Myokardinfarkt und klinische Restenose (TVR) waren ein Jahr nach Stentimplantation keine relevanten Unterschiede bei den Allelträgern festzustellen; die TVR- Rate variierte zwischen 15,5% und 16,0% (P = 0,77).

Bei IFNGR1 und IFNGR2 zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Bei GG Patienten des IFNGR2 Polymorphismus wurde eine statistisch nicht signifikante Erhöhung

der Mortalität festgestellt, die aber am ehesten auf die geringe Patientenzahl mit diesem Genotyp zurück zu führen ist (11,1% versus 6,4% für AG und 6,2% für AA Genotyp Träger). Für den IFNGR1 Polymorphismus war die Mortalitätsrate gleichmäßig verteilt zwischen 5,7% und 8,2%. Die klinische Restenoserate war bei den GG Genotyp Patienten des IFNGR2 Polymorphismus mit 6,7% im Vergleich zu den AG Trägern (15,9%) und den AA Patienten (16,2%) nicht signifikant verringert ( $P = 0,23$ ). Trotz dieser Auffälligkeiten des GG Genotyps kann dieses Ergebnis für unsere Studie aufgrund der geringen Anzahl an GG Trägern nicht als signifikant positiv gewertet werden. Gleichmäßig verteilt war auch die Rate der klinischen Restenose für den IFNGR1 Polymorphismus (14,9%- 17,3%,  $P = 0,37\%$ ).

**Tabelle 8 :** Klinische Ereignisse innerhalb eines Jahres nach koronarer Stentimplantation (n = 2591)

	<b>IFNG T874A</b>			<b>IFNGR1 C-56T</b>			<b>IFNGR2 A839G</b>		
	TT n= 599	TA n= 1213	AA n= 779	CC n= 450	CT n= 1260	TT n= 881	AA n= 1998	AG n= 548	GG n= 45
<b>Tod</b>	6,0	5,9	7,2	8,2	6,1	5,7	6,2	6,4	11,1
<b>MI</b>	2,2	2,6	2,2	1,3	2,5	2,7	2,4	2,6	0,0
<b>Klinische Restenose</b>	16,0	15,7	15,5	17,3	14,9	16,7	16,2	15,9	6,7

P = nicht statistisch signifikant für alle Vergleiche; Daten sind als prozentuale Patientenzahlen angegeben.

MI = Myokardinfarkt

#### **4. Diskussion**

Die Einzelbasenpolymorphismen IFNG T874A, IFNG1 C-56T und IFNGR2 A839G waren nicht mit einer angiographisch oder klinisch definierten Restenose, Myokardinfarkt oder Tod nach Stentimplantation assoziiert. Sie zeigten keinen Einfluss auf thrombotische Ereignisse. Das negative Ergebnis schließt allerdings eine potentielle Rolle dieser Zytokine bei der Restenoseentwicklung und thrombotischen Ereignissen nach Stentimplantation nicht aus.

Das Besondere an unserer Arbeit war die Auswahl der zu untersuchenden Gene; diese basierte auf einer extensiven Analyse unterschiedlich exprimierter Gene in neointimalem Gewebe, das an unseren Kliniken entnommen wurde (Zohlhöfer et al., 2001). Als Kontrollen dienten Proben des Gastrointestinaltraktes und von Koronararterien jener Patienten, die sich einer Herztransplantation unterzogen hatten. Diese Studie ergab nach gentechnischer Analyse des restenotischem Gewebematerials, dass die Genexpression bei 223 Genen unterschiedlich war im Vergleich zu Kontrollzellen, wovon wiederum 37 Gene in Zusammenhang mit der IFN- $\gamma$  Signaltransduktion standen. Nachdem die Gruppe um Frau Dr. Zohlhöfer (2001) eine ausgeprägte Alteration der gesamten IFN- $\gamma$  Signaltransduktionskaskade in neointimalen SMCs beschrieb, stellten sich jene Gene, die den Startpunkt des Signalweges umfassten, für uns als die Aussichtsreichsten für eine positive Assoziation dar; basierend darauf wählten wir das IFN-  $\gamma$  Gen und seine Rezeptoren IFNGR1 und IFNGR2 für unsere gentechnische Analysen aus .

Außerdem ergab die genaue Analyse der Genexpression, dass ein aktiver IFN- $\gamma$  Rezeptor, der beide Ketten enthält, hauptsächlich in neointimalen, vaskulären glatten Muskelzellen exprimiert wird. In kultivierten glatten Muskelzellen (SMC) verhinderte IFN- $\gamma$  die Apoptose und eine genetische Unterbrechung des IFN- $\gamma$  Signals im restenotischen Mausmodell

reduzierte signifikant die vaskuläre Proliferation. In einer früheren Arbeit wurde durch den Einsatz des speziesspezifischen IFN- $\gamma$ -M 7 Inhibitors bei Hasen eine Reduktion der Intima – Hyperplasie nach Gefäßverletzungen erreicht (Liu et al., 2000).

Trotz dieser Daten zeigte unsere Studie keine positive Assoziation und die Genese der Restenose ist sehr komplex und nicht alle daran beteiligten Faktoren sind bisher identifiziert.

Ein falsch negatives Ergebnis kann angesichts der großen Studienpopulation mit 2591 konsekutiven Patienten und eines hohen Anteils von Patienten mit Kontrolluntersuchung nach 6 Monaten (76,8%) weitgehend ausgeschlossen werden. Die dargestellte Verteilung der Genotypen entspricht im Wesentlichen früher publizierten Studien (Rossouw et al., 2003, Van Beusekom et al., 1998, Nakashima et al., 1999). Die geringe Restenoserate in der Gruppe der IFNGR2 GG Patienten ist am ehesten ein Zufallsergebnis aufgrund der geringen Anzahl der Patienten mit diesem Genotyp.

Während sowohl der IFNGR1 C-56T Polymorphismus als auch der IFNGR2 A839G Polymorphismus mit dem Hardy- Weinberg- Äquilibrium übereinstimmte, wich der IFNG T874A Polymorphismus davon ab; Fehler in der Genotypisierung als ein Grund für diese Deviation können aber ausgeschlossen werden; somit ist von einem Zufallsergebnis oder von einer möglichen Assoziation des Polymorphismus mit der Grunderkrankung, der koronaren Herzerkrankung, auszugehen.

Die hohe Zuverlässigkeit des TaqMan Systems sowie die durch Direktsequenzierung kontrollierten Standards schließen einen systematischen Fehler praktisch aus. Zufällige Fehler sind durch die Wiederholung der Genotypisierung für 20% der Patienten sowie durch die Überprüfung der Auswertungen durch zwei von einander unabhängige Untersucher sehr unwahrscheinlich.

## 4.1 Restenose

Frühere Studien aus unserem Hause identifizierten klinische und prozedurale Faktoren für die Ausbildung einer Restenose nach koronarer Stentimplantation, wie zum Beispile Diabetes mellitus, Implantation mehrerer Stents und Länge des mit Stents behandelten Gefäßabschnittes (Kastrati et al., 1997). Dabei wird zusätzlich ein genetischer Einfluss als Risikofaktor für Restenose diskutiert (Kastrati et al., 1999, Kastrati et al., 2000). Zum Einen zeigte die angiographische Restenose eine bimodale Verteilung mit zwei Häufigkeitsgipfel, einem ersten bei 30% und einem zweitem bei 70% Lumeneinengung; dieses Ergebnis unterstützt die Annahme, das die Patienten in zwei Gruppen mit unterschiedlicher Neigung zu Restenose eingeteilt werden können (Schömig et al., 1997). Eine weitere Analyse aus unseren Kliniken von Patienten mit multipler Stentimplantation zeigte, dass in Anwesenheit restenotischer Läsionen in anderen Gefäßabschnitten die Wahrscheinlichkeit einer erneuten Restenose in der Zielläsion mehr als doppelt so hoch ist (Kastrati et al., 1998), so dass eine genetische Disposition für restenotische, neointimale Formationen anzunehmen ist.

Tatsächlich gelang es auch in früheren Studien, die Assoziation einiger Polymorphismen in Genen von Schlüsselproteine, die im Zusammenhang mit der Entstehung kardiovaskulären Erkrankungen stehen, mit dem Verlauf nach koronarer Stentimplantation zu zeigen. Das PI<sup>A2</sup> Allel des Glykoprotein IIIa (eine der beiden Untereinheiten des Fibrinogenrezeptors GP IIb/IIIa) assoziiert man einerseits mit einer erhöhten Inzidenz von thrombotischen Ereignissen (Kastrati et al., 2000, Walter et al., 1997) und andererseits mit einer erhöhten Restenoserate. Das Allel 2 des Gens des Interleukin-1-Rezeptor- Antagonisten (IL-1RN\*<sup>2</sup>) ist mit der Ausbildung einer Restenose nach Stentimplantation assoziiert (Amant et al., 1997, Kastrati et al., 1999, Kastrati et al., 2000, Koch et al., 2000, Ribichini et al., 1998). Trotzdem gehen die Meinungen über die Bedeutung einzelner Polymorphismen auseinander.

Gegenstand der Restenose ist eine neu gebildete Intima (Neointima), deren zelluläres Substrat überwiegend aus der Media eingewanderte glatte Muskelzellen (SMCs) sind (Farb et al., 1999, Grewe et al., 1997, Kearney et al., 1997). Diese glatten Muskelzellen werden durch Entzündungsmediatoren zur Migration angeregt. Dieser Prozess der Neointimabildung dauert durchschnittlich 3- 6 Monate (Grewe et al., 2001, Kastrati et al., 1993). Der früher gezeigte Einfluss oben aufgeführter Nukleotidpolymorphismen auf eine mögliche gesteigerte IFN- $\gamma$  – Expression könnte vermuten lassen, dass jene Polymorphismen das Risiko für Restenose nach erfolgter koronarer Stentimplantation verstärken.

Trotz dieser Überlegungen stellten wir in dieser Arbeit keine signifikante Assoziation zwischen den oben aufgeführten Polymorphismen und einer Restenose fest.

## **4.2 Thrombotische Ereignisse**

Für das Auftreten thrombotischer Ereignisse im Frühverlauf nach koronarer Stentimplantation kommt den Thrombozyten eine wichtige Rolle zuteil. Gawaz et al. haben 1999 den Aktivierungsgrad und die Interaktion der Thrombozyten mit Zellen der Gefäßwand und denen des Blutes gründlich untersucht. Thrombotische Ereignisse treten meist während der ersten Tage nach der Intervention auf, ein deutlich erhöhtes Risiko besteht jedoch während der ersten 30 Tage (Schühlen et al., 1998). Es ist noch nicht eindeutig geklärt, ob und in welcher Form humanes IFN-  $\gamma$  direkten Einfluss auf die Thrombozytenfunktion hat (Freedman et al., 2002, Vorchheimer et al., 2006).

In unserer Arbeit konnten wir keinen signifikanten Einfluss des IFNG T874A Genotypen oder der Polymorphismen in den beiden Rezeptoruntereinheiten IFNGR1 C-56T und IFNGR2 A839G auf die Inzidenz thrombotischer Komplikationen (subakute Stentthrombose,

Myokardinfarkt, Tod, dringliche Revaskularisierung) finden. Durch den systemischen Einsatz antithrombozytärer Medikamente wird das mögliche Auftreten früher thrombotischer Ereignisse stark beeinflusst und dementsprechend konnte der Einfluß eines schwachen Genotyps möglicherweise nicht detektiert werden. Als thrombotische Spätkomplikationen definierten wir in unserer Studie das Auftreten von Tod oder Myokardinfarkt innerhalb der ersten 12 Monate. Eine Assoziation zwischen den drei untersuchten Polymorphismus und einer erhöhten Inzidenz von Tod oder Myokardinfarkt im ersten Jahr nach Stentimplantation konnte nicht gezeigt werden.

#### ***4.3 Andere Befunde zur Bedeutung der Polymorphismen im Interferon- $\gamma$ Signalweg***

1999 fanden Pravica et al. im ersten Intron des menschlichen IFN- $\gamma$  Gens eine variable Länge von CA Wiederholungen und konnten zeigen, dass das Mikrosatellitmarker- Allel <sup>#2</sup> (= 12 CA Wiederholungen) mit einer hohen IFN- $\gamma$  Produktion in vitro assoziiert ist. In einer folgenden Studie fand die gleiche Arbeitsgruppe heraus, dass das T Allel des IFNG T874A Polymorphismus mit dem 12- CA Mikrosatellitmarker assoziiert ist und damit die IFN- $\gamma$  Produktion beeinflusst (Pravica et al, 2000). Vor kurzem lieferte eine Fallkontrollstudie nach Untersuchungen von Familien das Ergebnis, dass der IFNG T874A Polymorphismus mit der IFN-  $\gamma$  Produktion assoziiert ist und vor Tuberkulose schützen kann (Rossouw et al., 2003). Eine Arbeitsgruppe in Italien untersuchte bei 174 Hundertjährigen und 248 Kontrollpatienten unter 60 Jahren den IFNG T874A Polymorphismus, um herauszufinden, ob diese beiden Allele je nach Altersstufen unterschiedlich ausgeprägt sind. Signifikante Unterschiede wurden

trotz der Vermutung, das +874A Allel fördere die Langlebigkeit, nicht festgestellt. Jedoch fand sich das +874 T Allel in verringerter Zahl bei den weiblichen Hundertjährigen. Thye et al. (2003) entdeckten eine höhere Anfälligkeit und geringere Morbidität bei H. pylori Infektionen für den IFNGR1 C-56T Polymorphismus. Sie stellten dabei eine erhöhte Konzentrationen an H. pylori- Antikörpern fest, die am ehesten auf eine reduzierte IFNGR1 Funktion und eine erhöhte Th2 Antwort zurück zu führen ist. Ein IFN- $\gamma$  Rezeptor 1- Mangel, der durch IFNGR1 Mutationen bedingt wird, führt bei einer Tuberkuloseinfektion zu schweren klinischen Verläufen (Jouanguy et al., 2000).

Das IFNGR2 führt zu einem Aminosäureaustausch zu Glutamin (Gln) an Position 64 und das Allel 839A ist mit dem erhöhtem Risiko verbunden, Autoimmunerkrankungen wie die systemische Lupus erythematodes zu entwickeln (Nakashima et al., 1999).

#### **4.4 Ergebnisbewertung**

Eine mögliche Erklärung für das negative Resultat unserer Studie können die komplexen Zusammenhänge zwischen den untersuchten Polymorphismen, dem Proteinspiegel und der Funktion der Zytokine im Inneren der Gefäßwand in vivo nach einem angioplastischen Eingriff im Prozess der Restenoseentwicklung sein.

Auch waren in dieser Studie nur kaukasische Patienten eingeschlossen. Da möglicherweise die Genotypverteilung zwischen verschiedenen Volksgruppen variieren kann, lassen sich die Ergebnisse dieser Studie nicht auf andere ethnische Gruppen übertragen. Weitere Proteine an anderer Stelle des IFN- $\gamma$  Signalkomplexes können ebenso bedeutend sein und andere Varianten der kodierenden Gene bedingen möglicherweise eine vermehrte neointimale Formation. Weiterhin können wir die Bedeutung von Haplotypen, also die Kombination

spezifischer Polymorphismen der untersuchten Gene, für die Entwicklung einer Restenose aufgrund der hohen Zahl möglicher Permutationen nicht abschließend beurteilen.

Unserem Wissen nach war dies die erste umfangreiche Studie, die die Assoziation von Polymorphismen innerhalb von Genen der IFN- $\gamma$  Signaltransduktionskaskade mit Restenose und dem klinischen Verlauf nach koronarer Stentimplantation systematisch untersuchte. Trotz unseres negativen Ergebnisses bedürfen diese komplexen Interaktionsmechanismen der Neointimaproliferation der weiteren Erforschung.

## **5. Zusammenfassung**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung dreier Einzelbasenpolymorphismen des Interferon (IFN)  $\gamma$  Gens (IFNG T874A) und der IFN- $\gamma$  Rezeptor 1 und 2 Gene (IFNGR1 C-56T und IFNGR2 A839G) auf den klinischen Verlauf nach koronarer Stentimplantation untersucht.

Die koronare Stentimplantation ist das häufigste Therapieverfahren bei der Behandlung der koronaren Herzerkrankung. Relevante Limitationen dieser Methode sind die Ausbildung einer erneuten Wiederverengung innerhalb des ersten Jahres, einer sogenannten Restenose, bedingt durch eine überschießende Proliferation und Matrixbildung glatter Gefäßmuskelzellen, und die relativ selten auftretenden thrombotischen Ereignisse. Frühere Arbeiten zeigten einen relevanten Einfluss von Entzündungsmediatoren auf die Ausbildung einer Restenose. Die Gruppe um Frau PD Dr. Zohlhöfer (ebenfalls Deutsches Herzzentrum München) stellte nach gentechnischer Analyse von restenotischem Gewebematerial fest, dass 223 von 2435 Genen im Vergleich zu Kontrollen unterschiedlich exprimiert wurden. 37 dieser Gene standen in Zusammenhang mit der Aktivierung der IFN- $\gamma$  Signaltransduktionskaskade in glatten Gefäßmuskelzellen der Neointima. Frühere Arbeiten konnten einen Zusammenhang der unterschiedlichen Allele der Polymorphismen IFNG T874A, IFNGR1 C-56T und IFNGR2 A839G mit der Proteinexpression beziehungsweise mit der Funktion der Proteine zeigen.

Das Ziel dieser Arbeit war es den Einfluss der Polymorphismen IFNG T874A, IFNGR1 C-56T und IFNGR2 A839G auf den klinischen Verlauf bezüglich Restenose und thrombotischer Ereignisse nach koronarer Stentimplantation zu untersuchen. Dabei wurden 2591 Patienten mit koronarer Herzerkrankung nach koronarer Stentimplantation untersucht. Die Patienten wurden im Deutschen Herzzentrum München oder in der 1. Med. Klinik,

Klinikum rechts der Isar, München behandelt. Die DNA wurde aus Vollblut extrahiert. Die Genotypisierung erfolgte mit Hilfe der PCR und des TaqMan Verfahrens. Um eine Verfälschung der Ergebnisse auszuschließen erfolgte die Genotypisierung ohne Kenntnis der klinischen Daten. Zur Kontrolle wurde bei 20% der Patienten eine zweite Genotypbestimmung durchgeführt. Die Quantifizierung der Koronarmorphologie erfolgte computerunterstützt mit einem „edge- detection“ System. Die auswertenden Personen kannten nicht die Genotypen der Patienten. Die klinischen Ereignisse (Tod, Myokardinfarkt und Revaskularisierung des Zielgefäßes) wurden dokumentiert. Bei 1965 Patienten (76,8%) wurde 6 Monate nach der Intervention eine Kontrollangiographie durchgeführt.

Primärer Endpunkt der Studie war das Auftreten einer Restenose. Diese war angiographisch definiert als erneute  $\geq 50\%$  Durchmesserstenose bei der Kontrollkoronarangiographie nach 6 Monaten und klinisch definiert als erneute Revaskularisierung des Zielgefäßes innerhalb der ersten 12 Monate nach der Intervention aufgrund von Angina pectoris Beschwerden des Patienten durch eine erneute perkutane koronare Intervention oder durch eine Bypass-Operation. Sekundäre Endpunkte waren die kombinierte Inzidenz von Tod und Myokardinfarkt während der ersten 12 Monate.

Die wesentlichen Charakteristika der Patienten vor sowie während der Intervention waren zwischen den verschiedenen Genotypgruppen ähnlich verteilt. Sowohl der primäre Endpunkt, die angiographische und die klinische Restenoserate, sowie der sekundäre Endpunkt, die Inzidenz von Tod und Myokardinfarkt während der ersten 12 Monaten, zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der untersuchten Genotypen der Polymorphismen IFNG T874A, IFNGR1 C-56T und IFNGR2 A839G. Die Genotypen hatten

auch keinen signifikanten Einfluss auf die Auftreten von klinischen Ereignissen während der ersten 30 Tag nach Intervention.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die untersuchten Genotypen keinen prognostischen Einfluss auf den klinischen Verlauf innerhalb eines Jahres nach koronarer Stentimplantation haben. Als mögliche Erklärung für das negative Ergebnis unserer Studie bezüglich des primären Endpunktes könnten die komplexen Zusammenhänge zwischen den untersuchten Polymorphismen, dem Proteinspiegel und der Funktion der Zytokine in der Gefäßwand im Prozess der Restenoseentwicklung dienen.

## **6. Danksagung**

Mein Dank gilt meinem Betreuer Dr. Klaus Tiroch für seine anregenden Informationen und die Durchsicht dieser Arbeit.

Alle Mitarbeitern des Labors- Frau Angela Ehrenhaft, Frau Marianne Eichinger und Herrn Wolfgang Latz haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen-

Danke für Ihre freundliche, technische Unterstützung .

## 7. Literaturverzeichnis

1. Amant, C., Bauters, C., Bodart, J.C., Lablanche, J.M., Grollier, G., Danchin, N., Hamon, M., Richard, F., Helbecque, N., McFadden E.P., Amouyel, P., Bertrand M.E.  
D allele of the angiotensin I- converting enzyme is a major risk factor for restenosis after coronary stenting.  
Circulation. 96 (1997); 56- 60.
2. Ardissino, D., Mannucci, P.M., Merlini, P.A., Duca, F., Fetiveau, R., Tagliabue, L., Tubaro, M., Galvani, M., Ottani, F., Ferrario, M., Corral, J., Margaglione, M.  
Prothrombotic genetic risk factors in young survivors of myocardial infarction.  
Blood. 94 (1999); 46- 51.
3. Awad, M., Pravica, V., Perrey, C., El Gamel, A., Yonan, N., Sinnott, P.J., Hutchinson IV.  
CA repeat allele polymorphism in the first intron of the human IFN-  $\gamma$  gene is associated with lung fibrosis.  
Hum. Immunol. 60 (1999); 343- 346.
4. Billiau A.  
IFN- gamma: biology and role in pathogenesis.  
Adv Immunol. 62 (1996); 61- 130.

5. Farb, A., Sangiorgi, G., Carter, A.J., Walley, V.M., Edwards, W.D., Schwartz R.S., Virmani, R.  
Pathology of acute and chronic coronary stenting in humans.  
Circulation. 99 (1999); 44-52.
6. Farb, A., Weber, D.K., Kolodgie, F.D., Burke, A.P., Virmani, R.  
Morphological predictors of restenosis after coronary stenting in humans.  
Circulation. 105 (2002); 2974- 8
7. Fuster, V., Gotto, A.M., Libby, P., Loscalzo, J., McGill, H.C.  
27<sup>th</sup> Bethesda Conference: matching the intensity of risk factor management with the hazard for coronary disease events. Task Force 1. Pathogenesis of coronary disease: the biologic role of risk factors.  
J Am Coll Cardiol. 27 (1996); 964- 76.
8. Gawaz, M., Ruf, A., Neumann, F.J., Pogatsa- Murray, G., Dickfeld, T., Zohlhöfer, D., Schömig, A.  
Effect of glycoprotein IIb- IIIa receptor antagonism on platelet membrane glycoproteins after coronary stent placement.  
Thromb Haemost. 80 (1998); 994- 1001.
9. Gawaz, M., Neumann, F.J., Schömig, A.  
Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease: consequence for diagnosis and therapy.

- Circulation . 99 (1999); E1- E11.
10. Gawaz, M., Neumann, F.J., Ott, I., May, A., Schömig, A.  
Platelet function in acute myocardial infarction treated with direct angioplasty.  
Circulation. 93 (1996); 229- 37.
  11. Gonschior, P., Gerheuser, F., Lehr, H.A., Welsch, U., Hofling, B.  
Ultrastructural characteristics of cellular reaction to experimental catheter- induced  
lesions of arterial blood vessels.  
Vasa. 24 (1995); 325- 32.
  12. Goris, A., Epplen, C., Fiten, P., Andersson, M., Murru, R., Sciacca, F.L., Ronsse, I.,  
Jackel, S., Epplen, J.T., Marrosu, M.G., Olsson, T., Grimaldi, L.M., Opdenakker, G.,  
Billiau, A., Vandenbroeck, K.  
Analysis of the IFN- $\gamma$  gene (IFNG) polymorphism in multiple sclerosis in Europe:  
effect of population structure on association with disease.  
J Interferon Cytokine Res.19 (1999); 1037- 1046
  13. Grewe, P.H., Machraoui, A., Deneke, T., Barmeyer, J., Muller, K.M.  
Structural analysis of 16 different coronary stent systems.  
Cardiol. 86 (1997); 990-9.
  14. Grewe, P.H., Deneke, T., Machraoui, A., Barmeyer, J., Muller, K.M.  
Acute and chronic tissue response to coronary stent implantation: pathologic findings  
in human specimen.  
J Am Coll Cardiol. 35 (2000); 157- 63.

15. Grewe, P.H., Deneke, T., Muller, K.M.  
Stent- induced changes of coronary morphology- pathologic- anatomic and experimental findings after balloon expansion.  
Z Kardiol. 90 (2001); 630- 6.
  
16. Grüntzig, A.R.  
Percutaneous transluminal coronary angioplasty.  
Semin Roentgenol. 16 (1981); 152- 3.
  
17. Gupta, S., Pablo, A.M., Jiang, X., Wang, N., Tall, A.R., Schindler, C.  
IFN- gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock out mice.  
J Clin Invest. 99 (1997); 2752- 61.
  
18. Hermann, R.A., Rybnikar, A., Resch, A., Märkl, B., Alt, E., Schömig, A.  
Thrombogenicity of stainless steel coronary stents with a completely gold coated surface.  
J Am Coll Cardiol. 31 (1998); (Suppl. A) 413 A.
  
19. Hoffmann, R., Mintz, G.S., Dussailant, G.R., Popma, J.J., Pichard, A.D., Satler, L.F., Kent, K.M., Griffin, J., Leon, M.B.  
Patterns and mechanisms of in- stent restenosis. A serial intravascular ultrasound study.  
Circulation 94 (1996); 1247- 54.

20. Jouanguy, E., Dupuis, S., Pallier, A., Doffinger, R., Fondaneche, M.C., Fieschi, C., Lamhamedi- Cherradi, S., Altare, F., Emile, J.F., Lutz, P., Bordigoni, P., Cokugras, H., Akcakaya, N., Landman- Parker, J., Donnadieu, J., Camcioglu, Y., Casanova, J.L.
- In a novel form of IFN- gamma receptor 1 deficiency, cell surface receptors fail to bind IFN- gamma.
- J Clin Invest. 105 (2000); 1429- 36.
21. Kastrati, A., Schömig, A., Elezi, S., Schühlen, H., Wilhelm, M., Dirschinger, J.
- Interlesions dependence of the risk for restenosis in patients with coronary stent placement in multiple lesions.
- Circulation. 97 ( 1998); 2396- 401.
22. Kastrati, A., Schömig, A., Seyfarth, M., Koch, W., Elezi, S., Böttiger, C., Mehilli J., Schömig, K., von Beckerath, N.
- P1 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risk of restenosis after coronary stent placement.
- Circulation. 99 (1999); 1005- 10.
23. Kastrati, A., Koch, W., Berger, P.B., Mehilli, J., Stephenson, K., Neumann, F.J., von Beckerath, N., Böttiger, C., Duff, G.W., Schömig, A.
- Protective role against restenosis from an interleukin- 1 receptor antagonist gene polymorphism in patients treated with coronary stenting.
- J Am Coll Cardiol. 36 (2000); 2168- 2173.

24. Kastrati, A., Schömig, A., Elezi, S., Schühlen, H., Dirschinger, J., Hadamitzky, H., Wehinger, A., Hausleiter, J., Walter, H., Neumann, F.J.  
Predictive factors of restenosis after coronary stent placement.  
*J Am Coll Cardiol.* 30 (1997); 1428- 36.
25. Kastrati, A., Schömig, A., Dietz, R., Neumann, F.J., Richardt, G.  
Time course of restenosis during the first year after emergency coronary stenting.  
*Circulation.* 87 (1993); 1498- 505.
26. Kearney, M., Pieczek, A., Haley, L., Losordo, D.W., Andres, V., Schainfeld, R., Rosenfield, K., Isner, J.M.  
Histopathology of in- stent restenosis in patients with peripheral artery disease.  
*Circulation.* 95 (1997); 1998- 2002.
27. Koch, W., Kastrati, A., Mehilli, J., Böttiger, C., von Beckerath, N., Schömig, A.  
Insertion/ deletion polymorphism of the angiotensin I- converting enzyme gene is not associated with restenosis after coronary stent placement.  
*Circulation.* 102 (2000); 197- 202.
28. Komatsu, R., Ueda, M., Naruko, T., Kojima, A., Becker, A.E.  
Neointimal tissue response at sites of coronary stenting in humans: macroscopic, histological and immunohistochemical analyses.  
*Circulation.* 98 (1998); 224- 33.
29. Lefkovits, J., Topol, E.J.

Pharmacological approaches for the prevention of restenosis after percutaneous coronary intervention.

Prog Cardiovasc Dis. 40 (1997); 141- 58.

30. Lio, D., Bonafe, M., Scola, L., Crivello, A., Colonna- Romano, G., Candore, G., Caruso, C., Franceschi, C., Olivieri, F.

Allele frequencies of + 874T →A single nucleotide polymorphism at the first intron of interferon- $\gamma$  gene in a group of italian centenarians.

Exp Gerontol. 37 (2002); 315- 319.

31. Liu, L., Lalani, A., Dai, E., Seet, B., Macautey, C., Singh, R., Fan, L., McFadden, G., Lucas, A.

The viral anti- inflammatory chemokine- binding protein M- T7 reduces intimal hyperplasia after vascular injury.

J Clin Invest. 105(11) (2000) ; 1613- 21.

32. Livak, K.J.

Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay.

Genet Anal. 14 (1999); 143- 9.

33. MacLeod, D.C., Strauss, B.H., de Jong, M., Escaned, J., Umans, V.A., van Suylen, R.J., Verkerk, A., de Feyter, P.J., Serruys, P.W.

Proliferation and extracellular matrix synthesis of smooth muscle cells cultured from human coronary atherosclerotic and restenotic lesions.

J Am Coll Cardiol. 23 (1994); 59- 65.

34. Mc Ever R.P.

Role of selections in leukocyte adhesion to platelets and endothelium.

Ann N Y Acad Sci. 714 (1994); 185- 9.

35. Morice, M.C., Serruys, P.W., Sousa, J.E., Fajadet, J., Ban Hayashi, E., Perin, M., Colombo, A., Schuler, G., Barragan, P., Guagliumi, G., Molnar, F., Falotico, R.

A randomized comparison of a sirolimus- eluting stent with a standard stent for coronary revascularization.

N Engl J Med. 346 (2002); 1773- 80.

36. Myers R.H., Kiely, D.K., Cupples, L.A., Kannel, W.B.

Parental history is an independent risk factor for coronary artery disease: the Framingham Study.

Am Heart J. 120 (1990); 963- 9.

37. Nakao, F., Ihara, K., Kusuhara, K., Sasaki, Y., Kinukawa, N., Takobayashi, A., Nishima, S., Hara, T.

Association of IFN- $\gamma$  and IFN regulatory factor-1 polymorphism with childhood atopic asthma.

J Allergy Clin Immunol. 107 (3) ( 2001) ; 499- 504.

38. Nakashima, H., Inoue, H., Akahoshi, M., Tanaka, Y., Yamaoka, K., Ogami, E.,

Nagano, S., Arinobu, Y., Niino, H., Otsuka, T., Niho, Y.

- The Combination of polymorphisms within interferon- gamma receptor 1 and receptor 2 associated with the risk of systemic lupus erythematosus.  
FEBS Lett. 453 (1999); 187- 90.
39. Neumann, F.J., Ott, I., Gawaz, M., Puchner, G., Schömig, A.  
Neutrophil and platelet activation at balloon- injured coronary artery plaque in patients undergoing angioplasty.  
J Am Coll Cardiol. 27 (1996); 819- 24.
40. Neumann, F.J., Hochholzer, W., Pogatsa- Murray, G., Schömig, A., Gawaz, M.  
Antiplatelet effects of abciximab, tirofiban and eptifibatide in patients undergoing coronary stenting.  
J Am Coll Cardiol 37 (2001); 1323- 8.
41. Nicolaes, G.A., Dahlback, B.  
Factor V and thrombotic disease: description of a janus- faced protein.  
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 22 (2002); 530- 8.
42. Ott, I., Neumann, F.J., Gawaz, M., Schmitt, M., Schömig, A.  
Increased neutrophil- platelet adhesion in patients with unstable angina.  
Circulation. 94 (1996); 1239- 46.
43. Pravica, V., Perrey, C., Stevens, A., Lee, J.H., Hutchinson IV.  
A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN- gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN- gamma production.

Hum Immunol. 61 (2000); 863-6.

44. Pravica, V., Asderakis, A., Perrey, C., Hajeer, A., Sinott, P.J., Hutchinson IV.

In vitro production of IFN- gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene.

Eur J Immunogenet. 26 (1999); 1- 3.

45. Reboul, J., Gardiner, K., Monneron, D., Uze, G., Lutfalla, G.

Comparative genomic analysis of the interferon/ interleukin- 10 receptor gene cluster.

Genome Res. 9 (1999); 242- 50.

46. Ribichini, F., Steffenino, G., Dellavalle, A., Matullo, G., Colajanni, E., Camilla, T.,

Vado, A., Benetton, G., Uslenghi, E., Piazza, A.

Plasma activity and insertion/deletion polymorphism of angiotensin I- converting enzyme: a major risk factor and a marker of risk for coronary stent restenosis.

Circulation. 97 (1998); 147- 54.

47. Rossouw, M., Nel, H.J., Cooke, G., van Helden, P.D., Hoal, E.G.

Association between tuberculosis and a polymorphic NF $\kappa$ B binding site in the interferon gamma gene.

Lancet. 361 (2003); 1871- 2.

48. 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. 96 (1997); 3880- 87.

49. Schömig, A., Kastrati, A., Mudra, H., Blasini, R., Schühlen, H., Klauss, V., Richardt, G., Neumann, F.J.

Four- year experience with Palmaz – Schatz stenting in coronary angioplasty complicated by dissection with threatened or present vessel closure.

Circulation. 90 (1994); 2716- 24.

50. Schömig, A., Neumann, F.J., Kastrati, A., Schülen, H., Blasini, R., Hadamitzky, M., Walter, H., Zitzmann- Roth, E., 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. 334 (1996); 1084- 89.

51. Schömig, A., Kastrati, A., Dirschinger, J., Mehilli, J., Schricke, U., Pache, J., Martinoff, S., Neumann, F.J., Schwaiger, M.

Coronary stenting plus platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade compared with tissue plasminogen activator in acute myocardial infarction. Stent versus Thrombolysis for Occluded Coronary Arteries in Patients with Acute Myocardial Infarction Study Investigators.

N Engl J Med. 343 (2000); 385- 91.

52. Schühlen, H., Kastrati, A., Dirschinger, J., Hausleiter, J., Elezi, S., Wehinger, A., Pache, J., Hadamitzky, M., Schömig, A.

- Intracoronary stenting and risk for major cardiac events during the first month.  
Circulation. 98 (1998); 104- 11.
53. Schühlen, H., Kastrati, A., Pache, J., Dirschinger, J., Schömig, A.  
Sustained benefit over four years from an initial combined antiplatelet regimen after  
coronary stent placement in the ISAR trial.  
Am J Cardiol. 87 (2001); 397- 400.
54. Schwartz, R.S.  
Pathophysiology of restenosis: interaction of thrombosis, hyperplasia, and/ or  
remodelling.  
Am J Cardiol. 81 (1998); 14E- 17E.
55. Serruys, P.W., de Jaegere, P., Kiemeneij, F., et al., for the Benestent Study Group :  
A comparison of balloon expandable stent implantation with balloon angioplasty in  
patients with coronary disease.  
N Engl J Med. 331 (1994); 489- 95.
56. Siffert, W., Roskopf, D., Siffert, G., Busch, S., Moritz, A., Erbel, R., Sharma,  
A.M., Ritz, E., Wichmann, H.E., Jakobs, K.H., Horsthemke, B.  
Association of a human G- protein  $\beta$  3 subunit variant with hypertension.  
Nat Genet. 18 (1998); 45- 8.
57. Sigwart, U., Puel, J., Mirkovitch, V., Joffre, F., Kappenberger, L.  
Intravascular stents to prevent okklusion and restenosis after transluminal angioplasty.

N Engl J Med. 316 (12) (1987), 701- 706

58. Tesauro, M., Thompson, W.C., Rogliani, P., Qi, L., Chaudhary, P.P., Moss, J.  
Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase associated with differences in severity of cardiopulmonary disease: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298.  
Proc Natl Acad Sci USA 97 (2000); 2832- 35.
59. Tellides, G., Tereb, D.A., Kirkiles- Smith, N.C., Kim, R.W., Wilson, J.H., Schechner, J.S., Lorber, M.I., Pober, J.S.  
Interferon- gamma elicits arteriosclerosis in the absence of leukocytes.  
Nature. (403) 2000; 207- 11.
60. The EPISTENT Investigators.  
Randomized placebo- controlled and balloon- angioplasty- controlled trial to assess safety of coronary stenting with use of platelet glycoprotein- IIb/IIIa blockade.  
Lancet. 352 (1998); 87- 92.
61. Thyse, T., Burchard, G.D., Nilius, M., Müller- Myhsok, B., Horstmann, R.D.  
Genome wide Linkage Analysis Identifies Polymorphism in the Human Interferon- $\gamma$  Receptor Affecting *Helicobacter pylori* Infection.  
Am J. Hum. Genet.. 72 (2003); 448- 453

62. Van Beusekom, H.M., Whelan, D.M., Hofma, S.H., Krabbendam, S.C., van Hinsbergh, V.W., Verdouw, P.D., van der Giessen, W.J.  
Long-term endothelial dysfunction is more pronounced after stenting than after balloon angioplasty in porcine coronary arteries.  
J Am Cardiol. 32 (1998); 1109- 17.
63. Van 't Hooft, F.M., von Bahr, S.J., 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 19 (1999); 3063- 70.
64. Walter, D.H., Schächinger, V., Elsner, M., Dimmeler, S., Zeiher, A.M.  
Platelet glycoprotein IIIa polymorphisms and risk of coronary stent thrombosis.  
Lancet. 350 (1997); 1217- 9.
65. Welt, F.G., Rogers, C.  
Inflammation and restenosis in the stent era.  
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 22 (2002); 1769- 76.
66. World Health Organisation Study Group. Diabetes mellitus.  
WHO Tech Rep Ser. 727 (1985); 1- 104.
67. Zohnhöfer, D., Richter, T., Neumann, F., Nuhrenberg, T., Weesely, R., Brandl, R., Murr, A., Klein, C.A., Baeuerle, P.A.

Transcriptome analysis reveals a role of interferon- gamma in human neitima formation.

Mol Cell. 7 (2001); 1059- 69.