Klinik für Herz- und Kreislauferkrankungen, Deutsches Herzzentrum München,

des Freistaates Bayern

Technische Universität München

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Schömig)

Einfluss vom eNOS 894G/T Polymorphismus auf den klinischen Verlauf nach koronarer Stentimplantation

Olga Gorchakova

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

Vorsitzender:	Univ.-Prof. Dr. D. Neumaier
Prüfer der Dissertation:	
	1. Univ.-Prof. A. Kastrati
	2. apl. Prof. Dr. M.P. Gawaz

Die Dissertation wurde am 05.12.2002 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 12.02.2003 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen 3

1. Einleitung 5

1.1 Koronare Herzerkrankung 5

1.2 Koronare Stentimplantation 5

1.3 Thrombotische Ereignisse nach Stentimplantation 7

1.4 Restenose nach Stentimplantation 10

1.5 Möglicher Einfluss genetischer Faktoren bei der Entwicklung von Thrombose und Restenose nach Stentimplantation 13

1.6 Wirkung von NO im Herzkreislaufsystem 16

1.7 NO-Synthasen 18

1.8 Das eNOS Gen 20

1.9 Zielsetzung und Fragestellungen 24

2. Methoden 26

2.1 Patienten und antithrombotische Therapie 26

2.2 Definitionen 26

2.3 Studienendpunkte 28

2.4 DNA-Isolierung 28

2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR) 28

2.6 Restriktionsenzymanalyse zur eNOS 894G/T Genotypisierung 29

2.7 Das TaqMan-Verfahren 33

2.8 Bestimmung des eNOS 894G/T Genotyps mittels TaqMan-Verfahren 35

2.9 Materialien und Geräte 38

2.10 Statistik 41

3. Ergebnisse 42

3.1 Eigenschaften der Patienten 42

3.2 Eigenschaften der Läsionen und der Interventionen 44

3.3 Restenose 46

3.4 Akute und subakute thrombotische Ereignisse nach Stentimplantation 48

3.5 Langfristiger klinischer Verlauf (1 Jahr) nach Stentimplantation 49

4. Diskussion 54

4.1 Thrombotische Frühkomplikationen 55

4.2 Restenose 56

4.3 Thrombotische Spätkomplikationen 57

4.4 Andere Befunde zur Bedeutung des eNOS 894G/T Polymorphismus 59

4.5 Stellenwert der Ergebnisse 61

5. Zusammenfassung 63

6. Literaturverzeichnis 66

Danksagung 86

Verzeichnis der Abkürzungen

A	- Adenin
AP-1, AP-2	- aktivierendes Protein 1 bzw. 2
Bp	- Basenpaar
C	- Cytosin
Ca^{2+}	- Calcium
CGMP	- zyklisches Guanosinmonophosphat
DNA	- Desoxyribonukleinsäure
ENOS	- endotheliale konstitutive NO-Synthase
G	- Guanin
GMZ	- glatte (Gefäß-) Muskelzellen
GP	- Glykoprotein
INOS	- induzierbare NO-Synthase
KDa	- Kilodalton
KHK	- koronare Herzerkrankung
LDL	- “low density” Lipoproteine
LPS	- Lipopolysacharide
MI	- Myokardinfarkt
MRNA	- messenger (Boten-) Ribonukleinsäure
NF-1	- nuklearer Faktor 1
NNOS	- neuronale NO-Synthase
NO	- Stickstoffmonoxid
PAVK	- periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCR	- Polymerasekettenreaktion
PDGF	- Platelet Derived Growth Factor

SP-1	- stimulierendes Protein 1
T	- Thymin
Tris	- Hydroxymethylaminomethan
UV	- Ultraviolett

1. Einleitung

1.1 Koronare Herzerkrankung

Die koronare Herzerkrankung (KHK) ist eine Erkrankung bei der es durch arteriosklerotische Verengungen an den Herzkranzgefäßen zu einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffverbrauch des Herzmuskels kommt. Diese Krankheit ist gegenwärtig die häufigste zum Tode führende Erkrankung in den Industrienationen. Der Anteil an der Gesamtmortalität beträgt bis zu 30 %.

Durch epidemiologische Studien konnten Risikofaktoren für das Auftreten der koronaren Herzerkrankung identifiziert werden (Fuster et al., 1996). Dabei werden beeinflussbare (u.a. Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, Bluthochdruck, körperliche Inaktivität und Zigarettenrauchen) und nicht beeinflussbare (erbliche Belastung, männliches Geschlecht und Alter) unterschieden. Männer zwischen 45 und 50 erkranken an KHK wesentlich häufiger als gleichaltrige Frauen (Tejada et al., 1968). Bei ca. 30 % der Erkrankten spielt eine familiäre Belastung eine Rolle (Myers et al., 1990). Mit zunehmendem Alter jedoch nimmt der Einfluss der genetischen Faktoren ab und der Einfluss der umweltbedingten meist beeinflussbaren Faktoren zu (Ardissino et al., 1999).

1.2 Koronare Stentimplantation

Perkutane Koronarinterventionen nehmen derzeit eine zentrale Rolle bei der Behandlung der koronaren Herzerkrankung ein. Die erste Ballondilatation (perkutane transluminale Koronarangioplastie, PTCA) einer verengten Koronararterie wurde 1977 von Andreas Gruentzig (Gruentzig, 1981) durchgeführt. Durch die Einführung von Gefäßstützen (Stents)

Ende der 80er Jahre konnten zwei wesentliche Probleme der „einfachen“ PTCA gelöst werden, nämlich das Auftreten progredienter Dissektionen, die zu einem Gefäßverschluss führen können und das elastische Zurückschnurren (elastic recoil) der Gefäßwand nach erfolgter Dehnung. Durch die Einführung der kombinierten antithrombozytären Therapie Mitte der 90er Jahre konnte die Inzidenz der thrombotischen Frühkomplikationen bereits erheblich reduziert werden (Schömig et al., 1996; Gawaz et al., 1996). Trotz dieser Fortschritte entwickeln jedoch immer noch 20 bis 50% der Patienten nach Koronarinterventionen Komplikationen (Ferns et al., 2000), die z.T. mit hoher Morbidität und Mortalität assoziiert sind. Das Auftreten eines thrombotischen Verschlusses (Stentthrombose) und die erneute Verengung (Restenose) des mit dem Stent behandelten Gefäßabschnittes bilden zur Zeit die wesentlichen Limitierungen der koronaren Stentimplantation.

Durch die Ballondilatation und die nachfolgende Stentimplantation kommt es – zusätzlich zu der bereits bestehenden arteriosklerotischen Läsion - zu einer akuten Verletzung der Gefäßwand, die eine Kaskade von Ereignissen in Bewegung setzt. Dazu gehören sowohl eine lokale und systemische Aktivierung der Thrombozyten, als auch Migration und Vermehrung glatter Gefäßmuskelzellen, die zusätzlich überschießend extrazelluläre Matrix synthetisieren. Wie in Tiermodellen und in postmortalen Untersuchungen gezeigt werden konnte (Edelman et al., 1998; Schwartz, 1998; Grewe et al., 2000), verändert sich die mit einem Stent behandelte Gefäßläsion ähnlich wie bei anderen Wundheilungsprozessen in einer bestimmten chronologischen Reihenfolge. Grewe und Mitarbeiter (Grewe et al., 2001) beschreiben drei aufeinander folgende Phasen: 1) Frühphase (komplette Destruktion der Endothelschicht und thrombotische Auflagerungen im Bereich der Läsion und auf den Stentstreben), 2) Intermediärphase (Infiltration der Läsion mit Leukozyten und Lymphozyten, sowie Einwanderung, Proliferation und Sekretion der glatten Muskelzellen) und 3) eine Spätphase (vollständige Reendothelisation und die Verdickung der Gefäßwand infolge der glatten

Muskelzellvermehrung und der neu synthetisierten extrazellulären Matrix). Eine schematische Darstellung der beschriebenen Vorgänge enthält Abbildung 1.

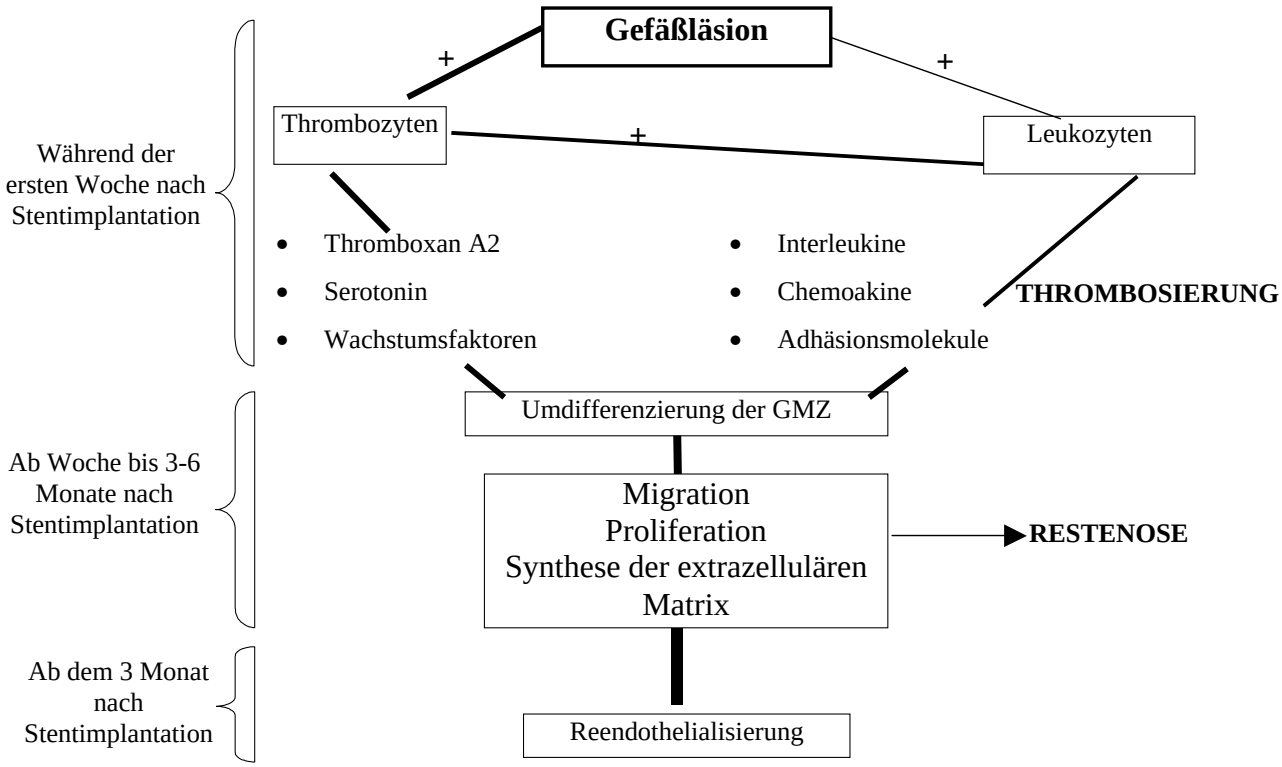


Abbildung 1: *Die Stadien der Veränderungen in der Gefäßwand nach der Stentimplantation (nach Edelman et al., 1998; Ferns et al., 2000; Grewe et al., 2000)*

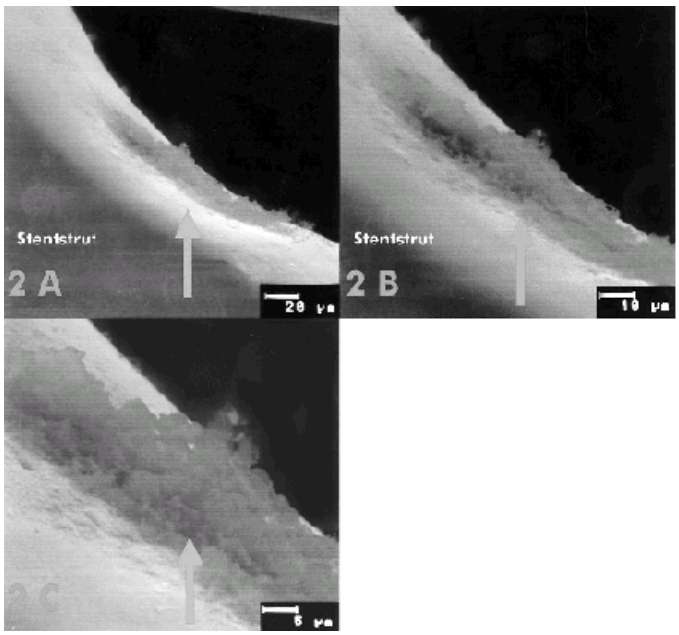
1.3 Thrombotische Ereignisse nach Stentimplantation

Der thrombotische Verschluss des mit einem Stent behandelten Gefäßsegmentes innerhalb der ersten 30 Tage nach der Intervention („subakute Stentthrombose“) ist die bedeutendste und gefährlichste thrombotische Komplikation nach koronarer Stentimplantation. Andere thrombotische Komplikationen sind thrombotische Seitastverschlüsse und die Embolisation von Plättchenaggregaten, die zu vorübergehenden Anstiegen der Herzenzyme (Kreatinkinase und Troponin) führen. In klinischen Studien wird für die Analyse der thrombotischen Frühkomplikationen oft ein zusammengesetzter Endpunkt, bestehend aus Tod, Myokardinfarkt (unter Berücksichtigung des Verlaufs der Herzenzyme), angiographisch

dokumentierter Stentthrombose und dringlicher Revaskularisierung des Zielgefäßes innerhalb der ersten 30 Tage nach Implantation, verwendet. Durch dieses Vorgehen werden alle relevanten thrombotischen Ereignisse erfasst. Thrombotische Ereignisse treten aber auch noch später als nach 30 Tagen auf (siehe Ergebnisse 3.5).

Die Implantation eines ballonexpandierten Stents führt zu einer kompletten Destruktion der Endothelzellschicht, wie es die Untersuchungen an verstorbenen Patienten belegen konnten (Grewe et al., 2001). Dadurch werden die tiefer liegenden thrombogenen Strukturen des Subendothels, u.a. Kollagen, Fibronektin und Laminin, freigelegt. Wie im Tiermodell und durch pathologisch-anatomische Präparate gezeigt werden konnte, führt eine so ausgeprägte Endothelverletzung in der Frühphase nach Stentimplantation zur Ausbildung einer dünnen, membranösen Thrombusschicht auf der verletzten Gefäßwand. Zusätzlich ist die metallene Oberfläche eines Stents im hohen Maße thrombogen (Herrmann et al., 1998) und deswegen bildet sich auch bereits in der Frühphase eine Thrombusschicht auf der Oberfläche der Stentstreben (Abbildung 2) (Gonschior et al., 1995; Grewe et al., 1997). Die Adhäsion der Thrombozyten führt zugleich zu ihrer eigenen Aktivierung, wobei verschiedene vasoaktive Substanzen (z.B. Serotonin, Thromboxan A2) und Wachstumsfaktoren von Thrombozyten (z.B. PDGF, epidermale Wachstumfaktor, transformiende Wachstumsfaktor-ß) freigesetzt werden (Gawaz et al., 1996). Die Aktivierung der Thrombozyten bedingt durch Zell-Zell Interaktionen auch die Aktivierung der Leukozyten (McEver, 1994; Neumann et al., 1996; Ott et al., 1996). Hinzukommend sind die Thrombozyten im akuten Koronarsyndrom (Myokardinfarkt, instabile Angina pectoris) bereits vor der Intervention aktiviert (Gawaz et al., 1996). Es konnte gezeigt werden, dass die Thrombozyten im Bereich der behandelten Plaque aktiviert werden (Neumann et al., 1996). Das Ausmaß der Thrombozytenaktivierung und der dadurch bedingten Degranulation im Verlauf nach Stentimplantation besitzt eine prädiktive Aussagekraft für das Auftreten der subakuten Stentthrombose (Gawaz al., 1996).

Alle diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die Thrombozytenfunktion im Frühverlauf nach koronarer Stentimplantation für die Entwicklung der thrombotischen Komplikationen von großer Bedeutung ist. Deswegen ist es nicht verwunderlich, dass durch den Einsatz einer kombinierten antithrombozytären Therapie mit Acetylsalicylsäure und Thienopyridinen, ggf. ergänzt durch einen Glykoprotein (GP) IIb/IIIa-Antagonisten die Inzidenz subakuter Stentthrombosen und anderer thrombotischer Ereignisse (im Vergleich zu der früher verwendeten Antikoagulation) drastisch gesenkt werden konnte (Lefkovits et al., 1997; Gawaz et al., 1998; The EPISTENT Investigators, 1998; Schömig et al., 2000; Neumann et al., 2001).



<u>Abbildung 2:</u> *Thrombotische Auflagerungen im Bereich einer Stentstrebe 48 Stunden nach Implantation. Der 68-jährige Patient, bei dem im kardiogenen Schock die Stentimplantation durchgeführt worden war, verstarb 48 Stunden nach Implantation. A, Ausschnittsvergrößerung einer Stentstrebe (500fach). B, bei stärkerer Vergrößerung kann eine Schichtung des thrombotischen Materials erkannt werden (1000fach). C, das Metall ist von einer dünnen Proteinschicht überzogen. Erst in einer äußeren Schicht des Thrombus finden sich Erythrozyten und Thrombozyten (3000fach). Aus (Grewe et al., 1997)*

1.4 Restenose nach Stentimplantation

Im Gegensatz zu den thrombotischen Komplikationen, deren Inzidenz durch kombinierte antithrombozytäre Therapieregime erheblich gesenkt werden konnte, stellt die Restenose das bislang überwiegend ungelöste Problem der interventionellen Kardiologie dar. Die Häufigkeit des Auftretens dieser Komplikation liegt bei 20-50% aller Fälle (Ferns & Avades, 2000). Nach der angiographischen Definition liegt eine Restenose vor, wenn es während der ersten 6 Monate nach Implantation zu einer Lumeneinengung mit einer mehr als 50%igen Reduktion des Gefäßdurchmessers im behandelten Abschnitt gekommen ist (Schömig et al., 1997). Ein alternatives Maß für die Restenose ist die Inzidenz der notwendig gewordenen Reinterventionen während des ersten Jahres nach der Intervention. Diese Zahl repräsentiert die Fälle von Restenosierung, die zu einer erneuten Angina pectoris Symptomatik geführt haben. Sowohl eine spezifische systemische medikamentöse Therapie als auch alternative angioplastische Verfahren wie die Rotablation, Atherektomie oder Laserbehandlung führten bisher zu keiner überzeugenden Reduktion der Restenose. Die lokale Applikation antiproliferativer Substanzen sowie die lokale Gentherapie zeigten bis vor kurzem lediglich im Tierexperiment mögliche therapeutische Ansatzpunkte. Vielversprechend in dieser Hinsicht haben sich die mit der immunsuppressiven und antiproliferativen Substanz Rapamycin beschichteten Stents gezeigt (Morice et al., 2002). Jedoch sind weitere Studien mit größeren Zahlen eingeschlossener Patienten und die Beobachtung der Langzeitverläufe erforderlich, um den Nutzen für die Patienten besser abschätzen zu können.

Das Substrat der Restenose ist die sich überschießend neu bildende Intima („Neointima“). Dieses Gewebe besteht aus glatten Gefäßmuskelzellen (Grewe et al., 1997; Kearney et al., 1997; Farb et al., 1999), die aus der Mediaschicht der Gefäßwand gewandert sind und sich vermehrt haben und von diesen Zellen synthetisierter extrazellulärer Matrix. Es werden verschiedene Faktoren als Auslöser der zugrunde liegenden exzessiven Aktivierung der

glatten Gefäßmuskelzellen diskutiert. Dazu gehören 1) die initiale Interaktion von Thrombozyten mit der verletzten Gefäßwand, 2) die Infiltration von Leukozyten und 3) die Zerstörung des Endothels. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass die Proliferationsrate der aus dem Neointimagewebe gewonnenen glatten Muskelzellen durch die Zugabe von thrombotischem Material in das Kulturmedium erhöht wird (MacLeod et al., 1994). Dies ist vermutlich auf von aktivierten Thrombozyten freigesetzte Substanzen, wie Platelet Derived Growth Faktor (PDGF) zurückzuführen. Dem PDGF, der in signifikanten Mengen von Thrombozyten und Leukozyten freigesetzt werden kann, wird wegen seiner chemotaktischen und proliferativen Wirkung auf glatte Muskelzellen (Ferns et al., 1991; Jawien et al., 1992) eine wichtige Rolle zugeschrieben. In einem Angioplastiemodell der Ratte konnte durch die Blockade von PDGF mittels eines neutralisierenden Antiserums eine Hemmung der Neointimabildung erreicht werden (Ferns et al., 1991). Aktivierte Thrombozyten bilden das Leukozytenchemokin MCP-I (Monocyte Chemotactic Protein-1) (Gawaz et al., 1998), das zur Rekrutierung von Leukozyten in den behandelten Gefäßabschnitt beitragen kann. Etwa eine Woche nach der Stentimplantation kommt es zu einer Entzündungsreaktion in der Gefäßwand mit einer massiven Infiltration von Leukozyten. Die die Gefäßwand infiltrierende Leukozyten können weitere aktivierend wirkenden Substanzen, wie z.B. FGF (Fibroblast Growth Faktor) freisetzen, die zu einer zusätzlichen Stimulation der glatten Gefäßmuskelzellen führen. Eine vollständige Abdeckung der inneren Gefäßwand mit Endothel wird erst 3 Monate nach der Intervention erreicht (Farb et al., 1999; Grewe et al., 2000). Neben vielen anderen Funktionen (u.a. Bildung einer antithrombotischen Oberfläche und Regulation des Gefäßtonus) ist das Endothel auch ein wichtiger Regulator der Funktion der glatten Muskelzellen. Es wird angenommen, dass das Fehlen der Endothelzellschicht in der Früh- und Intermediärphase der Stentheilung ein Kofaktor für die exzessive Proliferation der glatten Muskelzellen darstellt (van Beusekom et al., 1998). Die oben beschriebenen Mechanismen führen zu einer Veränderung des Phänotyps der normalerweise hoch differenzierten, ortständigen und

kontraktilen glatten Gefäßmuskelzellen der Media. Diese Zellen entdifferenzieren und sind dann in der Lage zu migrieren und große Mengen an extrazellulärer Matrix zu synthetisieren (MacLeod et al., 1994; Hoffmann et al., 1996; Komatsu et al., 1998). Die Ausbildung der Neointima durch Migration der phänotypisch veränderten glatten Muskelzellen ist ab etwa 14 Tagen nach erfolgter Stentimplantation in histologischem Material nachweisbar (Abbildung 3) (Komatsu et al., 1998; Grewe et al., 2000).

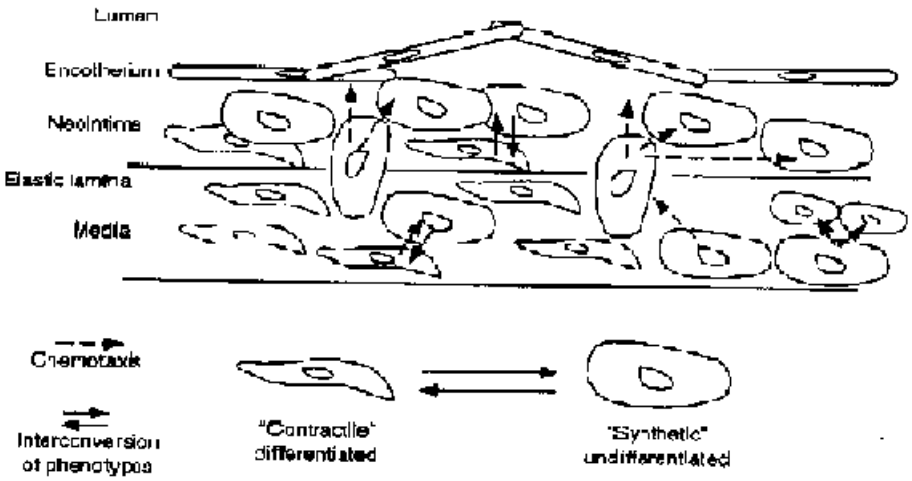


Abbildung 3: *Schematische Darstellung der Ausbildung der Neointima durch Migration, Proliferation und Veränderung des Phänotyps glatter Gefäßmuskelzellen (aus Duel TF et al., 1999)*

Wenn sich das neointimale Gewebe überschießend entwickelt, geht der initial durch die Stentimplantation erreichte Lumenzuwachs wieder verloren und es kommt zu einer relevanten Restenosierung. Dieser Prozess (die Neointimabildung) dauert durchschnittlich 3-6 Monate, wie in pathologisch-anatomischen und klinischen Studien festgestellt wurde (Kastrati et al., 1993; Grewe et al., 2000).

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

Während der letzten Jahre wurden große Anstrengungen unternommen, genetische Faktoren bei der Entstehung komplexer Erkrankungen (z.B. Diabetes mellitus, rheumatoide Arthritis und auch koronare Herzerkrankung) zu identifizieren. Diese Erkrankungen entstehen unter Zusammenwirken von exogenen Faktoren und vermutlich einer Vielzahl von genetischen Faktoren.

In diesem Zusammenhang sind vor allem Genpolymorphismen interessant. Hierbei handelt es sich um häufig vorkommende Varianten der genomischen DNA. Die Definition beinhaltet, dass das häufigste Allel mit einer Frequenz < 0,99 in der untersuchten Population vorkommt. Bei den meisten der untersuchten Polymorphismen handelt es sich um Einzelbasenpolymorphismen (single nucleotide polymorphisms, SNPs), die im Abstand von durchschnittlich etwa 1000 Basen im menschlichen Genom vorkommen. Die Bedeutung der meisten dieser Polymorphismen ist nicht bekannt.

Prinzipiell kann ein Polymorphismus die Menge (Quantität) oder die Eigenschaften (Qualität) des Genproduktes beeinflussen. So konnte an der Hand einer Reihe von Beispielen gezeigt werde, dass Polymorphismen im Promotor eines Gens Transkription und Expression des Gens beeinflussen können (van 't Hooft et al., 1999). In diesen Fällen verändert sich oft die Bindungsstelle für einen oder mehrere Transkriptionfaktoren. In anderen Fällen konnte gezeigt werden, dass Genpolymorphismen einen Einfluss auf Spleißen und Stabilität der Messenger RNA (mRNA) haben können (Siffert et al., 1998). Polymorphismen können aber auch zu einem Austausch einer Aminosäure oder einer anderen Veränderung der Aminosäuresequenz des Genproduktes führen. Derartige Veränderungen der

Aminosäuresequenz können natürlich zu erheblichen Veränderungen der Funktion des Proteins führen. Es sind auch Fälle bekannt, bei denen der Austausch einer Aminosäure zum Einfügen (Tesauro et al., 2000) oder Wegfallen (Nicolaes et al., 2002) einer Schnittstelle für Proteasen führt. Dadurch kann wiederum die Menge (Quantität) an verfügbarem Genprodukt beeinflusst werden. Abbildung 4 zeigt schematisch wie ein Genpolymorphismus sich auf Quantität und Qualität des Genproduktes auswirken kann.

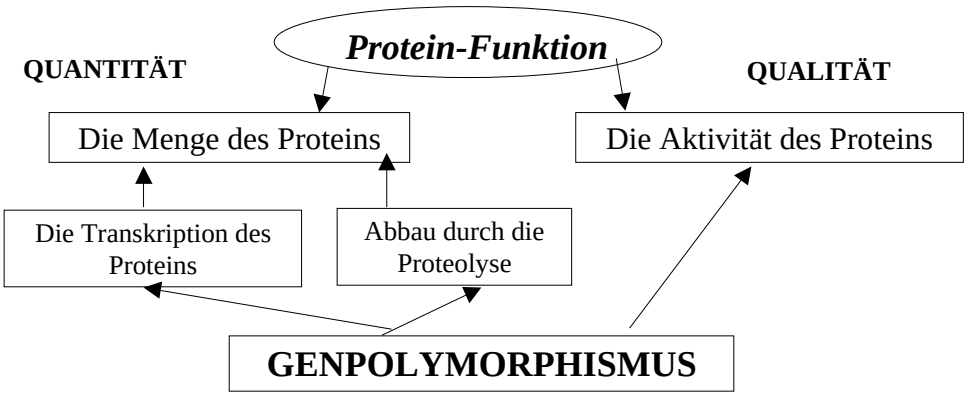


Abbildung 4: *Schema zum möglichen Einfluss eines Genpolymorphismus auf Quantität und Qualität des Genproduktes*

Nun ist es anzunehmen, dass Genpolymorphismen nicht nur einen Einfluss auf die Entstehung von komplexen Erkrankungen haben, sondern auch einen Einfluss auf das Ansprechen der Patienten auf die verschiedenen, verfügbaren Therapieformen. Uns beschäftigte in diesem Zusammenhang der Einfluss von Genpolymorphismen auf das Auftreten bestimmter Komplikationen nach koronarer Stentimplantation, was auch Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Arbeit ist. Am Beispiel der Ausbildung der Restenose nach Stentimplantation konnte unsere Arbeitsgruppe bereits vor einigen Jahren zeigen, dass personengebundene aber unbekannte (möglicherweise genetische) Faktoren das Restenoserisiko beeinflussen müssen (Schömig et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß der Restenosierung zum

Zeitpunkt der Kontrollangiographie sechs Monate nach Stentimplantation bimodal verteilt ist. Ein Gipfel des Histogramms zur Häufigkeitsverteilung lag bei 30 % und der andere Gipfel bei 70 % Durchmesserstenose sechs Monate nach Stentimplantation. Dieses Ergebnis sprach bereits dafür, dass es zwei getrennte Gruppen von Patienten gibt, die eine unterschiedliche Neigung für die Ausbildung einer Restenose haben. In einer anderen Studie stellte sich heraus, dass das Risiko der Restenosierung um das Zweieinhalbfache erhöht ist, wenn es bei dem selben Patienten in einem anderen Gefäßabschnitt bereits zu einer Restenose gekommen war. Zuvor war eine multivariate Analyse durchgeführt worden, die Unabhängigkeit dieses Einflusses von anderen bekannten Risikofaktoren für die Ausbildung einer Restenose, wie z.B. Diabetes mellitus, belegte (Kastrati et al., 1997).

Tatsächlich konnte kürzlich für einige Polymorphismen in Genen von kardiovaskulären Schlüsselproteinen gezeigt werden, dass sie mit einem ungünstigen/günstigen Verlauf nach koronarer Stentimplantation assoziiert sind. So konnte gezeigt werden, dass das Pl^{A2} Allel des Glykoprotein IIIa (eine der beiden Untereinheiten des thrombozytären Fibrinogenrezeptors GP IIb/IIIa) einerseits mit einer erhöhten Inzidenz von thrombotischen Ereignissen (Walter et al., 1997; Kastrati et al., 2000) und andererseits mit einer erhöhten Restenoserate (Kastrati et al., 1999) assoziiert ist. Außerdem konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass das Allel 2 des Gens des Interleukin-1-Rezeptor-Antagonisten (IL-1RN*2) vor der Ausbildung einer Restenose nach Stentimplantation schützt (Kastrati et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit haben wir die mögliche Assoziation eines funktionell bedeutsamen Polymorphismus im Gen der endothelialen NO-Synthase (eNOS) mit dem klinischen Verlauf nach koronarer Stentimplantation untersucht. Die eNOS ist ein weiteres Schlüsselprotein bei der Regulation des Herz-Kreislaufsystems.

1.6 Wirkung von NO im Herzkreislaufsystem

Furchgott et al. beschrieben das Phänomen, dass eine durch Acetylcholin vermittelte Vasodilatation nur in der Gegenwart eines intakten Endothels nachweisbar ist (Furchgott et al., 1980). Nach Entfernen des Endothels führte Acetylcholin durch seine direkte Wirkung auf die glatten Gefäßmuskelzellen zu einer Vasokonstriktion. Die Acetylcholin-vermittelte Vasodilatation beruht auf der Freisetzung eines endothelialen Faktors der als „EDRF“ (Endothelium Derived Relaxing Factor) bezeichnet wurde und dessen molekulare Identität als Stickstoffmonoxid (NO) erst später erkannt wurde (Furchgott, 1999).

NO gehört zu den wichtigsten vom Endothel freigesetzten Mediatoren. NO besitzt eine Reihe von Eigenschaften, die für die Homeostase und Tonusregulation der Gefäßwand wichtig sind. NO 1) hemmt die Kontraktion der glatten Muskelzellen, 2) hemmt die Aktivierung der Thrombozyten (Freedman et al., 1997), 3) wirkt antiinflammtorisch (Pabla et al., 1996) und 4) hemmt die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (Murad, 1997). NO aktiviert die Guanylatzyklase und führt dadurch in den Zielzellen zu einem Anstieg von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP), dass die intrazellulären Effekte vermittelt. In Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, dass cGMP die Umwandlung von glatten Gefäßmuskelzellen in einen proliferierenden, migrierenden und Matrixmoleküle synthetisierenden Zelltyp hemmt (Garg et al., 1989; Kolpakov et al., 1995; Dey et al., 1998). NO reduziert den Sauerstoffverbrauch des Herzens sowohl durch seine Wirkung auf Herzmuskelzellen als auch durch eine Senkung der Herzfrequenz (Kelly et al., 1996). In Tabelle 1 sind die wichtigsten kardiovaskulären Wirkungen von NO aufgelistet.

Tabelle 1: *Wirkung von NO auf relevante Zellen des Herzkreislaufsystems*

Zelltyp	NO-Wirkung
Thrombozyten	Inhibierung: • Thrombozytendegranulation – Freisetzung der Wachstumsfaktoren (PDGF, EGF) und vasoaktiven Substanzen. • Expression von Adhäsionsmolekulen (P-Selektin, Glykoproteinen)
Leukozyten	Inhibierung: • Chemotaxis • Expression von Adhäsionsmolekülen (P- und E-Selektin, VCAM-1, ICAM-1, MCP-1) und Tissue Faktor • Freisetzung von Zytokinen
Glatte Muskelzellen	• Relaxation • Hemmung der Aktivierung und dadurch der Migration und Proliferation (vermehrte Expression des Zellzyklusinhibitors p21, Inhibierung der Ribonukleotid-Reduktase) • Hemmung der Synthese extrazellulärer Matrix
Kardiomyozyten	• Senkung des Sauerstoffverbrauchs

Es gibt eine Reihe von Hinweisen dafür, dass eine „Endotheldysfunktion“ mit verminderter NO-Freisetzung zu Arteriosklerose und koronarer Herzerkrankung führt. Dazu gehören auch Messungen der koronaren und brachialen endothelabhängigen Vasodilatation (Ludmer et al., 1986; Casino et al., 1993; Drexler, 1999). L-Arginine (das Substrat der NO-Synthasen) und NO-Donatoren, wie Molsidomin, scheinen sowohl eine hemmende Wirkung auf die Progression der Arteriosklerose bei Menschen (Adams et al., 1997) als auch auf die

Ausbildung thrombotischer Auflagerungen (Groves et al., 1993) nach Ballonschädigung in Tiermodellen zu haben. Die Endothelfunktion wurde als wichtiger Prädiktor für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse bei Patienten mit bereits arteriosklerotisch veränderten Herzkranzgefäßen identifiziert (Schachinger et al., 2001). Die gleiche Arbeitsgruppe konnte durch Messungen im Katheterlabor zeigen, dass eine positive Familienanamnese für das Auftreten einer KHK mit einer eingeschränkten Endothelfunktion assoziiert ist (Schachinger et al., 1999). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass möglicherweise genetische Faktoren einen Einfluss auf die Endothelfunktion haben. Es wäre möglich, dass die Verfügbarkeit von NO auch durch genetische Faktoren beeinflusst ist.

Aufgrund der antithrombozytären, antiinflammatorischen, antiproliferativen und somit insgesamt günstigen Wirkung von NO wurde hypothetisiert, dass ein Mangel an NO einen negativen Einfluss auf das Ergebnis nach perkutanen Koronarinterventionen haben kann (George, 1999). NO hat eine extrem kurze Halbwertszeit und deswegen wird die Verfügbarkeit von NO hauptsächlich durch die Synthese von NO, die durch NO-Synthasen katalysiert wird, bestimmt. Die basale NO-Freisetzung wird vor allem durch die konstitutive endotheliale NO-Synthase (eNOS) in der Gefäßwand gewährleistet (Wang et al., 1997). Das eNOS Gen ist polymorph und es wurde bereits vor einigen Jahren postuliert, dass Polymorphismen im eNOS-Gen einen Einfluss auf die NO-Aktivität in der Gefäßwand haben könnten (Wang et al., 1997).

1.7 NO-Synthasen

eNOS gehört zur NO-Synthasen Enzymfamilie, die aus L-Arginin die NO-Synthese katalysieren (Moncada, 1997). Diese Enzymfamilie schließt 3 Mitglieder ein, und zwar die

neuronale NO-Synthase (nNOS), die konstitutive endotheliale NO-Synthase (eNOS), und die induzierbare NO-Synthase (iNOS), derer Expression im Vergleich zu den zwei früher genannten NO-Synthasen, erst durch die bei einer Entzündungsreaktion freigesetzten Mediatoren (Zytokine) induziert wird. iNOS wird vor allem in Makrophagen exprimiert. Bei lang anhaltenden inflammatorischen Signalen kommt es zu einer Überexpression der iNOS, wobei eine große Menge NO gebildet wird. Dies kann zu der Bildung von freien Radikalen führen und dadurch Zellschäden verursachen (Hoit, 2001). nNOS wird vor allem in neuronalem Gewebe exprimiert und das durch die nNOS katalysierte NO wirkt als Neurotransmitter (Balligand et al., 1997).

Die eNOS ist ein Ca^{2+}-abhängiger Enzym, das mit dem Membranprotein Calveolin verbunden ist und meistens in als Calveolen bezeichneten intrazellulären Kompartimenten lokalisiert ist. Die eNOS wird vor allem im Endothel und in Kardiomyozyten exprimiert (de Belder et al., 1993). eNOS-Expression konnte unter anderem aber auch in Monozyten und Thrombozyten nachgewiesen werden (Sase et al., 1995).

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass bei Arteriosklerose entweder die Funktion von eNOS oder die Menge von eNOS verändert sein kann (Maxwell et al., 1999). Im Tiermodell konnte durch lokalen eNOS Gentransfer die neointimale Hyperplasie nach Ballonschädigung reduziert werden (Janssens et al., 1998; Shears et al., 1998; Varenne et al., 1998). Diese Befunde lassen annehmen, dass die „Quantität“ oder die „Qualität“ der lokal verfügbaren eNOS einen Einfluss auf den Verlauf nach perkutanen Koronarinterventionen haben können. Deswegen ist es interessant Polymorphismen des eNOS Gens zu studieren, da diese prinzipiell Quantität und Qualität der eNOS beeinflussen können.

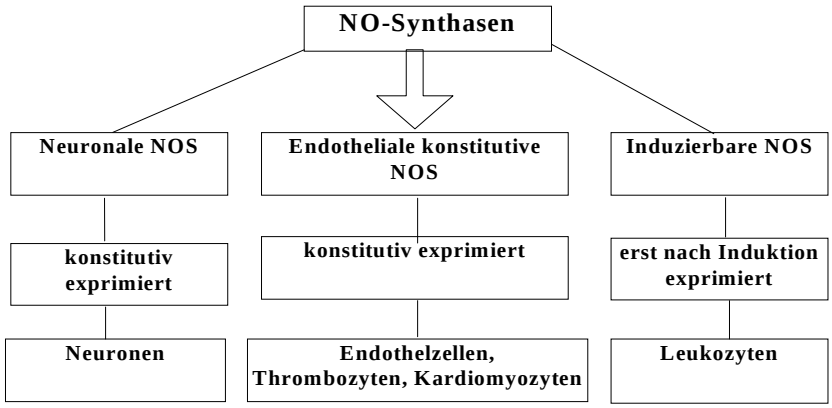


Abbildung 5: *Die Familie der NO-Synthasen beinhaltet drei verschiedene Enzyme*

1.8 Das eNOS Gen

Das eNOS Gen ist ein auf Chromosom 7q35-7q36 lokalisiertes, 26 Exons und 25 Introns beinhaltendes Gen. Die cDNA besteht, poly (A)-Teil ausgeschlossen, aus 4052 Nukleotiden und verteilt sich über 21kb menschliche genomische DNA (Marsden et al., 1993). Das kodierte Protein hat ein Molekulargewicht von 135 kDa (Balligand & Cannon, 1997).

Wie bereits erwähnt wird das eNOS Gen konstitutiv exprimiert, d.h., dass die Expression in Zellen ohne irgendwelche Stimulation unter basalen Bedingungen nachgewiesen werden kann. Der Promotorabschnitt enthält etliche cis-regulierende Sequenzen, die als Bindungsstellen für AP-1, AP-2, NF-1, cAMP und Sp-1 gelten. Sp-1 ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor für die Expression einer Reihe von endothelialen Genen und scheint auch für die Transkription von eNOS endscheidend zu sein (Zhang et al., 1995). Es ist wichtig zu erwähnen, das der Promotor des eNOS Gens auch ein Element für die Erkennung von Scherstress enthält. Deswegen ist es möglich, dass die Bildung der mRNA bei

hämodynamischer Belastung hochreguliert wird (Nishida et al., 1992). Außerdem befindet sich in dieser Region auch eine Bindungsstelle für Östrogen und LPS (Miyahara et al., 1994). Schematisch ist die Struktur des eNOS Gens und dessen Promotors mit den Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren in Abbildung 6 dargestellt.

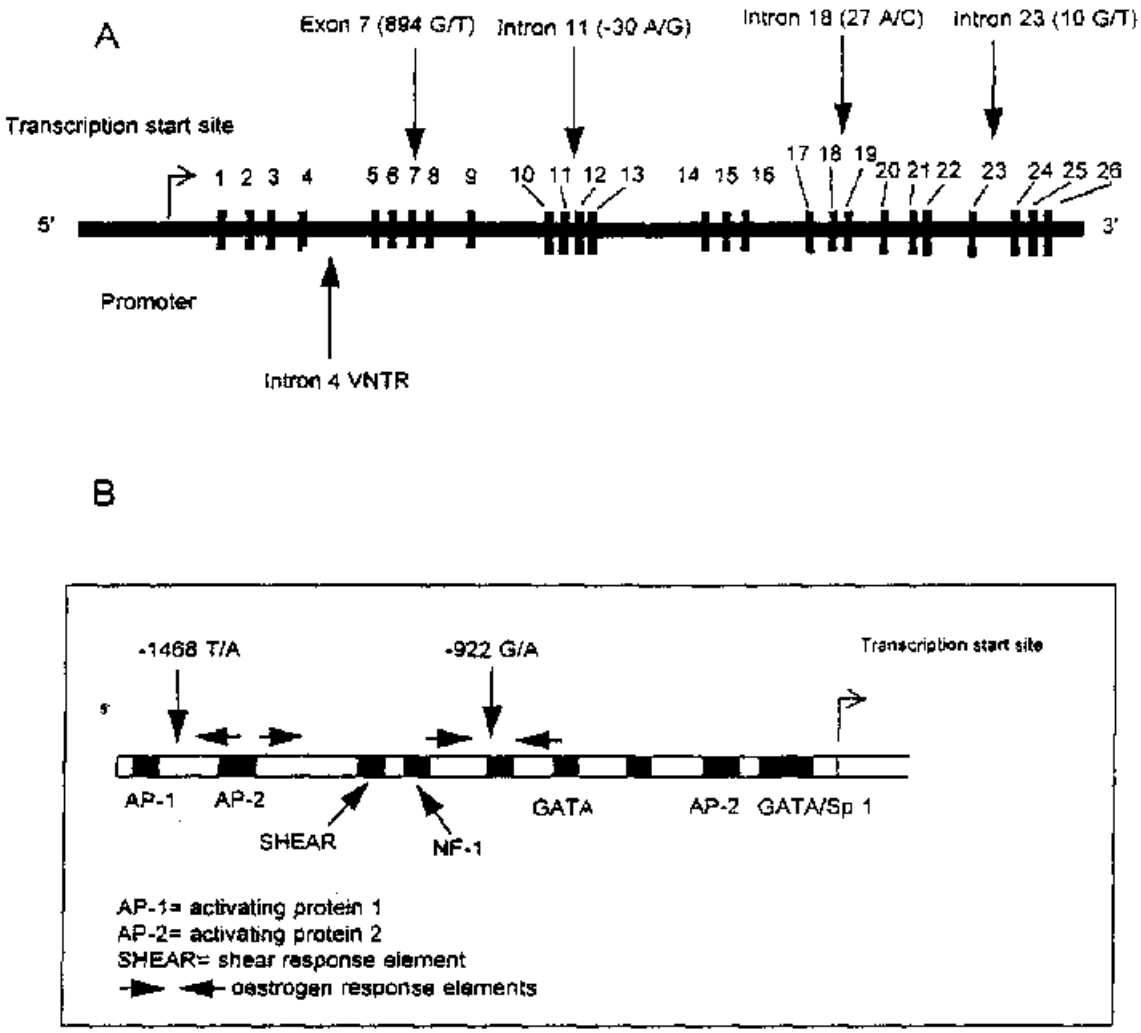


Abbildung 6: *Schemata zum eNOS Gen. A, Aufteilung in Promotor, Exons und Introns mit Lokalisation einiger der Polymorphismen. B, Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren und Polymorphismen im Promotorbereich. Beide aus (Hingorani et al., 1999).*

Wie bereits Abbildung 6 zu entnehmen ist, sind für das eNOS Gen einige Polymorphismen bekannt. Wang und Mitarbeiter haben den Zusammenhang zwischen einem eNOS Polymorphismus (der 27-bp Wiederholungs-Polymorphismus in Intron 4) und der NO-Produktion bei gesunden Menschen untersucht (Wang et al., 1997). Es konnte dabei gezeigt werden, dass die Anzahl von Wiederholungen einen Einfluss auf die NO-Bildung hat. Zu anderen gut beschriebenen Polymorphismen des eNOS Gens gehören der eNOS -786T/C und der eNOS 894G/T Polymorphismus. Der eNOS -786T/C Polymorphismus liegt in der 5‘ flankierenden Region des Promotors (Nakayama et al., 1999). Das eNOS –786CC Allel ist mit einer reduzierten Transkription des Gens assoziiert was vermutlich eine verminderte NO-Bildung nach sich zieht. Es konnte gezeigt werden, dass das C Allel auch mit einem erhöhten Risiko für Atherosklerose (Ghilardi et al., 2002) und Koronarspasmen korreliert (Nakayama et al., 1999; Yoshimura et al., 2000).

Der zweite bekannte Polymorphismus ist der eNOS 894G/T Polymorphismus, der in Exons 7 liegt und zum Austausch von Guanin durch Thymin an Position 894 führt. Der Nukleotidaustausch wiederum bedingt den Austausch einer Aminosäure und zwar von Glutamat durch Aspartat. Vor kurzem wurde auch eine funktionelle Bedeutung dieses Polymorphismus entdeckt. Der Aminosäureaustausch führt zur Bildung einer neuen Schnittstelle für Proteasen (Tesauro et al., 2000). Die entsprechenden Proteinfragmente konnten auch in menschlichem Herzgewebe nachgewiesen werden. Ebenfalls in menschlichem Gewebe konnte gezeigt werden, dass die Gegenwart des 894T Allels zu einer verringerten eNOS Aktivität führt (Wang et al., 2000). Zuvor war bereits ein signifikanter Einfluss des Polymorphismus auf die NO-Freisetzung von Thrombozyten, die auch die eNOS exprimieren, nachgewiesen worden. Thrombozyten von gesunden TT Spendern setzten mehr NO nach Stimulation frei als Thrombozyten von gesunden G Allel tragenden Spendern (Tanus-Santos et al., 2002).

In einigen klinischen Studien konnte eine Assoziation zwischen dem eNOS 894G/T Genotyp und kardiovaskulären Erkrankungen/Ereignissen (koronare Herzerkrankung, arterielle Hypertonie, Myokardinfarkt, koronarer Vasospasmus) gezeigt werden (Hibi et al., 1998; Shimasaki et al., 1998; Shimasaki et al., 1998; Hingorani et al., 1999). Wegen der Vielzahl von experimentellen und klinischen Daten zur Bedeutung dieses Polymorphismus schien es uns gut möglich, dass der eNOS 894G/T Genotyp auch einen Einfluss auf den Verlauf und die Rate an Komplikationen nach koronarer Stentimplantation haben könnte.

1.9 Zielsetzung und Fragestellungen

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss des eNOS 894G/T Polymorphismus in einer großen kaukasischen Patientenpopulation auf den klinischen Verlauf nach koronarer Stentimplantation zu untersuchen.

Insbesondere sollten folgende Fragestellungen erhellt werden:

1. Gibt es einen Zusammenhang zwischen dem eNOS 894G/T Genotyp und dem Auftreten einer angiographisch und/oder klinisch definierten Restenose nach koronarer Stentimplantation ?
2. Welcher Einfluss hat der eNOS 894G/T Genotyp auf das Auftreten der klinischen Ereignisse (subakute Stentthrombose, Tod, Myokardinfarkt) im Frühverlauf (30 Tage) nach koronarer Stentimplantation ?
3. Besteht eine Assoziation zwischen dem eNOS 894G/T Genotyp und dem Auftreten von thrombotischen Ereignissen (Tod und MI) während eines längeren Beobachtungszeitraumes (12 Monate) nach koronarer Stentimplantation ?
4. Falls ein Einfluss dieses eNOS Polymorphismus nachweisbar ist, ist dieser Einfluss bei Männern und insbesondere bei jungen (< 60 Jahre) Männern, für die eine größere Bedeutung von genetischen Faktoren angenommen wird, stärker ausgeprägt ?

Hierzu wurde in einem Kollektiv von 1850 konsekutiven Patienten mit KHK und koronarer Stentimplantation der eNOS 894G/T Genotyp durch Restriktionsenzymanalyse oder die Verwendung von allelspezifischen, Fluoreszenzfarbstoff-markierten DNA-Sonden bestimmt, die anamnestischen, klinischen und angiographischen Daten erfasst und die Daten mittels statistischer Analysen untersucht.

Durch diese Studie soll auch versucht werden, einen Beitrag zur Klärung der Genese von Komplikationen nach koronarer Stentimplantation zu liefern, sowie zur Identifikation der genetischen Faktoren, die diese Prozesse beeinflussen können. Ein weiteres Ziel war u.U. Patienten mit einem erhöhten Risiko für diese Komplikationen bereits vor der Stentimplantation erkennen zu können.

2. Methoden

2.1 Patienten und antithrombotische Therapie

Der eNOS 894G/T Genotyp wurde bei 1850 konsekutiven Patienten mit symptomatischer koronarer Herzerkrankung bestimmt, bei denen eine koronare Stentimplantation im Deutschen Herzzentrum München oder in der 1. Medizinischen Klinik, Klinikum rechts der Isar der Technische Universität München durchgeführt wurde. Alle Patienten, die an der Studie teilgenommen haben, waren zuvor über die Studie aufgeklärt worden und hatten ein entsprechendes Aufklärungsblatt unterschrieben. Das Studienprotokoll war von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der TUM genehmigt worden.

Vor der Stentimplantation erhielten alle Patienten 500 mg Acetylsalicylsäure i.v. sowie einen Heparinbolus (5000 UE). Die perinterventionelle Therapie bestand aus der Gabe von Heparin i.a. als Bolus (10 000 UE) mit anschließender Infusion über 12 Stunden (1000 UE/Stunde). Ein Teil der Patienten erhielt zusätzlich den Fibrinogenrezeptorantagonisten Reopro als Bolus (0,25 mg/kg Körpergewicht) mit anschließender Infusion über 12 Stunden (10 µg/min) plus 2500 UE Heparin. Die postinterventionelle antithrombotische Therapie bestand aus der täglichen Gabe von 2 x 250 mg Tiklopidin (für 4 Wochen) und 2 x 100 mg Acetylsalicylsäure (unbegrenzt).

2.2 Definitionen

Die Patienten wurden als Diabetiker eingestuft, wenn sie insulinpflichtig waren oder orale Antidiabetika einnahmen. Entsprechend den WHO Kriterien wurde diese Diagnose auch für diätetisch eingestellte Diabetiker vergeben bei positivem Glukosetoleranztest und/oder wenn während des Klinikaufenthaltes bei zwei stressfreien Blutentnahmen (nüchtern) erhöhte

Blutzuckerwerte (>140 mg/dl) festgestellt worden waren (World Health Organisation Study Group, 1985). Die Personen, die während der letzten 6 Monate regelmäßig rauchten, galten als Raucher. Eine arterielle Hypertonie wurde bei systolischen Blutdruckwerten > 140 mm Hg und/oder diastolischen Blutdruckwerte > 90 mm Hg bei mindestens zwei Messungen diagnostiziert (Guidelines Subcommittee, 1999). Eine Hypercholesterinämie lag bei einer Serumcholesterinkonzentration (nüchtern) > 240 mg/dl vor. Die Diagnose eines durchgemachten Myokardinfarktes (MI) wurde durch die charakteristischen Veränderungen im 12-Kanal EKG festgestellt. Ein akuter MI wurde bei anhaltenden Thoraxschmerzen (< 30 min), verbunden mit einem Anstieg der Herzenzyme auf mindestens das Zweifache des oberen Normwertes und ST-Hebungen (> 2 mm) in zwei benachbarten EKG-Ableitungen diagnostiziert.

Eine dringliche Revaskularisierung des Zielgefäßes war eine PTCA (mit oder ohne Stentimplantation) oder Bypass-OP während der ersten 30 Tage nach Stentimplantation. Die Diagnose einer „subakuten Stentthrombose“ wurde angiographisch (Nachweis eines TIMI-Flusses Grad 0 oder Grad 1) während der ersten 30 Tage nach Intervention gestellt. Die quantitativen Analysen der Angiographiefilme erfolgte auf einem separaten Computersystem (CMS, Medis Medical Imaging Systems, Leiden, Niederlande). Die folgende Meßwerte wurden für jedes behandelte Gefäßsegment erhoben: minimaler Lumendurchmesser der Stenose vor Intervention, Stenoselänge, maximaler Durchmesser des Ballons, minimaler Lumendurchmesser innerhalb des Stents und Referenzdurchmesser nach Intervention. Die qualitative Beurteilung der Läsionen wurde nach dem modifizierten Klassifikationsystem des American College of Cardiology und der American Heart Association vorgenommen (Ryan et al., 1988). Die Gefäßläsionen vom Typ B2 und Typ C wurden als komplexe Läsionen bewertet. Als angiographische Restenose wurde eine Durchmesserstenose von größer oder gleich 50 % bei der Kontrollangiographie definiert.

2.3 Studienendpunkte

Primärer Endpunkt war das Auftreten einer Restenose entweder als angiographische Restenose zum Zeitpunkt der Kontrollangiographie 6 Monate nach der Intervention (≥ 50 % Durchmesserstenose) als auch einer klinischen Restenose (Revaskularisierung des behandelten Gefäßes innerhalb des ersten Jahres nach der Intervention aufgrund erneuter Angina pectoris Symptomatik).

Sekundärer Endpunkt der Studie war die Mortalität und die kombinierte Rate von Tod und Myokardinfarkt während des ersten Jahres nach Stentimplantation. Für den sekundären Endpunkt wurde die Untergruppe der Männer getrennt nach Alter separat analysiert.

2.4 DNA-Isolierung

Genomische DNA wurde aus Leukozyten von 200 µl peripherem Blut mit Hilfe kommerziell erwerblicher Kits (QIAamp DNA Blood Mini Kit oder High Pure PCR Template Preparation Kit) gewonnen. Der Vorgang schloss Lyse der Zellen, Bindung der DNA, Reinigung und Isolierung der reinen DNA ein. Die DNA Proben wurden bei -21^{0} C gelagert.

2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die beiden verwendeten Methoden zur Genotypisierung, Restriktionenzymanalyse und TaqMan Assay basieren auf der Polymerasekettenreaktion (PCR). Die PCR erlaubt einen bestimmten Abschnitt der DNA (Amplikon) zu vervielfältigen. Sie ist ein zyklisches Verfahren, wobei sich im Idealfall in jeder Runde die Anzahl der DNA–Kopien verdoppelt. Dadurch kommt es zu einem exponentiellen Anstieg von DNA-Kopien. Zunächst werden die

beiden Stränge der DNA durch Erhitzen auf 95°C getrennt. Dann wird die Temperatur in dem PCR-Gerät (Thermocycler) auf eine Temperatur heruntergefahren, bei der sich die vorher ausgewählten Primer spezifisch an die Enden des zu vervielfältigen DNA-Segments anlagern (Annealing). Die Taq- (DNA-) Polymerase katalysiert die Verlängerung der Primer, wobei die in einem geeigneten Puffer gelösten Nukleotide (dNTP) als Bausteine dienen.

2.6 Restriktionsenzymanalyse zur eNOS 894G/T Genotypisierung

Zunächst wurde der eNOS 894G/T Genotyp bei 100 gesunden Spendern (Klinik- und Labormitarbeiter) mit Hilfe der PCR und einer Restriktionsenzymanalyse bestimmt. Erst in einem zweiten Schritt wurde das TaqMan-Verfahren eingesetzt, für dessen Durchführung „Standard-“ DNA Proben der beiden homozygoten Genotypen (in diesem Fall 894GG und 894 TT) benötigt werden.

Es wurde ein 356 Basenpaare (bp) großer DNA-Abschnitt, der die polymorphe Sequenz in Exon 7 des eNOS Gens enthält, mit den ausgewählten Primern amplifiziert. Tabelle 2 enthält die Sequenzen der Primer.

Tabelle 2: *Primersequenzen für die Amplifikation der 356 bp großen, die polymorphe Base beinhaltenden, DNA-Sequenz des eNOS Gens*

	Primersequenzen
1 (NO 21)	5‘ CAT GAG GCT CAG CCC CAG AA 3‘
2 (NO 22)	5‘ CCA GCA GCA TGT TGG ACA CT 3‘

Für diese „einfache“ PCR wurden als Thermocycler „Primus 96 plus“ oder „GeneAmp PCR System 9600“ benutzt. Pro Probe wurden 20 µl Reaktionsansatz in 0,2 ml Reaktionsgefäße

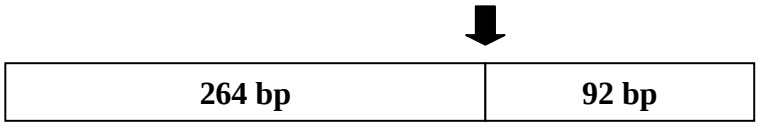
eingebracht. Tabelle 3 zeigt die Zusammensetzung dieses Reaktionsansatzes.

Tabelle 3: *PCR-Ansatz für die Genotypisierung des eNOS 894G/T Polymorphismus*

Bestandteile	Menge
H_2O (deionisiert)	14,4 µl
10xPCR-Puffer (Qiagen)	2,0 µl
10mM dNTP-Mix (Gibco)	0,4 µl
Primer NO21 (10 µM)	0,4 µl
Primer NO22 (10 µM)	0,4 µl
Taq-Pol (Qiagen)	0,4 µl
DNA-Probe	2 µl

Die DNA wurde für eine Minute bei 95 °C denaturiert. Die Anlagerung der Primer und die Verlängerung der Stränge erfolgte bei 60 °C für 1 Minute. Diese Schritte wurden in 35 Zyklen wiederholt. Im letzen Zyklus wurde der Syntheseschritt um 7 Minuten verlängert. Jedes Experiment enthielt eine Negativkontrolle um eine Kontamination mit fremder DNA auszuschließen. Dafür wurde anstatt der DNA-Probe Wasser zu dem beschriebenen Reaktionsansatz hinzugefügt. Nach Abschluss der PCR und Entnahme der Proben aus dem Thermocycler wurde der Restriktionenzymverdau mit der Restriktionsendonuklease Bsp143I durchgeführt. Dafür wurden 1,0 µl Bsp143I, 1 µl 10xRestriktionspuffer und 8 µl PCR-Ansatz zusammen gemischt und für 120 Minuten bei 37 °C inkubiert. Bsp143I verdaute das 894G spezifische Produkt in 2 Fragmente von 264bp und 92bp und das 894T spezifische PCR-Produkt in 3 Fragmente von 119 bp, 145 bp, 92 bp (Abbildung 7).

Das 894G-spezifische Produkt



Das 894T-spezifische Produkt

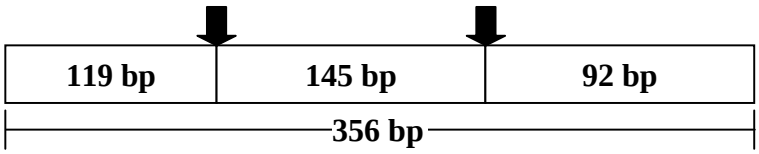
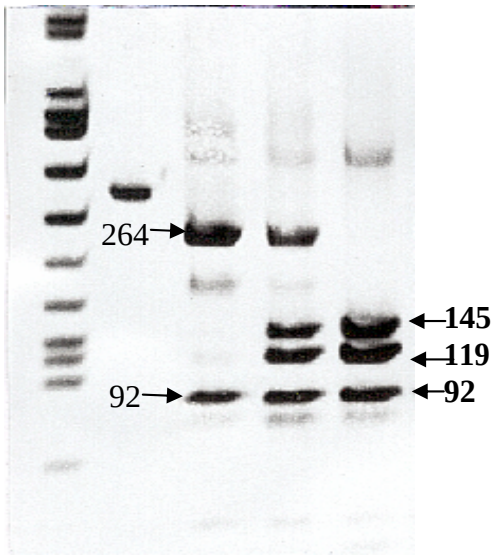


Abbildung 7: *Bestimmung des eNOS 894G/T Genotyps durch allelspezifischen Verdau mit Bsp 143I. Das Amplikon (356bp) wurde durch einen Restriktionsverdau mit Bsp 143I in die entsprechenden Fragmente gespaltet. Der Pfeil zeigt die Schnittstellen des Enzyms.*

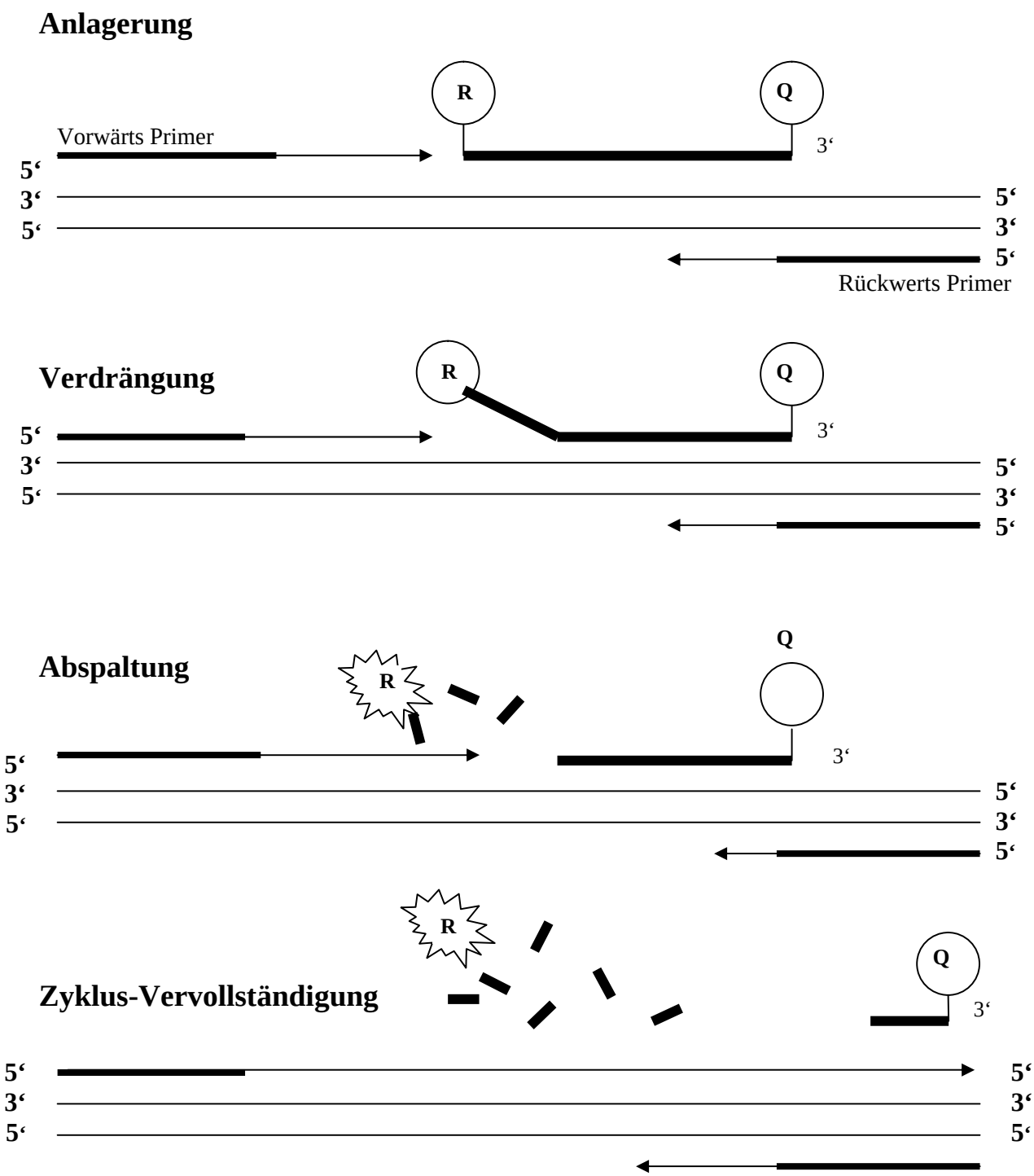
Die Identifizierung der Fragmente erfolgte durch Elektrophorese auf einem Polyacrylamidgel. Dafür wurden 10 µl des verdauten Amplifikates mit 2,5 µl 5fach konzentrierter Fikoll-Lösung gemischt und auf ein 8 % Polyacrylamidgel geladen. Um ein Maß für die Größe der entstandenen Fragmente zu erhalten, wurde 1 µl Molekulargewichtsmarker VIII mit 9 µl Aqua destillata und 2,5 µl 5fach konzentrierter Ficoll-Lösung neben den zu untersuchenden Proben aufgetragen. Der verwendete Laufpuffer bestand aus 45 ml 10xTBE-Puffer verdünnt mit 955 ml Wasser. Die Auftrennung erfolgte bei 100 V für 40 min. Nach abgeschlossener Elektrophorese wurden durch die Anfärbung mit Ethidiumbromid und 312 nm UV-Bestrahlung die entstandenen Banden sichtbar gemacht (Abbildung 8). Die Photodokumentation der Gele erfolgte mit einem digitalen System (GelPrint 2000, MWG-Biotech).



<u>Abbildung 8:</u> *Photodokumentation eines Elektrophoresegels zur Bestimmung des eNOS 894G/T Genotyps. Die Auftrennung der verschieden großen DNA-Moleküle erfolgte in einem Polyacrylamidgel. Ganz links die Banden des Molekulargewichtmarkers (M). Daneben das unverdaute Produkt der PCR als Kontrolle (K). Dann das spezifische Bandenmuster von 3 Patienten mit den Genotypen GG, GT und TT nach Restriktionsenzymverdau mit Bsp 143I. Das 894G spezifische Produkt wurde in 2 Fragmente von 264 und 92 bp und das 894T spezifische PCR-Produkt in 3 Fragmente von 119, 145 und 92 bp gespalten.*

2.7 Das TaqMan-Verfahren

Diese Methodik basiert auf dem 5‘ Nuklease Assay (Livak, 1999). Für die Reaktion sind ein Primerpaar und zwei für die beiden Allele spezifische DNA-Sonden erforderlich. Die Sonden sind Oligonucleotide, die zum DNA-Abschnitt um die polymorphe Stelle komplementär sind. Sie werden mit 2 verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (Reporterfarbstoff am 5‘ Ende und Quencherfarbstoff am 3‘ Ende) markiert. Die beiden allelspezifischen Sonden sind mit zwei verschiedenen Reporterfarbstoffen markiert. Die Nähe des Quencher-Farbstoffs zum Reporter-Farbstoff bei Intaktheit der Sonde verringert die Fluoreszenz des letzteren. 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 fluorogenen Sonde führt zu räumlichen Trennung der beiden Farbstoffe und damit zur einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität des Reporterfarbstoffes. Die Sondenfragmenten sind dann vom Zielabschnitt entfernt und die PCR wird fortgesetzt (Abbildung 9). Die Bestimmung des Genotyps erfolgt durch Auswertung der allelspezifischen Fluoreszenzsignale.



<u>Abbildung 9:</u> *Grundlegendes Prinzip des TaqMan-Verfahrens. Wärend der PCR werden die sich zuvor angelagerte 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.*

2.8 Bestimmung des eNOS 894G/T Genotyps mittels TaqMan-Verfahren

Die Primer und die markierten Sonden wurden mit Hilfe der Primer Express Software ausgewählt (PE Biosystems, Weiterstadt). Die G Allel Sonde war mit dem Reporterfarbstoff 6-Carboxyfluoreszin (FAM) und die T Allel Sonde mit dem Reporter VIC (PE Biosystems, Patent ausstehend) am 5´Ende markiert. Das 3' Ende der Sonden trug jeweils den Quencherfarbstoff TAMRA (6-Carboxytetramethylrhodamin). Die verwendeten Primer und Sonden sind in den Tabellen 4 und 5 aufgelistet. Der TaqMan Assay wurde mit dem in Tabelle 6 dargestellten Reaktionsmix durchgeführt. Von diesem Mix, der sowohl die Primer als auch die Sonden beinhaltete, wurden 20 µl in jedes Loch der 96 Loch-Platte gegeben. Anschließend wurden jeweils 2 µl gelöste DNA oder auch Wasser hinzugefügt. Die Anordnung der Proben auf der 96-Lochplatte war wie gefolgt: Kontrollen mit Wasser (8), Standard-DNA für G (8) und für T (8) Allel Homozygotie, gefolgt von 72 Patientenproben mit unbekanntem Genotyp.

Tabelle 4: *Nukleotidsequenzen der Primer für den eNOS 894G/T TaqMan Assay*

	Primersequenzen
Vorwärts Primer	5' GTG CTG CCC CTG CTG CT 3'
Rückwärts Primer	5' TCG GGG GGC AGA AGG A 3'

Tabelle 5: *Nukleotidsequenzen der Sonden für den eNOS 894G/T TaqMan Assay*

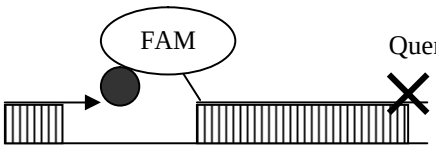
	Sequenzen der Sonden
Allel G (FAM)	5' CCC CAG ATG A***G***C CCC CAG AAC T 3' *
Allel T (VIC)	5' CCC CAG ATG A***T***C CCC CAG AAC TCT 3' *

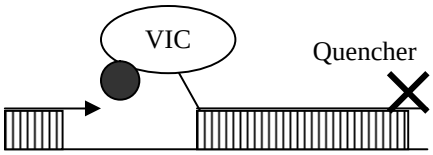
*Polymorphe Basen in fetter kursiver Schrift

Tabelle 6: *Bestandteile des Reaktionsmixes für den eNOS 894G/T TaqMan Assay*

Bestandteile	Menge
H_2O (deionisiert)	774 µl
Universal Master Mix	1100 µl
Vorwärts (Forward) Primer (20µM)	5,5 µl
Rückwärts (Reverse) Primer (20µM)	33 µl
FAM-markierte Sonde (10 µM)	44 µl
VIC-markierte Sonde (10 µM)	44 µl

Für die Reaktion wurden als Thermocycler „GeneAmp PCR System 9600“, „GeneAmp PCR System 9700“ oder der Thermocycler im „ABI Prism 7700 Sequence Detection System“ benutzt. Das PCR Protokoll bestand aus folgenden Schritten: 50°C für 2 Minuten, 95° für 10 Minuten und 40 Zyklen der Denaturierung bei 95 °C für 15 sec. und des „Annealings“ bei 60 °C für 1 Minute. Nach dem Lauf der PCR wurden die Proben im ABI Prism 7700 Sequence Detection System analysiert, wo die während der PCR akkumulierte Fluoreszenz gemessen und weiterverarbeitet wurde. Ein isolierter Signalanstieg von FAM oder VIC Fluoreszenz war charakteristisch für G bzw. T Allel Homozygotie. Ein Anstieg der beiden Signale wies auf Heterozygotie der untersuchten DNA hin (Abbildung 10). Die Genotypisierung wurde durchgeführt ohne die klinischen und die angiographischen Daten der Patienten zu kennen. Als Kontrolle wurde eine unabhängige Bestimmung des Genotyps bei 20 % der Patienten durchgeführt wobei getrennt isolierte DNA von originalen Blutproben verwendet wurde.





Allel **1(G)** Sonde

Allel **2(T)** Sonde

⇑ **FAM**=Homozygotie für Allel **1 (G)**

⇑ **VIC**=Homozygotie für Allel **2 (T)**

⇑ **FAM+VIC**=Heterozygotie für Allel **1+2 (G+T)**

Abbildung 10: *Genotypbestimmung mit fluorogenen Sonden mittels TaqMan-Verfahren. Fluoreszierende Signale (FAM oder VIC) wurden generiert, wenn eine komplementäre Zielsequenz für die entsprechende Sonde verfügbar war (nach Livak, 1999).*

2.9 Materialien und Geräte

Geräte

PCR-Thermocycler:

-Authorized thermal Cycler for PCR	Hybaid, Heidelberg
-Primus 96 plus	MWG-Biotech, Ebersberg
-GeneAmp PCR System 9600	Applied Biosystems, Weiterstadt
-GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems, Weiterstadt
-ABI Prism 7700 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Weiterstadt

Spannungsquelle:

-Power N Pac 300	Bio-Rad, München

Elektrophorese-Kammer:

Xcell II	Novex, Karlsruhe

Zentrifugen:

-Zentrifuge CR3-12	Jouan, St. Herblain, Frankreich
-Zentrifuge A 14	Jouan, St. Herblain, Frankreich
-Biofuge fresco	Herraeus Instruments, Hanau

Mixer:

-Vortexer	Genio2™ Bender&Obein AGV Zürich, Schweiz
-Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg

Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

DNA-Isolierung:

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

Enzyme:

-TaqMan Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Weiterstadt
-Taq-Pol	Qiagen GmbH, Hilden
-Restriktionsendonuklease Bsp143I	MBI Fermantas, St. Leon-Rot

Gel:

-8 % Polyacrylamidgel	Novex, Karlsruhe

PCR-Gefäße:

-PCR Tubes, 0,5 ml ultradünn	Eppendorf, Hamburg
-MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Weiterstadt
-MicroAmp® Optical Caps (8 Caps/Strip)	Applied Biosystems, Weiterstadt

Sonstiges:

-Molekulargewichtsmarker VIII	Roche Diagnostics, Mannheim

Primer und Sonden für das *Taq*Man-Verfahren wurden von Applied Biosystems bezogen.

Puffer und Lösungen

PCR-Puffer:

-10xPCR-Puffer Qiagen, GmbH, Hilden

Desoxyribonukleotidlösung (10mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP):

-GeneAmp^{R} Gibco BRL, Karlsruhe

Ethidiumbromidlösung (1 %)

1 g Ethidiumbromid Serva, Mannheim

ad 100 ml aqua dest.

Ladepuffer für Gelelektrophorese:

-10mM TBE-Puffer Gibco BRL, Karlsruhe

2.10 Statistik

Diskrete Variablen wurden entweder als Zahl oder als Prozentanteil (%) angegeben und mittels Chi-Quadrat oder exaktem Test nach Fischer verglichen. Kontinuierliche Variablen wurden als Mittelwerte ± Standardabweichung (± S.D.) angegeben und mit dem nicht gepaarten, zweiseitigen t-Test oder einer Varianzanalyse für mehr als 2 Gruppen verglichen. Für die Analyse des Risikos wurde jeweils der Odds Ratio und das 95 % Konfidenzintervall (95 % KI) berechnet. In den Hauptanalysen wurden jeweils die Ereignisse der homozygoten T Allel Träger mit den homo- oder heterozygoten G Allel Trägern verglichen. Dieses statistische Modell wurde aufgrund des in der Literatur beschrieben rezessiven Effektes des 894T Allels ausgewählt (Hingorani et al., 1999). Die Kaplan-Meier-Methode und der Log-Rank-Test wurden verwendet um die Todesrate und das Myokardinfarkt-freie Überleben während des ersten Jahres nach Stentimplantation zu vergleichen. Klinische, läsionsbezogene und prozedurale Variablen mit einem P Wert < 0,2 in der univariaten Analyse wurden bei einer multivariaten Analyse für das Restenoserisiko und bei einem Cox-Modell für den Verlauf während des ersten Jahres nach Stentimplantation berücksichtigt.

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm S-Plus, Version 4.0 Professional (Mathsoft, Inc., Seattle, WA) durchgeführt. Als signifikant wurden P Werte unter 0,05 angenommen.

3. Ergebnisse

3.1 Eigenschaften der Patienten

Die eNOS 894G/T Genotypverteilung war: 865 (46,8 %) GG, 792 (42,8 %) GT und 193 (10,4 %) TT. Die G Allel Frequenz war 0,68 und die Allele T Frequenz war 0,32. Die Genotypverteilung entsprach dem Hardy-Weinberg-Gesetz (χ^2 = 0,3440; P = 0,44). Die Daten sind graphisch in Abbildung 11 dargestellt.

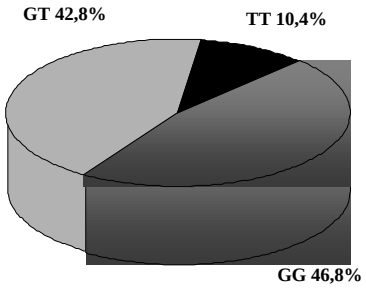


Abbildung 11: *Die Verteilung des eNOS 894G/T Genotyps in der untersuchten Patientenpopulation*

Die klinischen Eigenschaften der G Allel tragenden Patienten (Genotypen GG und GT) und der TT Patienten waren in vieler Hinsicht miteinander vergleichbar (Tabelle 7). Das Alter (63,0 ± 10,1 vs. 63,0 ± 9,6; P = 0,96) sowie der Anteil an Frauen (21,2 % vs. 20,7 %; P = 0,88), an aktiven Rauchern (30,7 % vs. 31,6 %; P = 0,80), an Diabetikern (21,2 % vs. 18,7 %; P = 0,40) waren bei den GG und GT gegenüber den TT Patienten nicht signifikant unterschiedlich. Die GG und GT Patienten hatten etwas häufiger eine arterielle Hypertonie im Vergleich zu den TT Patienten, jedoch ohne einen signifikanten Unterschied (68,7 % vs. 62,7 %; P = 0,09). Eine instabile Angina pectoris war bei 27,5 % G Allel tragenden Patienten, sowie bei 28,5 % der TT Patienten aufgetreten (P = 0,83). Der Anteil von Patienten mit akutem Myokardinfarkt (20,2 % vs. 21,2 %; P = 0,72), mit durchgemachtem MI (26,6 % vs.

28,5 %; P = 0,58), sowie mit zurückliegender Bypass-OP (11,2 % vs. 9,8 %; P = 056) wiesen ebenso keinen Unterschied zwischen G Allel Trägern und homozygoten T Allel Trägern auf. Die linksventrikuläre Funktion war bei 29,3 % der GG/GT und 30,1 % der TT-Patienten eingeschränkt (P = 0,84).

Tabelle 7: *Klinische Eigenschaften der Patienten*

	TT (n=193)	GG/GT (n=1657)	P
Alter, Jahren	63,0±9,6	63,0±10,1	0,96
Frauen	40 (20,7)	351 (21,2)	0,88
Arterielle Hypertonie	121 (62,7)	1138 (68,7)	0,09
Diabetis mellitus	36 (18,7)	352 (21,2)	0,40
Aktive Raucher	61 (31,6)	509 (30,7)	0,80
Hypercholesterinämie	85 (44,0)	707 (42,7)	0,72
Instabile Angina pectoris	55 (28,5)	460 (27,8)	0,83
Akuter Myokardinfarkt (MI)	41 (21,2)	334 (20,2)	0,72
Z.n. MI	55 (28,5)	441 (26,6)	0,58
Z.n. Bypass-Operation	19 (9,8)	186 (11,2)	0,56
Zahl der beteiligten Gefäße			0,65
1	52 (26,9)	470 (28,4)	
2	59 (30,6)	540 (32,6)	
3	82 (42,5)	647 (39,0)	
Eingeschränkte linksventrikuläre Funktion	58 (30,1)	486 (29,3)	0,84

Alter ist als Mittelwert ± S.D. angegeben. Die anderen Variablen sind als Zahl der Patienten und in Klammern mit Anteilen in Prozent angegeben.

3.2 Eigenschaften der Läsionen und der Interventionen

Die Eigenschaften der Läsionen waren im wesentlichen ausgeglichen zwischen den G Allel Trägern und den TT Patienten verteilt. Die Verteilung der implantierten Stents auf die verschiedenen Koronararterien zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen GG/GT und TT Patienten (P = 0,52). Die Stentimplantation erfolgte aufgrund einer Restenose bei schon vorher mit einem Stent versorgten Gefäß bei 24,1 % der 894GG/GT und bei 25,9 % der TT Patienten (P = 0,58). Chronische Verschlüsse wurden in beiden Gruppen gleich häufig behandelt (P = 0,60). Die TT Patienten wiesen häufiger eine komplexe Läsion im Vergleich zu den GG/GT Patienten auf, jedoch ohne dass der Unterschied statistisch signifikant war (78,8 % vs. 74,2 %; P = 0,17).

Tabelle 8: *Läsionsbezogene Charakteristika*

	TT (n=193)	GG/GT (n=1657)	P
Lage der implantierten Stents			0,52
- Hauptstamm	4 (2,1)	23 (1,4)	
- LAD	69 (35,8)	665 (40,1)	
- LCx	46 (23,8)	323 (19,5)	
- RCA	60 (31,1)	536 (32,4)	
- Venous bypass graft	14 (7,3)	110 (6,6)	
Chronische Okklusionen	14 (7,3)	104 (6,3)	0,60
Komplexe Läsionen	152 (78,8)	1229 (74,2)	0,17
Restenotische Läsionen	50 (25,9)	399 (24,1)	0,58

Angaben sind Mittelwerte ± S.D., bzw. absolute Anzahl der Patienten mit Prozentangaben in Klammern. LAD steht für R. interventrikularis anterior, LCx für R. circumflexus und RCA für A. coronaria dextra.

Tabelle 9: *Eigenschaften der Interventionen*

	TT (n = 193)	GG/GT (n = 1657)	P
Vor Stentimplantation			
Läsionslänge (mm)	11,5 ±6,5	12,2 ± 6,8	0,17
Referenzdurchmesser (mm)	3,01 ± 0,62	3,04 ± 0,52	0,36
Minimaler Lumendurchmesser (mm)	0,64 ± 0,53	0,64 ± 0,49	0,96
Durchmesser der Stenose (%)	79,2 ± 15,3	78,9 ± 15,3	0,82
Während Stentimplantation			
Ballondurchmesser (mm)	3,25 ± 0,58	3,23 ± 0,53	0,79
Maximaler Ballondruck (atü)	14,0 ± 3,3	13,8 ± 3,3	0,42
Länge des gestenteten Gefäßsegments (mm)	20,0 ± 12,9	20,2 ± 14,1	0,90
Periprozedurale Therapie mit Abciximab	44 (22,8)	320 (19,3)	0,25
Unmittelbar nach der Stentimplantation			
Minimaler Lumendurchmesser (mm)	2,92 ± 0,53	2,93 ± 0,52	0,78
Durchmesser der Stenose (%)	4,5 ± 7,3	5,4 ± 8,5	0,19

Angaben sind Mittelwerte ± S.D., bzw. absolute Anzahl der Patienten mit Prozentangaben in Klammern.

Auch bei den Interventionscharakteristika gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypgruppen. Es gab lediglich einen Trend (mit P Wert < 0,2) für eine größere Läsionslänge (12,2 ± 6,8 mm vs. 11,5 ± 6,5 mm; P = 0,17) und eine höhergradigere Reststenose (Durchmesser der Stenose unmittelbar nach Stentimplantation) bei den G Allel Trägern gegenüber den T Allel Homozygoten (5,4 ± 8,5 % vs. 4,5 ± 7,3 %; P = 0,19).

3.3 Restenose

Bei 1556 Patienten (84 % der ursprünglich eingeschlossenen Population, n = 1850) konnte eine Kontrollangiographie 6 Monate nach der Intervention in unseren Kliniken durchgeführt werden. Um zu überprüfen, ob die Patientengruppen mit vollständigen angiographischen Daten mit der Ausgangspopulation hinsichtlich der Genotypverteilung übereinstimmen, wurde ein Chi-Quadrat Test durchgeführt. Der Anteil von Patienten mit vollständigen angiographischen Daten unterschied sich nicht signifikant zwischen den beiden Genotypgruppen (bei 84,2 % der GG/GT und bei 82,9 % der TT Patienten; P = 0,62). Die quantitativen Ergebnisse der Kontrollkoronarangiographie wie minimaler Lumendurchmesser und Durchmesser der Stenose nach 6 Monaten sowie Lumenverlust und Verlustindex, waren vergleichbar zwischen den G Allel Trägern und den TT Patienten. Die entsprechenden Daten sind der Tabelle 10 zu entnehmen.

Tabelle 10: *Quantitative Parameter der Restenose*

	TT (n=160)	GG/GT (n=1396)	P
Minimaler Lumendurchmesser (mm)	1,70±0,96	1,74±0,93	0,60
Durchmesser der Stenose (%)	44,2±28,7	43,5 ±27,4	0,78
Lumenverlust (mm)	1,22 ±0,86	1,20±0,84	0,76
Verlustindex (%)	0,59±0,49	0,56±0,41	0,39
Angiographische Restenose (%)	56 (35,0)	457 (32,7)	0.56
Klinische Restenose (RePTCA + ACVB) (%)	38 (23,8)	286 (20,5)	0,34

Parameter sind als Mittelwerte ± S.D. bzw. als Anzahl der Patienten mit Prozentangaben in Klammern angegeben

0

Die angiographische Restenoserate 6 Monate nach der Stentimplantation betrug 32,6 % bei den GG/GT und 35,0 % bei den TT Patienten (P = 0,56). Ebenso war die Rate der klinischen Restenose nicht signifikant höher bei den TT Patienten (23,8 % vs. 20,5 %; P = 0,34) (Abbildung 12). Die Eigenschaften der Patienten, der Läsionen und der Interventionen bei denen der Vergleich der beiden Genotypgruppen ein Signifikanzniveau von P < 0,2 erreichte (arterielle Hypertonie, Anteil komplexer Läsionen, Läsionslänge und Reststenose), wurden in eine logistische Regressionsanalyse für die Restenose eingeschlossen. Unter Berücksichtigung des Einflusses dieser Faktoren war der eNOS 894TT Genotyp mit einem Odds Ratio von 1,12 (95 % KI, 0,79 - 1,59) bezüglich der Entstehung einer angiographischen Restenose assoziiert. Anhand des gleichen multivariaten Models war der eNOS 894TT Genotyp mit einem OR von 1,21 (95 % KI, 0,82 - 1,78) für die Entstehung einer klinischen Restenose (Revaskularisierung des behandelten Gefäßes innerhalb des ersten Jahres nach der Intervention wegen symptomatischer Myokardischämie) verbunden.

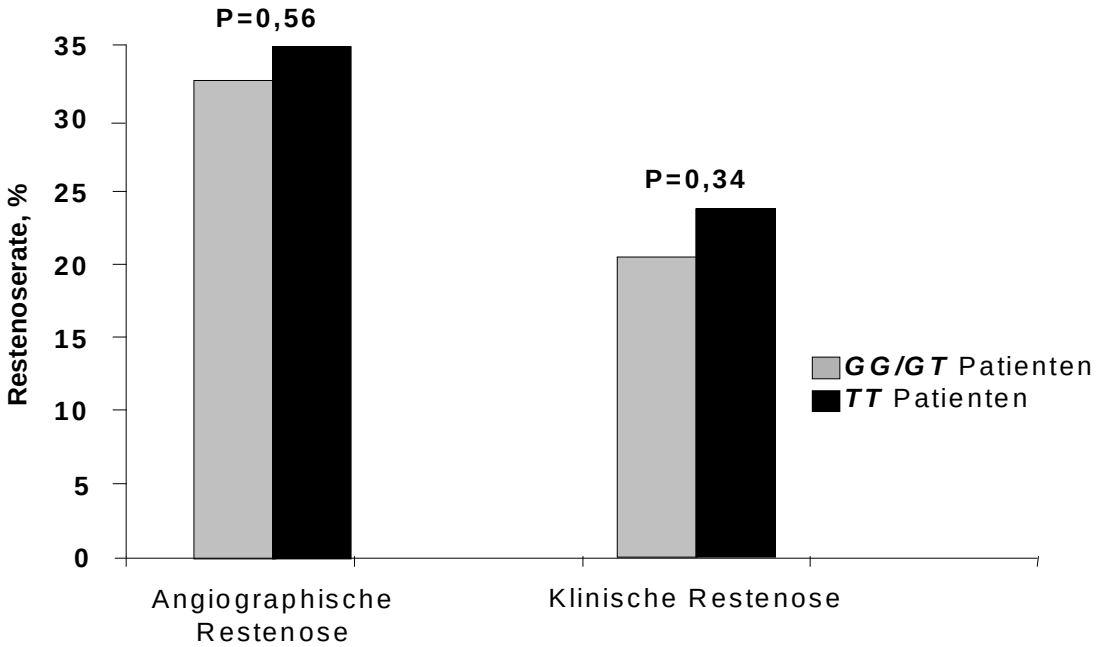


Abbildung 12: *Angiographische und klinische Restenoserate bei den 894GG/GT und den 894TT Patienten*

3.4 Akute und subakute thrombotische Ereignisse nach Stentimplantation

Die Inzidenz thrombotischer Ereignisse während der ersten 30 Tage nach Stentimplantation war in beiden Patientengruppen ähnlich (Tabelle 11). Subakute Stentthrombosen traten bei 27 (1,6 %) der GG/GT Patienten und bei 5 (2,6 %) der TT Patienten auf, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festzustellen war (P = 0,33). Die Mortalität innerhalb der ersten 30 Tage war vergleichbar in den beiden Gruppen (0,9 % bei den GG/GT Patienten vs. 1,0 % bei den TT Patienten; P = 0,86). Die kombinierte Rate von Tod oder MI unterschied sich nicht signifikant (P = 0,41) zwischen den GG/GT-Patienten (1,8 %) und den TT-Patienten (2,6 %). Die Rate dringlicher Revaskularisierungen war etwas höher bei den TT Patienten im Vergleich zu den GG/GT-Patienten (4,2 % vs. 2,5 %), jedoch ohne Erreichen einer Signifikanz (P = 0,17).

Tabelle 11: *Klinische Ereignisse innerhalb der ersten 30 Tagen nach Stentimplantation*

	TT (n=193)	GG/GT (n=1657)	P
Subakute Stentthrombose (%)	5 (2,6)	27 (1,6)	0,33
Tod (%)	2 (1,0)	15 (0,9)	0,86
Tod oder MI (%)	5 (2,6)	29 (1,8)	0,41
Dringliche Revaskularisierung (%)	8 (4,2)	41 (2,5)	0,17

Daten sind als Zahl der Patienten und in Klammern als Anteile in Prozent angegeben

3.5 Langfristiger klinischer Verlauf (1 Jahr) nach Stentimplantation

Patienten mit dem eNOS 894TT Genotyp hatten eine erhöhte Mortalität (4,4 %) im Vergleich zu den GG/GT Patienten (2,2 %) innerhalb eines Jahres nach Stentimplantation (P = 0,04). Die kombinierte Inzidenz von Tod oder MI war ebenfalls signifikant höher bei den TT Patienten (7,8 %) im Gegensatz zu den 894GG/GT Patienten (3,7 %; P = 0,007). Die entsprechenden Daten enthält Tabelle 12.

Tabelle 12: *Klinische Ereignisse innerhalb eines Jahres nach koronarer Stentimplantation*

	TT (n = 193)	GG/GT (n = 1657)	P
Tod	9 (4,7)	37 (2,2)	0,04
Myokardinfarkt	7 (3,6)	27 (1,6)	0,05
Tod oder Myokardinfarkt	15 (7,8)	61 (3,7)	0,007

Daten sind als Zahl der Patienten und in Klammern als Anteile in Prozent angegeben

Um die Unabhängigkeit der Beziehung zwischen dem eNOS 894TT Genotyp und dem kombiniertem Endpunkt von Tod und/oder MI während des ersten Jahres zu prüfen wurde ein Cox-Modell erstellt, in das Faktoren mit einem Signifikanzniveau von < 0,2 mit einbezogen wurden. Der entsprechende angepasste Odds Ratio war 2,14 (95 % KI, 1,23 – 3,72). Die Tabellen 13 und 14 enthalten Ergebnisse der Cox-Analysen für die Endpunkte Tod sowie Tod und/oder MI während des ersten Jahres nach Stentimplantation.

Tabelle 13: *Ergebnisse der Cox-Analyse für Tod*

Faktor	Effekt (Hazard Ratio)	95 % Konfidenzintervall	P
eNOS 894TT Genotyp	2,07	1,00 – 4,29	0,05
Alter [56,87 – 72,39]	1,93	1,16 – 3,24	0,01
Z.n. Bypass-OP	0,79	0,31 – 2,03	NS
Komplexe Läsionen	1,57	0,73 – 3,37	NS

Tabelle 14: *Ergebnisse der Cox-Analyse für Tod und/oder MI*

Faktor	Effekt (Hazard Ratio)	95 % Konfidenzintervall	P
eNOS 894TT Genotyp	2,10	1,19 – 3,70	0,01
Alter [56,87 – 72,39]	1,46	1,00 – 2,14	0,05
Z.n. Bypass-OP	0,92	0,45 – 1,26	NS
Komplexe Läsionen	1,78	0,96 – 3,30	NS

Ein Zustand nach Bypass-OP (OR = 0,79 [95 % KI, 0,31 - 2,03]) und das Vorliegen einer komplexen Läsion (OR = 1,57 [95 % KI, 0,73 - 3,37]) hatten keinen signifikanten Einfluss auf den kombinierten Endpunkt von Tod und/oder MI.

Die Kaplan-Meier Kurven für Tod und für den kombinierten Endpunkt bestehend aus Tod und/oder MI zeigen, dass sich der Einfluss des eNOS Genotyps erst ca. 3-4 Monate nach Stentimplantation bemerkbar macht (Abbildungen 13 und 14).

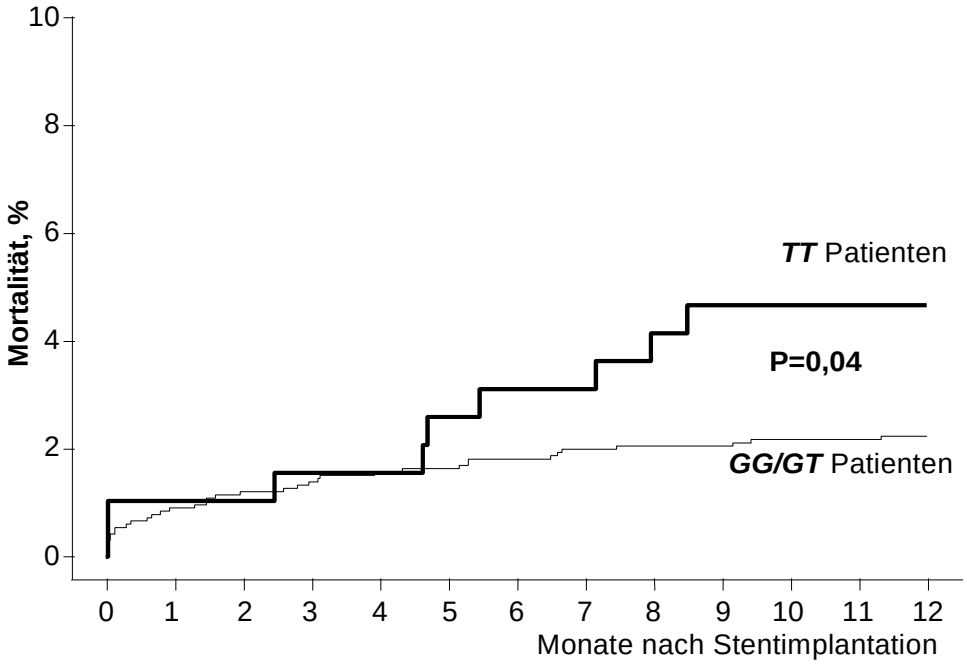


Abbildung 13: *Kaplan-Meier Kurven für Tod innerhalb eines Jahres nach Intervention bei den G Allel Trägern und den TT Patienten*

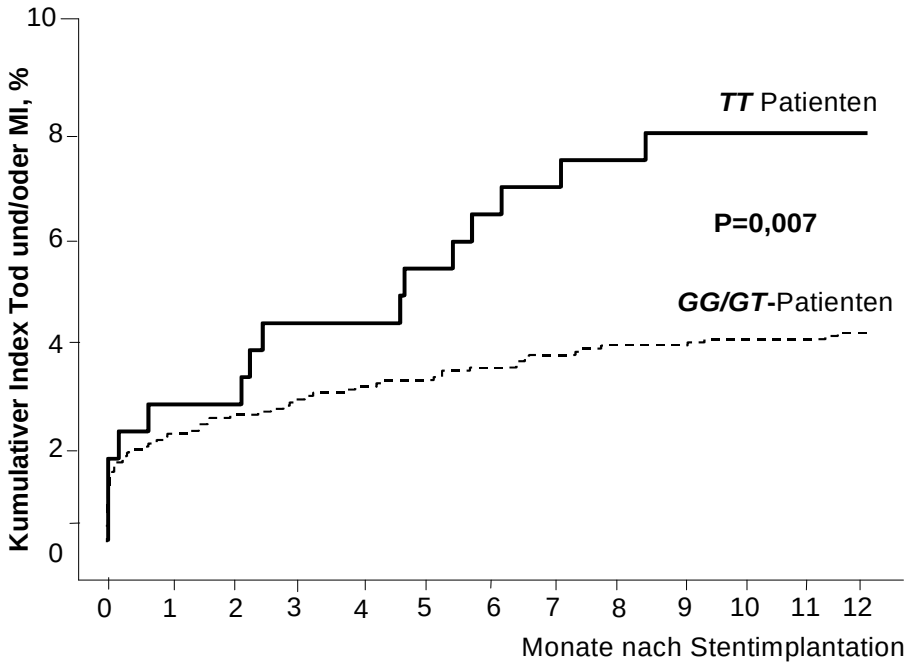


Abbildung 14: *Die Kaplan-Meier-Kurven für den kombinierten Endpunkt bestehend aus Tod und/oder Myokardinfarkt innerhalb eines Jahres nach Stentimplantation bei GG/GT und TT Patienten*

Die Untergruppenanalysen für junge (Alter < 60 Jahre, n = 620) und alte (Alter > 60 Jahre, n = 839) Männer unserer Studienpopulation zeigten, dass der negative Einfluss des eNOS 894TT Genotyps auf die Mortalität altersabhängig ist (Tabellen 15 und 16).

Tabelle 15: *Klinische Ereignisse bei jungen Männern (Alter < 60 Jahre, n = 620) innerhalb eines Jahres nach koronarer Stentimplantation*

	TT (n = 70)	GG/GT (n = 550)	P
Tod	4 (5,7)	5 (0.9)	0,006
Tod oder Myokardinfarkt	6 (8,5)	14 (2,5)	0,04

Tabelle 16: *Klinische Ereignisse bei alten Männern (Alter > 60 Jahre, n = 839) innerhalb eines Jahres nach koronarer Stentimplantation*

	TT (n = 83)	GG/GT (n = 756)	P
Tod	5 (6)	23 (3,0)	0,2
Tod oder Myokardinfarkt	6 (7,2)	33 (4,4)	0,3

Bei jungen Männern war der eNOS 894TT Genotyp mit einem stark erhöhten Risiko für Tod innerhalb der ersten 12 Monate assoziiert (OR = 6,4 [95% KI, 2,0 – 20,1]), indessen gab es bei alten Männern lediglich einen Trend hin zu einer erhöhten Mortalität mit dem TT Genotyp (OR = 2,0 [95% KI, 0,77 – 5,1]). Die Altersabhängigkeit der Wirkung des 894TT eNOS Genotyp war auch für den kombinierten Endpunkt bestehend aus Tod und/oder MI nachweisbar. Die entsprechenden Odds Ratios waren 2,3 (95% KI, 1,4 - 8,5) für junge und 1,9

(95% KI, 0,8 - 5,1) für alte Männer. Abbildung 15 veranschaulicht graphisch den Einfluss des eNOS 894TT Genotyps auf die 1-Jahres Mortalität bei Männern unter und über 60 Jahren.

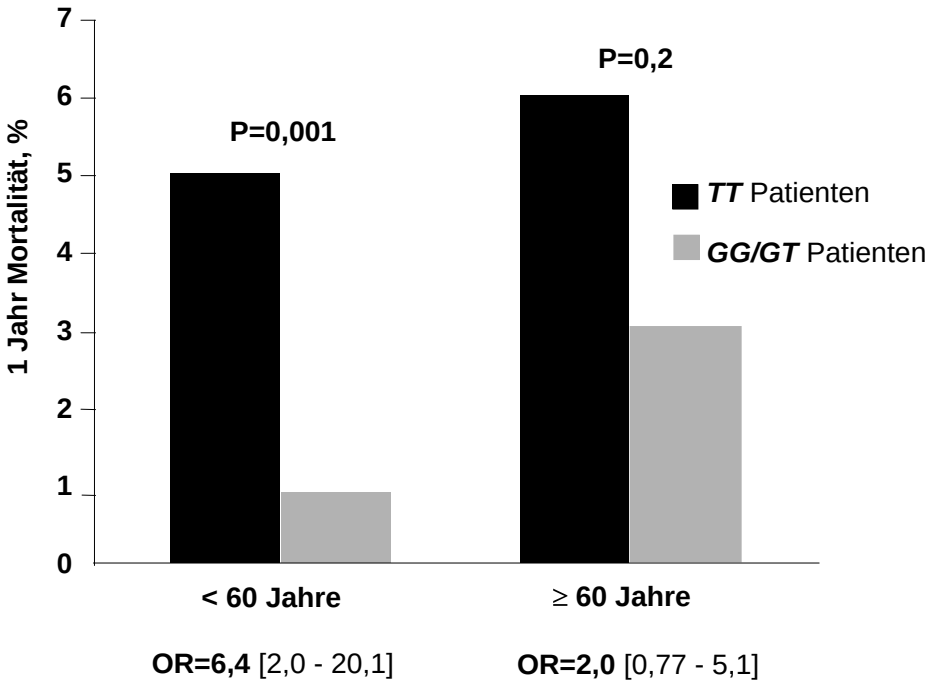


Abbildung 15: *Altersabhängigkeit des Einflusses des eNOS 894TT Genotyps auf die 1-Jahres Mortalität nach koronarer Stentimplantation bei Männern*

4. Diskussion

Dies ist die erste Studie, in der systematisch der Einfluss des eNOS 894G/T Polymorphismus auf den klinischen und angiographischen Verlauf nach koronarer Stentimplantation untersucht worden ist. Der wichtigste Befund dieser Studie ist, dass der eNOS 894TT Genotyp gegenüber 894G Allel Trägern mit einer erhöhten Mortalität (3,6 % vs. 1,6 %; P = 0,05) innerhalb von einem Jahr nach koronarer Stentimplantation assoziiert ist. Dabei war das Genotyp-assoziierte Risiko zu sterben besonders ausgeprägt bei der Gruppe der „jungen“ (Alter < 60 Jahre) Männer (OR 6,4 [2,0 - 20,1]). Die klinische und angiographische Restenoserate war etwas höher bei Patienten mit dem eNOS 894TT Genotyp gegenüber den GG und GT Patienten, ohne dass das Signifikanzniveau erreicht wurde. Auch bei den thrombotischen Frühkomplikationen (innerhalb der ersten 30 Tage) nach Stentimplantation gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den eNOS 894TT Patienten und den übrigen Patienten.

Eine direkter Zusammenhang zwischen dem eNOS 894G/T Polymorphismus und Komplikationen nach der Stentimplantation ist möglich aber schwer zu beweisen. Obwohl es gezeigt werden konnte, dass dieser Polymorphismus einen Einfluss auf den Abbau der eNOS durch Proteolyse nimmt (Tesauro et al., 2000), ist es nicht bekannt, wieweit dies die eNOS-Funktion in vivo beeinflusst. Darüber hinaus ist die Genese der Komplikationen nach koronarer Stentimplantation sehr komplex und nicht alle daran beteiligten Faktoren sind bisher identifiziert.

4.1 Thrombotische Frühkomplikationen

Bei der Entstehung von thrombotischen Ereignissen im Frühverlauf nach koronarer Stentimplantation wird den Thrombozyten eine wichtige Rolle zugeschrieben. In diesem Zusammenhang wurde deren Aktivierungsgrad sowie die Interaktion der Thrombozyten mit Zellen der Gefäßwand und denen des Blutes gründlich untersucht (Gawaz et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation der thrombozytären eNOS durch eine vermehrte NO-Freisetzung die Thrombozyten hemmt (Freedman et al., 1997). In diesem Zusammenhang ist interessant, dass Thrombozyten von gesunden homozygoten eNOS 894T Allel Trägern weniger NO freisetzen als eNOS 894 G Allel Träger (Tanus-Santos et al., 2002). Deswegen könnte durch das G Allel die Thrombozytenadhäsion und –aggregation gehemmt und möglicherweise die Thrombusentstehung verhindert werden, während das T Allel zu einer erhöhten Thromboseneigung führen würde. In dieser Hinsicht könnte der eNOS 894G/T Polymorphismus die Entwicklung thrombotischer Komplikationen nach koronarer Stentimplantation beeinflussen.

Trotz dieser Überlegungen konnten wir keinen signifikanten Einfluss des eNOS 894G/T Genotyps auf die Inzidenz thrombotischer Frühkomplikationen (subakute Stentthrombose, Myokardinfarkt, Tod, dringliche Revaskularisierung) finden. Ein möglicher Grund für unser negatives Ergebnis bezüglich thrombotischer Frühkomplikationen ist, dass die Rate an Frühkomplikationen bei dem untersuchten Patientenkollektiv relativ niedrig war (die Stentthromboserate in der Gesamtpopulation betrug z.B. nur 1,7 %). Dies lässt sich durch den systematischen Einsatz antithrombozytärer Medikamente bei unseren Patienten erklären. Wie in zahlreichen klinischen Studien bewiesen wurde (Schömig et al., 1996; Lefkovits & Topol, 1997; The EPISTENT Investigators, 1998), kann das Auftreten früher thrombotischer Ereignisse durch eine kombinierte antithrombozytäre Therapie (Acetylsalicylsäure und Tiklopidin ggf. ergänzt durch einen GP IIb/IIIa-Antagonisten wie Reopro), die die

Thrombozytenfunktion nach Stentimplantation stark beeinflusst (Gawaz et al., 1998), erheblich gesenkt werden. Es könnte sein, dass die konsequente antithrombozytäre Therapie und die dementsprechend niedrige Rate an thrombotischen Frühkomplikationen den möglicherweise nicht so stark ausgeprägten Einfluss des eNOS 894G/T Genotyps nicht erkennen lässt. Ein weiterer möglicher Grund für den fehlenden Einfluss des eNOS Polymorphismus während der ersten 30 Tage könnte sein, dass während dieser Zeit kein intaktes Endothel vorhanden ist (die Reendothelisierung ist erst etwa 3 Monate nach Stentimplantation abgeschlossen (Farb et al., 1999; Grewe et al., 2000). Die Hauptquelle für das durch die eNOS katalysierte NO stellt das Endothel dar (Wang et al., 1997).

4.2 Restenose

Für die Ausbildung einer Restenose nach koronarer Stentimplantation konnten klinische und prozedurale Prädiktoren (u.a. die Implantation mehrerer Stents, die Länge des mit Stents behandelten Gefäßabschnittes und Diabetes mellitus) identifiziert werden (Kastrati et al., 1997). Außerdem konnten genetische Faktoren als Risikofaktoren für Restenose beschrieben werden (Kastrati et al., 1999; Kastrati et al., 2000). Das Substrat für die Restenosierung ist eine neu gebildete Intima (Neointima), deren zelluläres Substrat überwiegend glatte Gefäßmuskelzellen sind (Grewe et al., 1997; Farb et al., 1999; Kearney et al., 1997). Die Neointimabildung dauert nach pathologisch-anatomischen und klinischen Daten durchschnittlich 3-6 Monate (Kastrati et al., 1993; Grewe et al., 2001). In vitro konnte gezeigt werden, dass NO die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen hemmen kann (Murad, 1997). Der postulierte Einfluss des eNOS 894G/T Polymorphismus auf die NO-Bildung könnte vermuten lassen, dass der Polymorphismus das Risiko für Restenose modifiziert. Trotz dieser Überlegungen konnte in dieser Arbeit keine signifikante Assoziation zwischen dem eNOS 894G/T Polymorphismus und dem primären Endpunkt Restenose gefunden werden. Die

angiographische und klinische Restenoserate war jedoch bei TT Patienten etwas höher als bei GG und GT Patienten. Deswegen kann nur spekuliert werden, dass eine potentielle Assoziation zwischen dem eNOS 894G/T Polymorphismus und Restenose bestehen kann. In einer japanischen Arbeit konnte im Gegensatz zu unseren Befunden gezeigt werden, dass das Tragen des 894T Allels des eNOS Gens ein unabhängiger Prädiktor für Restenose ist (Suzuki et al., 2002). In dieser Arbeit war jedoch die Patientenpopulation sehr klein (insgesamt wurden nur 85 Patienten eingeschlossen). Außerdem wurde die Genotypbestimmung erst nach der Kontrollangiographie durchgeführt. Daher ist es denkbar, dass durch das Design der Studie und die kleine Zahl der eingeschlossenen Patienten eine Assoziation gefunden wurde, die in der Realität nicht besteht. Darüber hinaus unterscheiden sich Genotypverteilungen häufig zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen. Dies trifft auch für den eNOS 894G/T Polymorphismus zu (Cai et al., 1999; Hingorani et al., 1999). In Japan liegt die 894T Allel Frequenz im Bereich zwischen 0,02 und 0,09, während bei Europäern T Allel Frequenzen zwischen 0,30 und 0,40 beschrieben werden. Denkbar ist deswegen auch, dass in Japan eine Assoziation zwischen dem eNOS 894T Allel und Restenose besteht und dies bei Europäern nicht der Fall ist.

4.3 Thrombotische Spätkomplikationen

Thrombotische Ereignisse treten meist während der ersten Tage nach Stentimplantation auf. Das Risiko dafür bleibt jedoch während der ersten 30 Tage deutlich erhöht (Schühlen et al., 1998). Aber auch später (nach Absetzen der Tiklopidin- bzw. Clopidogreltherapie) kann es noch zu thrombotischen Vorgängen im Bereich des mit dem Stent behandelten Gefäßabschnittes kommen. In unserer Studie wurden das Auftreten von Tod und/oder Myokardinfarkt als thrombotische Spätkomplikation gewertet und als sekundärer Endpunkt analysiert. Natürlich ist es möglich, dass diese Ereignisse auch auf thrombotische Vorgänge in

anderen Koronararterien und außerhalb der behandelten Läsion beruhen. Wir beschreiben eine Assoziation zwischen eNOS 894TT Genotyp und dem Auftreten von Tod und/oder Myokardinfarkt während des ersten Jahres nach Stentimplantation.

Pathologisch-anatomische Befunde nach Stentimplantation konnten zeigen, dass eine Thrombusbildung im Stentbereich auch 10 Monate nach der Intervention möglich ist (Schwartz, 1998). Es wurde hier spekuliert, dass das neue Endothel, das sich im Stentbereich gebildet hat, nicht fähig sein könnte, seine normalen Funktionen zu erfüllen. Dazu gehören natürlich auch die antiadhäsiven Eigenschaften des Endothels, die u.a. durch Prostrazyklin, ADPasen und NO vermittelt werden (Radomski et al., 1987). Deswegen könnte eine Störung der eNOS Funktion den Schutz des neu gebildeten Endothels gegen die Thrombusentstehung abschwächen. Die Genotyp-bedingte Abschwächung der NO-Freisetzung könnte als ein begünstigender Kofaktor für Thrombusentstehung an der behandelten Läsion und damit für Myokardinfarkt im späteren klinischen Verlauf nach der Stenimplantation sein. Es wurde oben bereits erwähnt, dass die komplette Endothelisierung im Bereich der Interventionsstelle erst 3 Monate nach Stentimplantation abgeschlossen ist (Farb et al., 1999; Grewe et al., 2001). In diesem Zusammenhang ist es sehr interessant, dass sich die Trennung der kumulativen Rate von Tod und/oder MI in der Kaplan-Meier Analyse zwischen den 894TT Patienten und den G Allel Trägern erst 3 Monate nach der Intervention vollzieht. Es könnte ein Zusammenhang mit der erst zu diesem Zeitpunkt abgeschlossenen Neoendothelialisierung bestehen. Leider stehen noch nicht genügend experimentellen Daten zur Verfügung, um diese Hypothese zu beweisen.

Insbesondere bei jungen Männern (Alter < 60 Jahre) war die Assoziation zwischen dem eNOS 894TT Genotyp und einem schlechten klinischen Verlauf nach koronarer Stentimplantation ausgeprägt. Mit zunehmendem Alter nimmt der Einfluss der genetischen

Faktoren ab und der Einfluss der umweltbedingten meist beeinflussbaren Faktoren zu (Ardissino et al., 1999). Dies könnte die Altersabhängigkeit der von uns beschriebenen Assoziation erklären.

4.4 Andere Befunde zur Bedeutung des eNOS 894G/T Polymorphismus

Der eNOS 894G/T Polymorphismus wurde u.a. im Zusammenhang mit koronarer Herzerkrankung, Myokardinfarkt, und Koronarspasmen untersucht. Es wurden viele interessante Ergebnisse erzielt. Hibi und Kollegen führten eine Fall-Kontrolle Studie durch, in die 226 Patienten mit akutem Myokardinfarkt und 357 gesunde Kontrollpersonen eingeschlossen wurden und der Genotyp bestimmt wurde (Hibi et al., 1998). In der Patientengruppe konnte der eNOS 894TT Genotyp bei 5 Patienten gefunden werden, während dieser Genotyp in der Kontrollgruppe nicht vorkam ($P < 0,009$). Die TT Patienten unterschieden sich jedoch nicht von den anderen MI Patienten in Bezug auf die Zahl der erkrankten Koronargefäße oder Koronarstenosen. Die Autoren postulierten, dass der eNOS 894G/T Polymorphismus ein genetischer Prädiktor für akuten MI jedoch nicht für das Ausmaß des arteriosklerotischen Befalls der Koronararterien ist (Hibi et al., 1998). Eine andere Arbeitsgruppe aus Japan (Shimasaki et al., 1998) fand auch einen Zusammenhang zwischen dem T Allel und Myokardinfarktrisiko. Diese Autoren beschrieben ein um etwa 30 % erhöhtes Myokardinfarktrisiko für die 894T Allel Träger. In einer weiteren japanischen Arbeit wurde eine Assoziation zwischen dem T Allel und dem Auftreten von Koronarspasmen beschrieben. In der Gruppe mit Koronarspasmen waren 20,3 % der Patienten T Allel Träger während in der Kontrollgruppe dies nur für 9 % der Individuen zutraf (Yoshimura et al., 1998). Es ist wichtig noch mal auf die unterschiedliche Genotypverteilung bei Japanern im Vergleich zu Kaukasiern hinzuweisen und die Ergebnisse der europäischen Studien mit den Ergebnissen der japanischen Studien zu vergleichen.

Einige der europäischen Studien haben gegenüber den japanischen Studien widersprüchliche Ergebnisse erbracht. Eine in England durchgeführte Studie konnte zeigen, dass eNOS 894T Homozygote gegenüber den beiden anderen Genotypen eine erhöhtes Risiko sowohl für koronare Herzerkrankung als auch für Myokardinfarkt haben (Hingorani et al., 1999). Im Rahmen der europäischen ECTIM-Studie wurde die Verteilung des eNOS 894G/T Genotyps bei Patienten mit Myokardinfarkt und bei gesunden Kontrollpersonen in Frankreich und Nord Irland analysiert (Poirier et al., 1999). In der Gesamtstudie hatten 37,1 % der Myokardinfarktpatienten und 39,0 % der Kontrollpersonen den Genotyp TT. In der französischen Gruppe war 894G Homozygotie mit Myokardinfarkt assoziiert (44,3 % der Myokardinfarktpatienten hatten den GG Genotyp und nur 35,1 % der Kontrollpersonen; OR = 1,47 [95% KI, 1,03 - 1,97]). In der irischen Gruppe war keine Assoziation zwischen dem eNOS 894G/T Genotyp und Myokardinfarkt nachweisbar. Für die abweichenden Ergebnisse dieser Studie gibt es bisher keine Erklärung.

In Australien wurde eine Studie durchgeführt, in die 763 Kaukasier mit Koronarangiographie eingeschlossen wurden (Cai et al., 1999). Es wurde die eNOS 894G/T Genotypverteilung bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung und denen ohne verglichen. Die Genotypverteilung (GG, GT und TT) in der KHK Gruppe war für Männer 47,8 %; 41,2 % und 11 % und für die Frauen mit koronarer Herzerkrankung 45,2 %; 41,1 % und 13,3 %. Es wurde kein signifikanter Unterschied zu der Genotypverteilung der Männer (43,2 %; 40,7 % und 16 %; P = 0,42) und Frauen (40,2 %; 48,1 % und 13,7 %; P = 0,58) ohne KHK festgestellt.

Die Frequenz des T Allels in unserer Studie (31,8 %) war ähnlich wie die (32,5 %) in der erwähnten großen australischen Studie (Cai et al., 1999) und auch gut vergleichbar mit den T Allel Frequenzen in den anderen europäischen Studien, die bereits zitiert wurden (Poirier et al., 1999; Hingorani et al., 1999). Dagegen liegen die T Allel Frequenzen in den japanischen

Populationen bei etwa 10 % und darunter (Cai et al., 1999). Deswegen sind die Ergebnisse der japanischen und der europäischen Studien schlecht vergleichbar.

4.5 Stellenwert der Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Studie müssen als vorläufig angesehen werden. Es ist verfrüht aus der in dieser Studie beschriebenen Assoziation zwischen dem eNOS 894TT Genotyp und einem negativen Verlauf während der ersten 12 Monate nach Stentimplantation Empfehlungen abzuleiten. Weitere klinische und experimentelle Untersuchungen sind erforderlich um den potentiellen Nutzen dieses Genotyps als Marker abschätzen zu können.

In dieser Studie wurden nur Kaukasier eingeschlossen. Da die eNOS 894G/T Genotypverteilung zwischen verschiedenen Volksgruppen variieren kann (Cai et al., 1999), lassen sich die Ergebnisse dieser Studie nicht auf andere ethnische Gruppen (mit abweichenden Genotypverteilungen) übertragen.

Es ist wichtig zu erwähnen, dass eine Kontrollkoronarangiographie nur bei 84 % der Patienten durchgeführt werden konnte. Dies könnte die Analyse bezüglich der angiographischen Restenose verfälschen. Andererseits war der Anteil von Patienten mit TT Genotyp in der Gruppe mit Kontrollangiographie nicht unterschiedlichen von dem Anteil von TT Patienten in der Gruppe ohne Kontrollangiographie, was einen Fehler dieser Art eher unwahrscheinlich macht.

Leider beinhaltet diese Arbeit keine eigenen Untersuchungen zu der Bedeutung des eNOS 894G/T Polymorphismus für die eNOS Funktion und ggf. den daraus resultierenden Einfluss auf die Synthese und Verfügbarkeit von NO. An diesem Punkt beziehen wir uns auf die

Arbeiten anderer Arbeitsgruppen, die jedoch, wie erwähnt, eine Reihe von Hinweisen dafür enthalten, dass der eNOS 894TT Genotyp mit einer verminderten Verfügbarkeit von NO einhergeht.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung des eNOS 894G/T Polymorphismus für den klinischen Verlauf nach koronarer Stentimplantation untersucht. Die koronare Stentimplantation ist das am häufigsten verwendete interventionelle Therapieverfahren bei der Behandlung der koronaren Herzerkrankung. Die Stentimplantation ist jedoch mit einer Reihe von Problemen behaftet. Dazu gehören das Auftreten von thrombotischen Ereignissen im Anschluss an die Intervention und die Ausbildung einer Restenose, bedingt durch eine überschießende Proliferation und Matrixbildung glatter Gefäßmuskelzellen.

Die endotheliale NO-Synthase (eNOS) katalysiert NO, das vasodilatatorisch, antithrombotisch, antiinflammatorisch und antiproliferativ wirkt. Für das eNOS Gen sind einige häufige genetische Varianten (Polymorphismen) bekannt. Für den eNOS 894G/T Polymorphismus konnte kürzlich gezeigt werden, dass der Austausch von Glutamat durch Aspartat zur Ausbildung einer Schnittstelle für Proteasen führt. Die entsprechenden Proteinfragmente konnten in menschlichem Gewebe nachgewiesen werden. An Thrombozyten konnte gezeigt werden, dass die Gegenwart des 894T Allels zu einer verringerten eNOS Aktivität führt.

Das Ziel dieser Arbeit war es den Einfluss des eNOS 894G/T Polymorphismus auf den klinischen Verlauf nach koronarer Stentimplantation zu untersuchen. Der eNOS 894G/T Genotyp wurde bei 1850 konsekutiven Patienten mit koronarer Herzerkrankung und koronarer Stentimplantation untersucht. Die Patienten wurden entweder in der 1. Med. Klinik, Klinikum rechts der Isar oder im Deutschen Herzzentrum München behandelt. Die DNA

wurde aus Vollblut extrahiert. Die Genotypisierung erfolgte durch PCR und Restriktionsenzymverdau oder mit dem TaqMan-Verfahren. Zur Kontrolle wurde eine zweite Genotypbestimmung bei 20 % der Patienten durchgeführt. Die klinischen Ereignisse (Tod, Myokardinfarkt und Revaskularisierung des Zielgefäßes) wurden dokumentiert. Bei 84 % der Patienten wurde eine Kontrollkoronarangiographie 6 Monate nach Stentimplantation durchgeführt.

Primärer Endpunkt war das Auftreten einer Restenose. Diese war angiographisch definiert als ≥ 50 % Durchmesserstenose bei der Kontrollkoronarangiographie nach 6 Monaten und klinisch definiert als erneute Revaskularisierung des Zielgefäßes innerhalb der ersten 12 Monate nach der Intervention. Sekundäre Endpunkte waren die Mortalität während der ersten 12 Monate und die kombinierte Inzidenz von Tod und Myokardinfarkt während der ersten 12 Monate.

Der wichtigste Befund dieser Studie ist, dass der eNOS 894TT Genotyp mit einem schlechteren klinischen Verlauf innerhalb eines Jahres nach koronarer Stentimplatation assoziiert war. Patienten mit dem eNOS 894TT Genotyp hatten eine erhöhte Mortalität (4,4 %) im Vergleich zu den GG/GT Patienten (2,2 %; P = 0,04). Außerdem zeigten die Patienten mit dem 894TT Genotyp eine erhöhte kombinierte Inzidenz von Tod und MI (7,8 %) im Gegensatz zu den 894GG/GT Patienten (3,7 %; P = 0,007). Dementsprechend hatten die TT Patienten ein um etwa das Zweifache erhöhtes Risiko für diesen Endpunkt (Odds Ratio 2,14, [95 % KI, 1,23 – 3,72]).

Der negativer Einfluss des eNOS 894TT Genotyps auf den klinischen Verlauf war altersabhängig. Junge (Alter < 60 Jahre) 894TT Männer hatten eine deutlich erhöhte 1-Jahres Mortalität im Vergleich zu G Allel tragenden Männern (OR 6,4 [95 % KI, 2,1 - 20,1]). Bei

alten (Alter > 60 Jahre) Männern war die Assoziation des TT Genotyps mit erhöhter Mortalität nicht mehr signifikant (OR 1,9 [95% KI, 0,8 - 5,1]). Derselbe altersabhängige Einfluss des TT Genotyps wurde für das Auftreten des kombinierten Endpunktes von Tod und Myokardinfarkt beobachtet (TT vs. GT/GG Männern: 8,6 % vs. 2,6 %; P = 0,007 bei jungen Männern und 7,2 % vs. 4,3 %; P = 0,3 bei alten Männern).

TT Patienten zeigten eine leichte aber nicht signifikante Erhöhung des Risikos für angiographische (OR 1,11 [95 % KI, 0,78 – 1,56]) und klinische (OR 1,21 [95 % KI, 0,82 – 1,78]) Restenose.

Zusammenfassend ergibt sich aus dieser Studie, dass der 894TT Genotyp des eNOS Gens ein negativer prognostischer Faktor für den klinischen Verlauf innerhalb von einem Jahr nach koronarer Stentimplantation ist. Das der Einfluss im Frühverlauf nicht erkennbar ist, könnte im Zusammenhang mit der Abwesenheit eines intakten Endothels während dieser Zeit stehen. Weitere experimentelle und klinische Studien sind erforderlich, bevor der eNOS 894TT Genotyp sinnvoll als Marker für einen negativen Verlauf nach koronarer Stentimplantation verwendet werden kann.

6. Literaturverzeichnis

Zeitschriftenartikel:

1. Adams, M.R., McCredie, R., Jessup, W., Robinson, J., Sullivan, D., Celermajer, D.S. Oral L-arginine improves endothelium-dependent dilatation and reduces monocyte adhesion to endothelial cells in young men with coronary artery disease. Atherosclerosis. 129 (1997) 261-9.

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. Balligand, J.L., Cannon, P.J. Nitric oxide synthases and cardiac muscle. Autocrine and paracrine influences. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 17 (1997) 1846-58.

4. Cai, H., Wilcken, D.E., Wang, X.L. The Glu-298-->Asp (894G-->T) mutation at exon 7 of the endothelial nitric oxidesynthase gene and coronary artery disease. J Mol Med. 77 (1999) 511-4.

5. Casino, P.R., Kilcoyne, C.M., Quyyumi, A.A., Hoeg, J.M., Panza, J.A. The role of nitric oxide in endothelium-dependent vasodilation of hypercholesterolemic patients. Circulation. 88 (1993) 2541-7.

6. de Belder, A.J., Radomski, M.W., Why, H.J., Richardson, P.J., Bucknall, C.A., Salas, E., Martin, J.F., Moncada, S.
Nitric oxide synthase activities in human myocardium.
Lancet. 341 (1993) 84-5.

7. Dey, N.B., Boerth, N.J., Murphy-Ullrich, J.E., Chang, P.L., Prince, C.W., Lincoln, T.M.
Cyclic GMP-dependent protein kinase inhibits osteopontin and thrombospondin production in rat aortic smooth muscle cells.
Circ Res. 82 (1998) 139-46.

8. Drexler, H.
Nitric oxide and coronary endothelial dysfunction in humans.
Cardiovasc Res. 43 (1999) 572-9.

9. Edelman, E.R., Rogers, C.
Pathobiologic responses to stenting.
Am J Cardiol. 81 (1998) 4E-6E.

10. 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.

11. Ferns, G.A., Raines, E.W., Sprugel, K.H., Motani, A.S., Reidy, M.A., Ross, R. Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF.
Science. 253 (1991) 1129-32.

12. Ferns, G.A., Avades, T.Y.
The mechanisms of coronary restenosis: insights from experimental models.
Int J Exp Pathol. 81 (2000) 63-88.

13. Freedman, J.E., Loscalzo, J., Barnard, M.R., Alpert, C., Keaney, J.F., Michelson, A.D.
Nitric oxide released from activated platelets inhibits platelet recruitment.
J Clin Invest. 100 (1997) 350-6.

14. Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V.
The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.
Nature. 288 (1980) 373-6.

15. Furchgott, R.F.
Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide.
Biosci Rep. 19 (1999) 235-51.

16. Fuster, V., Gotto, A.M., Libby, P., Loscalzo, J., McGill, H.C.
27th 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.

17. Garg, U.C., Hassid, A.
Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells.
J Clin Invest. 83 (1989) 1774-7.

18. Gawaz, M., Neumann, F.J., Ott, I., May, A., Schömig, A.
Platelet activation and coronary stent implantation: effect of antithrombotic therapy. Circulation. 94 (1996) 279-85.

19. Gawaz, M., Neumann, F.J., Ott, I., Schiessler, A., Schömig, A.
Platelet function in acute myocardial infarction treated with direct angioplasty. Circulation. 93 (1996) 229-37.

20. Gawaz, M., Neumann, F.J., Dickfeld, T., Koch, W., Laugwitz, K.L., Adelsberger, H., Langenbrink, K., Page, S., Neumeier, D., Schömig, A., Brand, K.
Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells [see comments]. Circulation. 98 (1998) 1164-71.

21. Gawaz, M., Ruf, A., Neumann, F.J., Pogatsa-Murray, G., Dickfeld, T., Zohlnhofer, D., Schömig, A.
Effect of glycoprotein IIb-IIIa receptor antagonism on platelet membrane glycoproteins after coronary stent placement.
Thromb Haemost. 80 (1998) 994-1001.

22. Gawaz, M., Neumann, F.J., Schömig, A.
Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease: consequences for diagnosis and therapy.
Circulation. 99 (1999) E1-E11.

23. George, S.E.
Nitric oxide and restenosis: opportunities for therapeutic intervention.
Coron Artery Dis. 10 (1999) 295-300.

24. Ghilardi, G., Biondi, M.L., DeMonti, M., Bernini, M., Turri, O., Massaro, F., Guagnellini, E., Scorza, R.
Independent risk factor for moderate to severe internal carotid artery stenosis: T786C mutation of the endothelial nitric oxide synthase gene.
Clin Chem. 48 (2002) 989-93.

25. 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.

26. Grewe, P.H., Machraoui, A., Deneke, T., Barmeyer, J., Muller, K.M.
Structural analysis of 16 different coronary stent systems].
Z Kardiol. 86 (1997) 990-9.

27. 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.

28. 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.

29. Groves, P.H., Lewis, M.J., Cheadle, H.A., Penny, W.J.
SIN-1 reduces platelet adhesion and platelet thrombus formation in a porcine model of balloon angioplasty.
Circulation. 87 (1993) 590-7.

30. Gruentzig, A.R.
Percutaneous transluminal coronary angioplasty.
Semin Roentgenol. 16 (1981) 152-3.

31. Guidelines Subcommittee.
1999 World Health Organization-International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension.
J Hypertens. 17 (1999) 151-83.

32. Herrmann, R.A., Rybnikar, A., Resch, A., Märkl, B., Alt, E., Schömig, A. Thrombogenicity of stainless steel coronary stents with a completely gold coated surface (abstract).
J Am Coll Cardiol. 31 (Suppl. A) (1998) 413A.

33. Hibi, K., Ishigami, T., Tamura, K., Mizushima, S., Nyui, N., Fujita, T., Ochiai, H., Kosuge, M., Watanabe, Y., Kihara, M., Kimura, K., Ishii, M., Umemura, S.
Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction.
Hypertension. 32 (1998) 521-6.

34. Hingorani, A.D., Liang, C.F., Fatibene, J., Lyon, A., Monteith, S., Parsons, A., Haydock, S., Hopper, R.V., Stephens, N.G., O'Shaughnessy, K.M., Brown, M.J.
A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298-->Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK.
Circulation. 100 (1999) 1515-20.

35. Hoffmann, R., Mintz, G.S., Dussaillant, 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.

36. Hoit, B.D.
Two faces of nitric oxide: lessons learned from the NOS2 knockout.
Circ Res. 89 (2001) 289-91.

37. Janssens, S., Flaherty, D., Nong, Z., Varenne, O., van Pelt, N., Haustermans, C., Zoldhelyi, P., Gerard, R., Collen, D.
Human endothelial nitric oxide synthase gene transfer inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation after balloon injury in rats.
Circulation. 97 (1998) 1274-81.

38. Jawien, A., Bowen-Pope, D.F., Lindner, V., Schwartz, S.M., Clowes, A.W.
Platelet-derived growth factor promotes smooth muscle migration and intimal thickening in a rat model of balloon angioplasty.
J Clin Invest. 89 (1992) 507-11.

39. 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 olymorphism in patients treated with coronary stenting.
J Am Coll Cardiol. 36 (2000) 2168-2173.

40. 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.

41. 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.

42. Kastrati, A., Gawaz, M., Koch, W., Kettling, C., Mehilli, J., Schömig, K., von Beckerath, N., Krötz, F., Seidl, H., Elezi, S., Schömig, A.
Patients homozygous for the PlA^2 allele coding for platelet glycoprotein IIIa are at increased risk for stent vessel thrombosis after coronary stent placement (abstract).
Eur Heart J. 19 (Suppl) (1998) 360.

43. Kastrati, A., Schömig, A., Seyfarth, M., Koch, W., Elezi, S., Böttiger, C., Mehilli, J., Schömig, K., von Beckerath, N.
Pl^A polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risk of restenosis after coronary stent placement.
Circulation. 99 (1999) 1005-10.

44. 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.

45. Kelly, R.A., Balligand, J.L., Smith, T.W.
Nitric oxide and cardiac function.
Circ Res. 79 (1996) 363-80.

46. Kolpakov, V., Gordon, D., Kulik, T.J.
Nitric oxide-generating compounds inhibit total protein and collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells.´
Circ Res. 76 (1995) 305-9.

47. 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.

48. Lefkovits, J., Topol, E.J.
Pharmacological approaches for the prevention of restenosis after percutaneous coronary intervention.
Prog Cardiovasc Dis. 40 (1997) 141-58.

49. Livak, K.J.
Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay.
Genet Anal. 14 (1999) 143-9.

50. Ludmer, P.L., Wright, R.F., Arnold, J.M., Ganz, P., Braunwald, E., Colucci, W.S. Separation of the direct myocardial and vasodilator actions of milrinone administered by an intracoronary infusion technique.
Circulation. 73 (1986) 130-7.

51. 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.

52. Marsden, P.A., Heng, H.H., Scherer, S.W., Stewart, R.J., Hall, A.V., Shi, X.M., Tsui, L.C., Schappert, K.T.
Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene.
J Biol Chem. 268 (1993) 17478-88.

53. Maxwell, A.J., Cooke, J.P.
The role of nitric oxide in atherosclerosis.
Coron Artery Dis. 10 (1999) 277-86.

54. McEver, R.P.
Role of selectins in leukocyte adhesion to platelets and endothelium.
Ann N Y Acad Sci. 714 (1994) 185-9.

55. Miyahara, K., Kawamoto, T., Sase, K., Yui, Y., Toda, K., Yang, L.X., Hattori, R., Aoyama, T., Yamamoto, Y., Doi, Y., et al.
Cloning and structural characterization of the human endothelial nitric-oxide-synthase gene.
Eur J Biochem. 223 (1994) 719-26.

56. Moncada, S.

Nitric oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology.

Ann N Y Acad Sci. 811 (1997) 60-7; discussion 67-9.

57. 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.

58. Murad, F.

What are the molecular mechanisms for the antiproliferative effects of nitric oxide and cGMP in vascular smooth muscle?

Circulation. 95 (1997) 1101-3.

59. 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.

60. Nakayama, M., Yasue, H., Yoshimura, M., Shimasaki, Y., Kugiyama, K., Ogawa, H., Motoyama, T., Saito, Y., Ogawa, Y., Miyamoto, Y., Nakao, K.

T-786-->C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm.

Circulation. 99 (1999) 2864-70.

61. 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.

62. 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.

63. Nicolaes, G.A., Dahlback, B.
Factor V and thrombotic disease: description of a janus-faced protein.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 22 (2002) 530-8.

64. Nishida, K., Harrison, D.G., Navas, J.P., Fisher, A.A., Dockery, S.P., Uematsu, M., Nerem, R.M., Alexander, R.W., Murphy, T.J.
Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase.
J Clin Invest. 90 (1992) 2092-6.

65. 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.

66. Pabla, R., Buda, A.J., Flynn, D.M., Blesse, S.A., Shin, A.M., Curtis, M.J., Lefer, D.J. Nitric oxide attenuates neutrophil-mediated myocardial contractile dysfunction after ischemia and reperfusion.
Circ Res. 78 (1996) 65-72.

67. Poirier, O., Mao, C., Mallet, C., Nicaud, V., Herrmann, S.M., Evans, A., Ruidavets, J.B., Arveiler, D., Luc, G., Tiret, L., Soubrier, F., Cambien, F.
Polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene - no consistent association with myocardial infarction in the ECTIM study.
Eur J Clin Invest. 29 (1999) 284-90.

68. Radomski, M.W., Palmer, R.M., Moncada, S.
Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. Lancet. 2 (1987) 1057-8.

69. Ryan, T.J., Faxon, D.P., Gunnar, R.M., Kennedy, J.W., King, S.B., III., Loop, F.D., Peterson, K.L., Reeves, T.J., Williams, D.O., Winters, W.L., Jr.
Guidelines for percutaneous transluminal coronary angioplasty: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Assessment of Diagnostic and Therapeutic Cardiovascular Procedures (Subcommittee on Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty).
J Am. Coll Cardiol. 12 (1988) 529-45.

70. Sase, K., Michel, T.
Expression of constitutive endothelial nitric oxide synthase in human blood platelets. Life Sci. 57 (1995) 2049-55.

71. Schachinger, V., Britten, M.B., Elsner, M., Walter, D.H., Scharrer, I., Zeiher, A.M.
A positive family history of premature coronary artery disease is associated with impaired endothelium-dependent coronary blood flow regulation.
Circulation. 100 (1999) 1502-8.

72. Schachinger, V., Zeiher, A.M.
Prognostic implications of endothelial dysfunction: does it mean anything?
Coron Artery Dis. 12 (2001) 435-43.

73. 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.

74. Schömig, A., Neumann, F.J., Kastrati, A., Schühlen, 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) 1084-9.

75. 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) 3880-7.

76. Schühlen, H., Kastrati, A., Dirschinger, J., Hausleiter, J., Elezi, S., Wehinger, A., Pache, J., Hadamitzky, M., Schömig, A.
Intracoronary stenting and risk for major adverse cardiac events during the first month.
Circulation. 98 (1998) 104-11.

77. Schwartz, R.S.
Pathophysiology of restenosis: interaction of thrombosis, hyperplasia, and/or remodeling.
Am J Cardiol. 81 (1998) 14E-17E.

78. Shears, L.L., 2nd, Kibbe, M.R., Murdock, A.D., Billiar, T.R., Lizonova, A., Kovesdi, I., Watkins, S.C., Tzeng, E.
Efficient inhibition of intimal hyperplasia by adenovirus-mediated inducible nitric oxide synthase gene transfer to rats and pigs in vivo.
J Am Coll Surg. 187 (1998) 295-306.

79. Shimasaki, Y., Yasue, H., Yoshimura, M., Nakayama, M., Kugiyama, K., Ogawa, H., Harada, E., Masuda, T., Koyama, W., Saito, Y., Miyamoto, Y., Ogawa, Y., Nakao, K. Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction.
J Am Coll Cardiol. 31 (1998) 1506-10.

80. Siffert, W., Rosskopf, 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 β3 subunit variant with hypertension.
Nat Genet. 18 (1998) 45-8.

81. Suzuki, T., Okumura, K., Sone, T., Kosokabe, T., Tsuboi, H., Kondo, J., Mukawa, H., Kamiya, H., Tomida, T., Imai, H., Matsui, H., Hayakawa, T.
The Glu298Asp polymorphism in endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary in-stent restenosis.
Int J Cardiol. 86 (2002) 71.

82. Tanus-Santos, J.E., Desai, M., Deak, L.R., Pezzullo, J.C., Abernethy, D.R., Flockhart, D.A., Freedman, J.E.
Effects of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on platelet function, nitric oxide release, and interactions with estradiol.
Pharmacogenetics. 12 (2002) 407-13.

83. Tejada, C., Strong, J.P., Montenegro, M.R., Restrepo, C., Solberg, L.A.
Distribution of coronary and aortic atherosclerosis by geographic location, race, and sex.
Lab Invest. 18 (1968) 509-26.

84. Tesauro, M., Thompson, W.C., Rogliani, P., Qi, L., Chaudhary, P.P., Moss, J. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298.
Proc Natl Acad Sci U S A. 97 (2000) 2832-5.

85. 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.

86. 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 Coll Cardiol. 32 (1998) 1109-17.

87. 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.

89. Varenne, O., Pislaru, S., Gillijns, H., Van Pelt, N., Gerard, R.D., Zoldhelyi, P., Van de Werf, F., Collen, D., Janssens, S.P. Local adenovirus-mediated transfer of human endothelial nitric oxide synthase reduces luminal narrowing after coronary angioplasty in pigs.
Circulation. 98 (1998) 919-26.

90. 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.

91. Wang, X.L., Mahaney, M.C., Sim, A.S., Wang, J., Blangero, J., Almasy, L., Badenhop, R.B., Wilcken, D.E.
Genetic contribution of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide levels.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 17 (1997) 3147-53.

92. Wang, X.L., Sim, A.S., Wang, M.X., Murrell, G.A., Trudinger, B., Wang, J.
Genotype dependent and cigarette specific effects on endothelial nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity.
FEBS Lett. 471 (2000) 45-50.

93. World Health Organisation Study Group.
Diabetes mellitus.
WHO Tech Rep Ser. 727 (1985) 1-104.

94. Yoshimura, M., Yasue, H., Nakayama, M., Shimasaki, Y., Sumida, H., Sugiyama, S., Kugiyama, K., Ogawa, H., Ogawa, Y., Saito, Y., Miyamoto, Y., Nakao, K.
A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese.
Hum Genet. 103 (1998) 65-9

95. Yoshimura, M., Yasue, H., Nakayama, M., Shimasaki, Y., Ogawa, H., Kugiyama, K., Saito, Y., Miyamoto, Y., Ogawa, Y., Kaneshige, T., Hiramatsu, H., Yoshioka, T., Kamitani, S., Teraoka, H., Nakao, K.
Genetic risk factors for coronary artery spasm: significance of endothelial nitric oxide synthase gene T-786-->C and missense Glu298Asp variants.
J Investig Med. 48 (2000) 367-74.

96. Zhang, R., Min, W., Sessa, W.C.
Functional analysis of the human endothelial nitric oxide synthase promoter. Sp1 and GATA factors are necessary for basal transcription in endothelial cells.
J Biol Chem. 270 (1995) 15320-6.

Monographien und Buchbeiträge:

1. Duel, T.F., Bianchi, C., Cantley, L.
Restenosis injury: A problem in regulation and growth.
In “Molecular basis of cardiovascular disease. A Companian to Braunwalds Heart Disease”, Chien, K.R. (Ed.), Copyright ©1999 by W.B. Saunders Company, fourth edition, 367-391.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Sergej Gratschow, Prorektor der Moskauer Medizinischer Setschenow-Akademie, in dessen Labor ich meine wissenschaftliche Arbeit begann, bin ich zu großem Dank verpflichtet. Dank seiner Hilfe konnte ich meine wissenschaftliche Ausbildung in Deutschland fortsetzen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Adnan Kastrati für die Überlassung des Themas. Ohne seine tatkräftige Unterstützung und statistische Beratung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Herrn Dr. Werner Koch möchte ich für seine präzise und ausführliche methodische Beratung bedanken. Herrn Dr. Nicolas von Beckerath bin ich vor allem für anregende Diskussionen und die Durchsicht der Arbeit sehr dankbar. Alle Mitarbeiter des Labor - Frau Angela Ehrenhaft, Frau Marianna Eichinger und Herr Wolfgang Latz - haben ebenfalls zum Gelingen dieser Arbeit viel beigetragen. Insbesondere Frau Ehrenhaft, die mich im Labor eingearbeitet hat, möchte ich für viel Geduld und Verständnis danken.

Ich möchte mich nicht zuletzt bei Herrn Prof. Dr. Albert Schömig bedanken, ohne dessen verlässliche Unterstützung bei meiner Tätigkeit im Deutsches Herzzentrum diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre.