

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

**Einfluss des 5A/6A-Polymorphismus im Promotor des Stromelysin-1-Gens auf die
Restenosehäufigkeit sowie den klinischen Verlauf nach perkutaner transluminaler
Koronarintervention**

Petra Hoppmann

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. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. A. Kastrati
2. Univ.-Prof. Dr. Th. A. Meitinger

Die Dissertation wurde am 10.11.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 15.06.2005 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
Verzeichnis der Abkürzungen.....	3
1. Einleitung.....	5
1.1. Koronare Herzerkrankung.....	5
1.2. Behandlung der koronaren Herzerkrankung.....	5
1.3. Restenose.....	6
1.4. Neointimaproliferation.....	6
1.5. Umbauprozesse der Gefäßwand - „vascular remodeling“.....	8
1.6. Matrixmetalloproteinasen.....	8
1.7. Einfluss genetischer Faktoren auf die Entstehung einer koronaren Herzerkrankung und die Entwicklung einer Restenose nach perkutaner Koronarintervention.....	14
1.8. Der 5A/6A Polymorphismus im Promotor des Stromelysin-1-Gens.....	16
1.9. Ziel/Fragestellung der vorliegenden Arbeit.....	17
2. Material und Methoden.....	19
2.1. Patienten.....	19
2.2. Studienendpunkte.....	19
2.3. Definitionen.....	20
2.4. Durchführung der Intervention und medikamentöse Begleittherapie.....	21
2.5. Angiographische Auswertung.....	21
2.6. Klinische Verlaufskontrollen.....	22
2.7. DNA-Isolierung.....	23
2.8. Das TaqMan-Verfahren.....	23
2.9. Bestimmung des 5A6A-Genotyps des Stromelysin-1-Gens mit dem TaqMan- Verfahren.....	25

2.10.	Statistik.....	27
2.11.	Geräte und Materialien.....	29
3.	Ergebnisse	31
3.1.	Patientencharakteristika	31
3.2.	Eigenschaften der Koronarläsionen und Beschreibung der Intervention.....	33
3.3.	Angiographische Ergebnisse nach sechs Monaten.....	37
3.4.	Klinischer Verlauf innerhalb der ersten zwölf Monate nach Koronarintervention...	39
3.5.	Untergruppenanalyse.....	40
3.6.	Einfluss des verwendeten Stent-Typs auf die Restenosehäufigkeit	45
4.	Diskussion	46
4.1.	Kardiovaskuläre Bedeutung des 5A/6A-Polymorphismus im Stromelysin-1-Gen...	46
4.2.	Bedeutung des 5A/6A-Polymorphismus im Stromelysin-1-Gen bei der Entwicklung einer Restenose.....	48
4.3.	Vergleich der Ergebnissen der vorliegenden Studie mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen.....	51
4.4.	Bedeutung der Ergebnisse	53
5.	Zusammenfassung	55
6.	Literaturverzeichnis.....	58
	Danksagung.....	75

Verzeichnis der Abkürzungen

A	Adenin
A.	Arteria
ACC	American College of Cardiology
AHA	American Heart Association
AP	Angina pectoris
CK	Creatinkinase
C	Cytosin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epidermal growth factor
FAM	6-Carboxyfluorescein
G	Guanin
GpIIb/IIIa	Glykoprotein-IIb/IIIa
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1
IE	Internationale Einheiten
IL-1	Interleukin-1
i.v.	Intravenös
kDa	Kilo dalton
LAD	Left anterior descendens (Ramus interventricularis anterior)
LCX	Left circumflex (Ramus circumflexus)
LDL	Low density Lipoprotein
LOCAT	Lopid coronary angiography trial
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1
MMP	Matrixmetalloproteinase

mRNA	Messenger RNA
MTMMP	Membrane-type Matrixmetalloproteinase
NO	Stickstoffmonoxid
OR	Odds ratio
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
PAI-2	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-2
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet derived growth factor
PTCA	Perkutane transluminale Koronarangioplastie
RCA	Right coronar artery
T	Thymin
TAMRA	6-Carboxytetramethylrhodamin
TGF- β	Transforming growth factor- β
TIMP	Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases
TNF α	Tumor-Nekrosefaktor α
uPA	Urokinase-Plasminogen-Aktivator
VCAM1	Vascular cell adhesion molecule 1
VIC	Fluoreszenzfarbstoff der Firma Applied Biosystems, Darmstadt
WHO	World Health Organisation

1. Einleitung

1.1. Koronare Herzerkrankung

Die koronare Herzerkrankung ist derzeit die häufigste Ursache für Morbidität und Mortalität in den westlichen Industrienationen. Durch epidemiologische Studien wurden Risikofaktoren für die Entwicklung von atherosklerotischen Läsionen als Ursache der koronaren Herzerkrankung identifiziert. Diese unterscheiden sich in durch das Individuum beeinflussbare Risikofaktoren, wie arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, Nikotinabusus, körperliche Inaktivität, Adipositas und durch das Individuum nicht beeinflussbare Risikofaktoren wie Alter, Geschlecht und familiäre Disposition. Mit zunehmendem Alter nimmt dabei der Einfluss der genetischen Risikofaktoren ab und der Einfluss der umweltbedingten, beeinflussbaren Risikofaktoren zu (1).

1.2. Behandlung der koronaren Herzerkrankung

Zur Behandlung der koronaren Herzerkrankung ist die Ballondilatation mit oder ohne Stentimplantation ein etabliertes Therapieverfahren (32, 61, 69). Den Limitationen der Ballondilatation, wie dem Auftreten von Gefäßdissektionen, die schließlich bis zum Gefäßverschluss führen können, sowie dem elastischen Zurückschnellen der Gefäße unmittelbar nach erfolgter Dilatation – „elastic recoil“ genannt - wurde durch die Implantation von Stents begegnet (17, 56). Thrombotische Komplikationen wurden durch die Einführung einer kombinierten antithrombozytären Therapie deutlich reduziert (16, 57). Ein bislang noch nicht gelöstes Problem der perkutanen Koronarinterventionen bleibt jedoch weiterhin die Entwicklung einer Restenose mit einer Gesamtinzidenz von 20 - 50% (37, 40).

1.3. Restenose

Durch Ballondehnung oder Stentimplantation entsteht im Bereich der atherosklerotischen Gefäßläsion eine Verletzung der Gefäßwand, die Prozesse der Entzündung und Wundheilung initiiert (8, 70). Am Ende dieses Wundheilungsprozesses steht die vollständige Reendothelialisierung der verletzten Gefäßwand (20). In 20-50% der Fälle kommt es jedoch im Rahmen der Wundheilung während der ersten sechs Monate nach Ballondehnung oder Stentimplantation zu einer erneuten Einengung des Gefäßlumens, Restenose genannt (37, 40). Nach angiographischer Definition handelt es sich um eine Restenose, wenn der Durchmesser der Stenose $\geq 50\%$ beträgt. Das Substrat der Restenose ist eine überschießend regenerierende Gefäßintima - Neointima genannt - die sich nach erfolgter Ballondilatation oder Stentimplantation bildet, sowie ein Umbauprozess der Gefäßwand – auch als „vascular remodeling“ bezeichnet - der zu vermehrter Vasokonstriktion führt (11). Während die Entwicklung einer Neointima den hauptsächlichen Mechanismus einer Restenoseentwicklung nach Stentimplantation darstellt, ist „vascular remodeling“ ein wichtiger Faktor für die Entwicklung einer Restenose nach Ballondilatation (19, 24, 39).

1.4. Neointimaproliferation

Durch die mechanische Verletzung der Gefäßintima im Rahmen der Gefäßangioplastie kommt es zu einer kaskadenartigen Aktivierung der Blutgerinnung sowie zu einer Initiierung von Entzündungs- und Wundheilungsprozessen (8, 70). Die Endothelschicht des Gefäßes wird durch die Ballondilatation und/oder Stentimplantation destruiert (20). An den freiliegenden subendothelialen Strukturen Kollagen, Fibronectin und Laminin kommt es zur Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten. Dabei werden verschiedene vasoaktive Substanzen - Serotonin, Thromboxan A₂ - und Wachstumsfaktoren - „platelet derived growth factor“ (PDGF), „epidermal growth factor“ (EGF) und „transforming growth factor- β “ (TGF-

β) - freigesetzt (16). Diese Wachstumsfaktoren weisen unter Anderem eine chemotaktische und proliferative Wirkung auf glatte Gefäßmuskelzellen auf (9, 29). Durch die Freisetzung des Leukozytenchemokins „monocyte chemotactic protein-1“ (MCP-1) aus den aktivierten Thrombozyten kommt es zur Invasion von Leukozyten und Initiierung einer Entzündungsreaktion im Bereich der Endothelverletzung (15). Zudem werden an der Oberfläche der Endothelzellen Adhäsionsmoleküle exprimiert, die ebenfalls zu einer Adhäsion und Migration von Leukozyten und Monozyten führen (60). Der Entzündungsprozess wird aufrecht erhalten, indem die aktivierten Leukozyten durch weitere Freisetzung von Entzündungsmediatoren und Chemokinen eine erneute Adhäsion und Migration von Leukozyten und Monozyten bewirken. Zudem weisen die Entzündungsmediatoren und Chemokine - ebenso wie der von aktivierten Thrombozyten freigesetzte PDGF - eine chemotaktische und proliferative Wirkung auf glatte Gefäßmuskelzellen auf (9, 29). Es kommt dadurch zu einer Migration von glatten Gefäßmuskelzellen aus der Gefäßmedia in die Gefäßintima sowie zu einer vermehrten Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen in der Gefäßintima. Dabei entdifferenzieren die normalerweise hoch differenzierten ortständigen glatten Gefäßmuskelzellen zu Zellen, die einerseits in der Lage sind zu migrieren, und andererseits extrazelluläre Matrix zu synthetisieren (24, 39). Durch diese Vorgänge entsteht eine überschießend wachsende Gefäßintima - Neointima genannt. Der initial durch Stentimplantation erreichte Lumenzuwachs des Koronargefäßes kann hiermit zumindest teilweise wieder verloren gehen, d.h. eine Restenose kann sich bilden. Wie in pathologisch anatomischen Studien festgestellt wurde, dauert dieser Prozess üblicherweise drei bis sechs Monate (19, 31).

1.5. Umbauprozesse der Gefäßwand - „vascular remodeling“

Untersuchungen mit intravaskulärem Ultraschall zeigten, dass es nach erfolgter Ballondilatation im Bereich der Gefäßläsion zu einer Abnahme der Fläche der Lamina elastica externa im Gefäßquerschnitt kommt, was zu einem Schrumpfen der Arterie und somit zu einer Einengung des Gefäßlumens führen kann (36, 46). Durch die im Rahmen der Gefäßverletzung initiierten Entzündungs- und Wundheilungsprozesse kommt es zu einem Abbau und anschließender Neusynthese von extrazellulärer Matrix (6, 47). Dieser Umbauprozess des extrazellulären Bindegewebes wird vom Gleichgewicht der Matrixmetalloproteinasen (MMPs) auf der einen, sowie deren endogenen Gegenspielern, den „tissue inhibitors of metalloproteinases“ (TIMPs) auf der anderen Seite reguliert (6, 47). Eine unausgeglichene Neuorganisation der extrazellulären Matrix kann dabei zu einer Lumeneinengung des Gefäßes führen (11). Ein vermehrten Abbau von extrazellulärem Bindegewebe und somit auch der Lamina elastica externa, hat eine vermehrten Vasokonstriktion und somit eine Reduktion des Gefäßlumens zur Folge (11, 59). Darüber hinaus kann eine vermehrte Produktion und Anhäufung von extrazellulärer Matrix in der Gefäßwand nicht nur aufgrund der mechanischen Gefäßeinengung durch Neointimaproliferation, sondern auch durch Vasokonstriktion zu einer Lumeneinengung des Gefäßes beitragen (11).

1.6. Matrixmetalloproteinasen

Matrixmetalloproteinasen gehören zur Familie der zinkhaltigen Endopeptidasen, die den Abbau von extrazellulärer Matrix bewerkstelligen (11, 47). Nach ihrer Molekülstruktur und ihrer Substratspezifität werden die bisher 23 identifizierten Metalloproteinasen in 5 Untergruppen unterteilt: Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, membrangebundene Metalloproteinasen und sonstige Metalloproteinasen (47). Durch ihre Fähigkeit,

extrazelluläres Bindegewebe abzubauen, spielen Matrixmetalloproteinasen bei zahlreichen physiologischen Prozessen, wie der Organentwicklung während der Embryogenese und bei der Entzündungsreaktion und Wundheilung nach Gewebeverletzung eine bedeutende Rolle (11, 47). Auch bei zahlreichen pathologischen Reaktionen, wie der Entwicklung atherosklerotischer Gefäßläsionen, der Ausbildung von Gefäß-Aneurysmata sowie bei der Entwicklung einer Restenose nach perkutaner Koronarintervention sind Matrixmetalloproteinasen in entscheidender Form beteiligt (11, 47).

Die Entwicklung einer Atherosklerose entspricht einer Entzündungsreaktion, bei der es durch Endothelverletzung zu einer endothelialen Expression von Adhäsionsmolekülen, wie dem „vascular cell adhesion molecule 1“ (VCAM-1) und dem „intercellular adhesion molecule 1“ (ICAM-1) kommt, an die sich im Blut zirkulierende Monozyten binden, um anschließend in den subendothelialen Raum einzuwandern (53). Im Rahmen der Entzündungsreaktion werden sowohl von Endothelzellen, als auch von aktivierten Monozyten Chemokine sezerniert, die zur weiteren Migration von Monozyten aus dem Intravasalraum in den subendothelialen Raum führen (53). Dort differenzieren sich die Monozyten zu Makrophagen und phagozytieren über die Gefäßwand aufgenommenes LDL-Cholesterin. Die dadurch entstandenen Gefäßläsionen werden als „fatty streaks“ bezeichnet. Im weiteren Verlauf kommt es zur Migration und Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen, die in der Lage sind, extrazelluläre Matrix zu synthetisieren. (42, 53). Die Ansammlung von Entzündungszellen, glatten Gefäßmuskelzellen und extrazellulärer Matrix in der Gefäßwand führt zu einem Wachstum der Gefäßläsion und zunehmender Lumeneinengung des Gefäßes (53). Durch Sekretion hydrolytischer Enzyme von aktivierten Entzündungszellen entstehen im Zentrum der Gefäßläsion Gewebnekrosen (53). In diesem fortgeschritten Stadium der Atherosklerose werden die Plaques als komplizierte Gefäßläsion bezeichnet (53). Es wird vermutet, dass Matrixmetalloproteinasen durch den Abbau der Basalmembran des Endothels

die Einwanderung von Entzündungszellen sowie das Eindringen von Plasmaproteinen und Plasmalipiden in den subendothelialen Raum erleichtern (11, 52). Des weiteren ermöglichen Matrixmetalloproteinasen durch Abbau der Lamina elastica interna das Einwandern von glatten Gefäßmuskelzellen in die Gefäßintima, was letztlich zur Ausbildung eines atherosklerotischen Plaques führt (11).

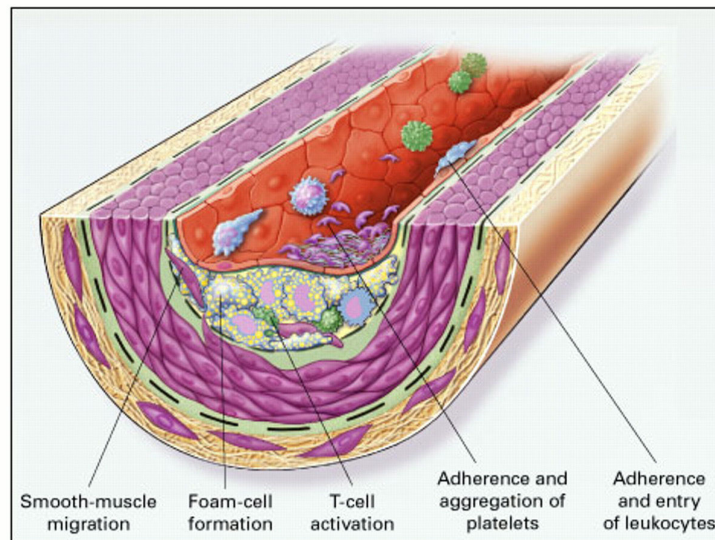


Abbildung 1: Entwicklung einer atherosklerotischen Läsion in der Gefäßwand im Stadium des sogenannten „fatty-streak“ (Abbildung übernommen aus 53)

Zu den gefürchteten Komplikationen der Atherosklerose zählt die Entwicklung eines akuten Koronarsyndroms. Hierzu kommt es durch Ruptur eines atherosklerotischen Plaques mit Freilegung der thrombogenen subendothelialen Strukturen Kollagen, Fibronectin und Laminin und nachfolgender Thrombusbildung, was zu einem subtotalen oder kompletten Verschluss des Koronargefäßes führt (7, 41). In atherosklerotischen Plaques wurde eine vermehrte Expression und proteolytische Aktivität von Matrixmetalloproteinasen nachgewiesen. Diese waren insbesondere in den vulnerablen Regionen des Plaques, der fibrösen Kappe, lokalisiert. Aufgrund dieser proteolytischen Aktivität der Matrixmetalloproteinasen, die zur Ruptur des

atherosklerotischen Plaques beiträgt, wird den Matrixmetalloproteinasen eine wichtige Rolle bei der Entstehung eines akuten Koronarsyndroms zugeschrieben (13, 14, 23).

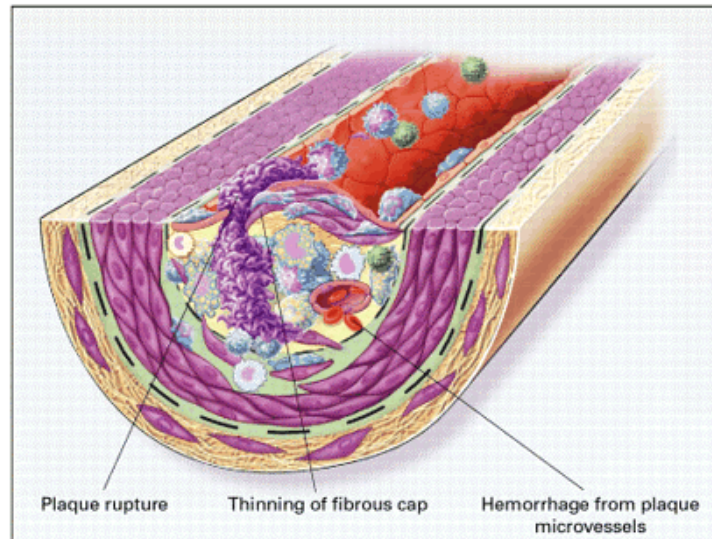


Abbildung 2: Ruptur eines fibrösen atherosklerotischen Plaques (Abbildung übernommen aus 53).

Die Aktivität der Metalloproteinasen wird durch mehrere Faktoren reguliert: Durch Genexpression, durch Sekretion als Vorstufen (Proenzyme) mit nachfolgender Aktivierung durch verschiedene Proteinase wie Plasmin, Trypsin, Chymotrypsin, Kallikrein, Kathepsin, Neutrophilen-Elastase und andere Metalloproteinase, sowie durch spezielle Inhibitoren der Metalloproteinase, die „tissue inhibitors of metalloproteinases“ (TIMPs) (42, 47).

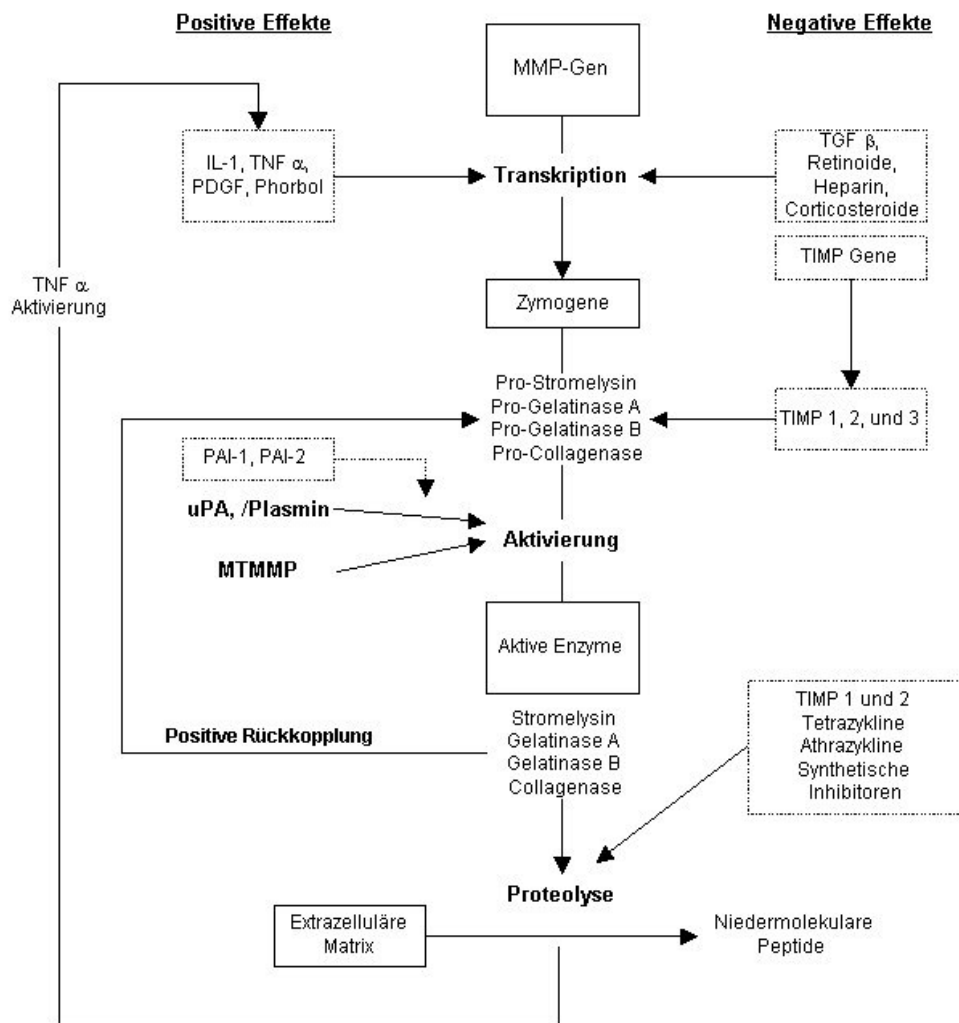


Abbildung 3: Regulation der Matrixmetalloproteinaseaktivität durch Genexpression, Sekretion als Vorstufen (Proenzyme) sowie durch Inhibitoren der Metalloproteinasen („tissue inhibitors of metalloproteinases“) (6).

Eine wichtige Rolle bei der Entwicklung einer Restenose nach perkutaner Koronarintervention wird der Matrixmetalloproteinase Stromelysin-1, auch Matrixmetalloproteinase-3 (MMP-3) genannt, zugeschrieben. Stromelysin-1 katalysiert den Abbau von Proteinen der extrazellulären Matrix (Proteoglykane, verschiedene Typen von Kollagen, Fibronectin, Laminin) und ist gleichzeitig in der Lage, die inaktiven Vorstufen

anderer Matrixmetalloproteinasen - Collagenase-1 (MMP-1), Matrilysin (MMP-7) and 92-kDa-Gelatinase (MMP-9) - in ihre jeweilige aktive Form zu überführen (3, 27, 38, 62, 66). Durch immunhistochemische Untersuchungen konnte in humanen atherosklerotischen Plaques vermehrt Stromelysin-1 sowie dessen proteolytische Aktivität nachgewiesen werden (14). In den untersuchten Plaques enthielten die glatten Gefäßmuskelzellen und die lipidreichen Makrophagen Stromelysin-1 Messenger RNA (mRNA). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass cytokinstimulierte glatte Gefäßmuskelzellen, die aus experimentell erzeugten atherosklerotischen Gefäßläsionen gewonnen wurden, Stromelysin-1 produzieren sowie aktivierte Formen von Matrixmetalloproteinasen freisetzen (12, 13, 23). Im Tierversuch (Ballonangioplastie der A. carotis interna bei Ratten) führte eine Verletzung der Gefäßintima zu einer Induktion von Stromelysin-1 mRNA (28). Antisense Oligonucleotide gegen mRNA des Stromelysin-1-Gens konnten dagegen bei Ratten die Migration und Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen sowie die Neointima-Bildung nach Verletzung der Gefäßwand hemmen (44).

Somit liegt die Vermutung nahe, dass Stromelysin-1 eine wichtige Rolle bei der Ausbildung einer Restenose nach perkutaner koronarer Koronarintervention spielt. Zum Einen im Rahmen des „vascular remodelings“ durch die Umbauvorgänge des extrazellulären Bindegewebes mit Verlust der Lamina elastica externa und konsekutiver Vasokonstriktion (11, 59). Zum Anderen im Rahmen der Neointima-Entwicklung: Durch Verlust der Lamina elastica interna wird die Migration von glatten Gefäßmuskelzellen in die Gefäßintima erleichtert, was letztlich zu einer Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen sowie zur Anhäufung von extrazellulärer Matrix in der Gefäßintima führt (11).

1.7. Einfluss genetischer Faktoren auf die Entstehung einer koronaren Herzerkrankung und die Entwicklung einer Restenose nach perkutaner Koronarintervention

Als Risikofaktoren für die Entwicklung einer koronaren Herzerkrankung gelten neben den durch das Individuum beeinflussbaren Risikofaktoren arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus und Nikotinabusus auch erbliche Faktoren, wie eine familiäre Disposition für koronare Herzerkrankung oder hereditäre Fettstoffwechselstörungen. Insbesondere wurden in letzter Zeit zunehmend Polymorphismen in Genen kardiovaskulärer Schlüsselproteine als mögliche Einflussfaktoren auf die Entwicklung oder den Verlauf einer koronaren Herzerkrankung untersucht. Unter einem Genpolymorphismus versteht man das häufige Vorkommen von zwei oder mehr unterschiedlichen Allelen der genomischen DNA. Häufig bedeutet dabei, dass das sogenannte seltene Allel mit einer Frequenz von $\geq 1\%$ in der untersuchten Population vorkommt. Bei den meisten bisher untersuchten Polymorphismen handelt es sich entweder um „single nucleotide“ Polymorphismen oder um Insertions-/Deletions-Polymorphismen. Ein „single nucleotide“ Polymorphismus ist gekennzeichnet durch den Austausch einer Base in der Basensequenz der DNA, bei einem Insertions-/Deletions-Polymorphismus unterscheiden sich die beiden Allele z.B. in der Anwesenheit oder Abwesenheit eines definierten Sequenzabschnittes der DNA. „Single nucleotide“ Polymorphismen kommen durchschnittlich alle 1000 Basen im menschlichen Genom vor. In einigen Fällen können Genpolymorphismen ohne funktionelle Bedeutung sein. Ein Polymorphismus in einem Intron des entsprechenden Gens muss beispielsweise nicht zu einer Veränderung des Genprodukts oder einer veränderten transkriptionellen Aktivität führen. Ebenso können die unterschiedlichen Allele eines Polymorphismus im Exon eines Gens ein identisches Genprodukt ergeben. Andererseits können jedoch die verschiedenen Allele eines Polymorphismus zu qualitativ und quantitativ unterschiedlichen Genprodukten führen. Bei

Polymorphismen in der Promotor-Region eines Gens können die beiden Allele durch Unterschiede in der Bindungsstelle für Transkriptionsfaktoren eine unterschiedliche Gentranskription zur Folge haben (72). Des Weiteren können die Allele eines Genpolymorphismus differentiell den Spleißvorgang der mRNA beeinflussen (63). „Single nucleotid“ Polymorphismen im Exon eines Gens können zudem zu einem Austausch von Aminosäuren im Genprodukt und somit zu einer veränderten Funktion der Proteinvariante führen. Kommt es durch den Austausch einer Aminosäure im Genprodukt zum Einfügen oder Entfallen einer Schnittstelle für Proteasen, ändert sich die Menge an verfügbarem Genprodukt (48, 68).

Genetische Faktoren spielen nicht nur bei der Entwicklung einer koronaren Herzerkrankung eine Rolle, sondern beeinflussen auch den Therapieerfolg. Für einige „single nucleotid“ Polymorphismen in Genen von kardiovaskulären Schlüsselproteinen wurde bereits eine Assoziation mit dem Langzeitverlauf nach perkutaner Koronarintervention gezeigt. Für einen Polymorphismus im Gen des Fibrinogenrezeptors auf Thrombozyten, dem PIA-Polymorphismus des Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptors, konnte gezeigt werden, dass Träger des PIA2-Allels im Vergleich zu Trägern des PIA1-Allels ein signifikant höheres Risiko für die Entwicklung einer Restenose nach koronarer Stentimplantation haben (33). Für einen „single nucleotid“ Polymorphismus im Gen der Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase (894 G/T) wurde nachgewiesen, dass homozygote Träger des T-Allels in einem Beobachtungszeitraum von einem Jahr nach koronarer Stentimplantation ein höheres Risiko für das Auftreten eines akuten Myokardinfarktes hatten sowie eine höhere Gesamtmortalität aufwiesen als Patienten mit dem Genotyp GT oder GG (18). Im Gegensatz hierzu werden bestimmten Allelen einzelner Polymorphismen auch protektive Effekte zugeschrieben: So konnte z.B. für Träger des Allel-2 des Gens für den Interleukin-1-Rezeptor-Antagonisten (IL-1RN*2) eine geringere Restenoserate nach koronarer Stentimplantation nachgewiesen werden (30).

1.8. Der 5A/6A Polymorphismus im Promotor des Stromelysin-1-Gens

Die Aktivität der Matrixmetalloproteinase Stromelysin-1 im Rahmen von Entzündungs- und Wundheilungsprozessen wird überwiegend durch Genexpression reguliert (10, 22). Der Promotor des Stromelysin-1-Gens wird dabei unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren und Cytokinen aktiviert, bzw. inaktiviert (10, 22, 34, 35). Die Regulation der Promotoraktivität erfolgt durch cis-regulierende Sequenzen in der Promotor-Region, an die entsprechende Transkriptionsfaktoren binden. Beispielsweise ist zur basalen Expression von Stromelysin-1 die Bindung des Aktivator-Proteins 1 nötig, dessen Bindungsstelle sich an Nukleotidposition 63 bis 70 vor der Startstelle der Transkription befindet (4, 49, 64). Eine Induktion der Stromelysin-1-Expression durch einen von aktivierten Thrombozyten freigesetzten Wachstumsfaktor, PDGF, erfolgt durch Bindung an Nukleotidposition 1218 bis 1202 vor der Startstelle der Transkription des Stromelysin-1-Promotors (5, 55). Die Bindung von Transkriptions-Repressor-Proteinen an die Promotor-Region des Stromelysin-1-Gens führt dagegen zu einer Hemmung der Stromelysin-1-Expression (72).

Im Promotor des menschlichen Stromelysin-1-Gens wurde ein Insertions-/Deletions-Polymorphismus nachgewiesen, dessen Basensequenz durch ein Sequenzmotiv mit einer Folge von entweder fünf Adenosin-Basen oder einer Folge von sechs Adenosin-Basen gekennzeichnet ist (Stromelysin-5A/6A-Polymorphismus). Die polymorphe Sequenz befindet sich an Nukleotidposition 1171-1175 bzw. 1171-1176 vor der Startstelle der Transkription (50, 65, 74). In Transfektionsversuchen mit Gewebekulturzellen wurde gezeigt, dass der Promotor des Stromelysin-1-Gens mit dem 5A-Sequenzmotiv eine höhere Aktivität aufweist als der Promotor des Stromelysin-1-Gens mit dem 6A-Sequenzmotiv. Ein möglicher Grund für die verminderte transkriptionelle Aktivität des Promotors mit dem 6A-Sequenzmotiv ist die bevorzugte Bindung eines Transkriptions-Repressor-Proteins an die 6A-Basenfolge.(72).

Aufgrund der zentralen Funktion von Stromelysin-1 bei Umbauvorgängen der extrazellulären Matrix und somit bei der Entwicklung einer Restenose nach perkutaner Koronarintervention durch Neointimabildung und „vascular remodeling“, liegt die Vermutung nahe, dass der Stromelysin-1-5A/6A-Polymorphismus mit dem Risiko der Entwicklung einer Restenose nach Ballondilatation oder Stentimplantation assoziiert sein könnte.

1.9. Ziel/Fragestellung der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde eine mögliche Assoziation des 5A/6A-Polymorphismus im Promotor des Stromelysin-1-Gens mit der Entwicklung einer Restenose sowie dem klinischen Verlauf nach Ballondilatation mit oder ohne Stentimplantation untersucht. Unterschiede im angiographischen Langzeitergebnis und im klinischen Verlauf nach perkutaner Koronarintervention bei Trägern unterschiedlicher Allele des Stromelysin-1 5A/6A-Polymorphismus würden die Hypothese - Stromelysin-1 ist an der Entwicklung einer Restenose nach perkutaner Koronarintervention beteiligt - unterstützen. Um dies zu untersuchen und gleichzeitig das Risiko eines Zufallsergebnisses durch eine große Fallzahl möglichst gering zu halten wurden nach entsprechender Fallzahlabstimmung konsekutiv 3333 kaukasische Patienten, die aufgrund einer symptomatischen koronaren Herzerkrankung eine Behandlung mit Ballondilatation oder Stentimplantation erhielten, in die Studie eingeschlossen. Bei allen Patienten wurde durch Verwendung allelspezifischer, fluoreszierender Sonden der Stromelysin-1-5A/6A-Genotyp bestimmt. Zudem waren für alle eingeschlossenen Patienten anamnestische, klinische sowie angiographische Daten verfügbar und wurden mittels statistischer Analyse ausgewertet.

Die Fragestellung der Studie lautete:

1. Besteht ein Unterschied zwischen den Trägern verschiedener Allele des Stromelysin-1-5A/6A-Polymorphismus in der Häufigkeit des Auftretens einer angiographisch definierten Restenose nach perkutaner Koronarintervention?
2. Weisen Träger unterschiedlicher Allele des 5A/6A-Polymorphismus im Stromelysin-1-Gen Unterschiede im langfristigen klinischen Verlauf nach perkutaner Koronarintervention auf, insbesondere in der Häufigkeit von fatalen Ereignissen wie Tod und Myokardinfarkt oder bezüglich der Notwendigkeit einer erneuten Myokardrevaskularisation?
3. Ist eine mögliche Assoziation des Stromelysin-1-5A/6A-Genotyps mit der angiographisch definierten Restenoserate oder dem klinischen Langzeitverlauf unterschiedlich für Patienten, die mit Ballondilatation behandelt wurden und Patienten, die mit Stentimplantation behandelt wurden?

2. Material und Methoden

2.1. Patienten

In die Studie wurden 3333 kaukasische Patienten konsekutiv eingeschlossen, die aufgrund einer symptomatischen koronaren Herzerkrankung im Deutschen Herzzentrum München oder in der 1. Medizinischen Klinik des Klinikums rechts der Isar mittels Ballondilatation oder Stentimplantation behandelt wurden. Bei 2857 Patienten wurde eine Stentimplantation durchgeführt, bei 476 Patienten erfolgte eine Ballondilatation ohne Stentimplantation. Die Patienten erhielten noch während des stationären Aufenthalts einen Termin zur Kontroll-Koronarangiographie sechs Monate nach dem Primäreingriff. Alle Patienten, die an der Studie teilgenommen hatten, waren zuvor ausführlich über die Studie aufgeklärt worden und hatten eine schriftliche Einverständniserklärung unterzeichnet. Das Studienprotokoll entspricht der Deklaration von Helsinki und wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität München genehmigt.

2.2. Studienendpunkte

Primärer Endpunkt der Studie war das Auftreten einer angiographisch diagnostizierten Restenose (Durchmesser der Stenose \geq 50%) zum Zeitpunkt der Kontroll-Koronarangiographie sechs Monate nach erfolgter Intervention.

Sekundäre Endpunkte der Studie waren die Inzidenz von Tod oder akutem Myokardinfarkt sowie die Notwendigkeit einer Myokard-Revaskularisation mittels Ballondilatation oder koronarer Bypassoperation aufgrund erneut aufgetretener angina pectoris Symptomatik bzw. dem klinischem Nachweis einer Myokardischämie bei gleichzeitig angiographisch nachgewiesener Restenose innerhalb des Beobachtungszeitraumes von einem Jahr.

2.3. Definitionen

Eine arterielle Hypertonie wurde diagnostiziert, wenn bei mindestens zwei Messungen die systolischen Blutdruckwerte über 140mmHg und/oder die diastolischen Blutdruckwerte über 90mmHg lagen (21). Die Patienten wurden als Diabetiker bezeichnet, wenn sie insulinpflichtig waren oder orale Antidiabetika einnahmen. Entsprechend der Kriterien der World Health Organisation (WHO) wurde diese Diagnose auch bei diätetisch behandelten Patienten gestellt, sofern sie einen pathologischen Glucosetoleranztest und/oder erhöhte Werte für Nüchtern-Glucose in mindestens zwei Blutabnahmen aufwiesen (71). Patienten, die während der letzten sechs Monate regelmäßig rauchten, wurden als aktive Raucher bezeichnet. Einer Hypercholesterinämie wurde eine Gesamtcholesterinkonzentration im Serum (Nüchtern-Blutabnahme) von über 240mg/dl zu Grunde gelegt. Ein Myokardinfarkt in der Vorgeschichte wurde anhand der charakteristischen Veränderungen im Zwölf-Kanal-EKG diagnostiziert, Daten über eine koronare Bypassoperation wurden aus der Krankenakte des Patienten oder den Angaben des betreuenden Hausarztes entnommen. Eine instabile angina pectoris wurde definiert als Brustschmerzen in Ruhe oder bereits bei geringster körperlicher Belastung sowie innerhalb des letzten Monats neu aufgetretene Brustschmerzen ohne Erhöhung der Creatinkinase (CK) im Labor oder Zeichen eines akuten Myokardinfarktes im Zwölf-Kanal-EKG. Ein akuter Myokardinfarkt wurde bei Auftreten einer neuen pathologischen Q-Welle im Zwölf-Kanal-EKG oder einem Anstieg der Creatinkinase-Werte mit zugehörigem MB-Isoenzym-Anteil auf ein über dreifaches der Norm diagnostiziert. Eine dringliche Revaskularisation des Zielgefäßes entweder mittels Ballondilatation oder durch koronare Bypassoperation erfolgte bei erneut aufgetretener angina pectoris bzw. klinischem Nachweis einer Myokardischämie sowie angiographisch nachgewiesener Restenose im Interventionsbereich.

2.4. Durchführung der Intervention und medikamentöse Begleittherapie

Vor der Koronarintervention erhielten alle Patienten 500mg Acetylsalicylsäure i.v. sowie einen Heparin-Bolus von 5000IE. Die periinterventionelle Therapie bestand aus einem intraarteriellen Heparinbolus von 10000IE sowie einer anschließenden Heparin-Infusion mit 1000IE pro Stunde über eine Gesamtdauer von zwölf Stunden. Patienten mit einem hohen Risiko für das Auftreten einer Stentthrombose erhielten eine zusätzliche Therapie mit dem Glykoprotein-IIb/IIIa-Antagonisten Abciximab (0,125mg/kg Körpergewicht als Bolus sowie eine anschließende Dauerinfusion mit 0,045mg/kg Körpergewicht über zwölf Stunden). Die postinterventionelle antithrombozytäre Therapie bestand aus zweimal täglich 100mg Acetylsalicylsäure als Dauertherapie sowie zweimal täglich 250mg Tiklopidin für eine Dauer von vier Wochen.

Für die Stentimplantation wurden Stents mit unterschiedlichem Design (unterschiedliche Anordnung und Breite der „struts“) verwendet: ACS RX Multi-Link (Guidant, Advanced Cardiovascular Systems, Santa Clara, California, USA), Jostent (JOMED International AB, Helsingborg, Schweden), ACS Multi-Link RX Duet, Medtronic AVE (Medtronic AVE, Santa Rosa, California, USA), BX Velocity (Cordis Corp., Miami, Florida, USA) und andere.

2.5. Angiographische Auswertung

Bei allen angiographischen Untersuchungen wurde eine computergestützte Auswertung der Angiogramme mit dem „automated edge-detection system CMS“ (Medis Medical Imaging Systems, Nuenen, Niederlande) unmittelbar vor und nach erfolgter Koronarintervention sowie zum Zeitpunkt der Kontroll-Koronarangiographie durchgeführt. Die Auswertung der Angiogramme erfolgte in jeweils standardisierten identischen Projektionen. Folgende Parameter wurden für jedes behandelte Gefäßsegment bestimmt: Minimaler Lumendurchmesser der Stenose vor erfolgter Intervention, Referenzdurchmesser

entsprechend des Durchmessers des Koronargefäßes im gesunden Bereich vor Beginn der Stenose, die sich daraus errechnende prozentuale Stenose sowie die Länge der Stenose. Der Lumenverlust wurde aus der Differenz des minimalen Lumendurchmessers unmittelbar nach Ballondilatation bzw. Stentimplantation und dem minimalen Lumendurchmesser zum Zeitpunkt der Kontrollangiographie berechnet. Der Verlustindex entspricht dem Quotienten aus Lumenverlust und dem durch die Intervention erzielten Lumenzuwachs. Die Auswertung der Angiogramme wurde von Untersuchern durchgeführt, die weder an der Durchführung der Koronarintervention beteiligt waren, noch Information über die genetischen Daten des Patienten hatten.

Die morphologische Beurteilung der Gefäßläsion erfolgte nach dem modifizierten Klassifikationssystem des American College of Cardiology / American Heart Association mit Einteilung der Gefäßläsionen in die Kategorien A, B1, B2 und C, wobei Läsionen der Klassen B2 und C als komplexe Läsionen bezeichnet werden. Als angiographische Restenose wurde ein Stenosedurchmesser von $\geq 50\%$ definiert.

2.6. Klinische Verlaufskontrollen

Während des postinterventionellen stationären Aufenthalts wurden die Creatinkinase-Werte seriell sechs, zwölf und 48 Stunden nach erfolgter Koronarintervention bestimmt. 30 Tage, sowie einmal zwischen neun und 15 Monate nach der Koronarintervention beinhaltete das poststationäre klinische „Follow up“ der Patienten eine klinische Untersuchung in der kardiologischen Ambulanz des Deutschen Herzzentrums oder der 1. Medizinischen Klinik des Klinikum rechts der Isar. Sechs Monate nach der Koronarintervention erfolgte eine zusätzliche klinische Untersuchung im Rahmen des stationären Aufenthalts zur Kontroll-Koronarangiographie. Patienten, denen es nicht möglich war, eine klinische Untersuchung in unserer kardiologischen Ambulanz durchführen zu lassen, wurden telefonisch kontaktiert.

Weitere Daten zu den klinischen Endpunkten der Studie (Tod, Myokardinfarkt, Myokardrevaskularisation mittels Ballondilatation oder koronarer Bypassoperation) wurden anhand der Krankenakte oder durch telefonischem Kontakt mit den Patienten oder deren Hausarzt erhoben.

2.7. DNA-Isolierung

Die genomische DNA wurde mit Hilfe eines kommerziell erwerblichen Kits (Qiagen, Hilden und Roche Applied Science, Mannheim) aus Leukozyten von 200 µl peripheren Blutes gewonnen. Der Vorgang bestand aus Lyse der Zellen mit Hilfe einer proteasehaltigen Lösung. Anschließend erfolgte die Bindung der DNA an eine Silika-Gel Membran. Nach schrittweisem Entfernen der Blut- und Zellbestandteile durch zwei verschiedene Waschpuffer-Lösungen wurde die DNA mit Hilfe einer Elutionspuffer-Lösung (10mM Tris-Cl; 0,5mM EDTA) von der Silika-Gel-Membran eluiert. Die Lagerung der wässrigen DNA-Proben erfolgte bei -25°C.

2.8. Das TaqMan-Verfahren

Zur Bestimmung des 5A/6A-Genotyps des Stromelysin-1-Gens wurde das TaqMan-Verfahren eingesetzt. Die TaqMan-Methode besteht aus einer Kombination aus Polymerasekettenreaktion (PCR) und der 5`Nuklease-Reaktion (43). Mit Hilfe der PCR ist es möglich, einen bestimmten Abschnitt der DNA mit bekannter Basensequenz zu vervielfältigen. Dabei handelt es sich um ein zyklisches Verfahren, bestehend aus den Schritten Denaturierung der DNA, Anlagerung der „primer“ („annealing“) sowie Verlängerung der „primer“. Durch Erhitzen auf 95°C wird die DNA denaturiert, d.h. es erfolgt eine Aufspaltung der doppelsträngigen DNA in zwei DNA-Einzelstränge. Anschließend wird in einem PCR-Gerät (Thermocycler) die Temperatur auf einen Bereich

eingestellt, in dem sich die „primer“ spezifisch an die Enden des zu vervielfältigenden DNA-Segments anlagern. Die „annealing“-Temperatur liegt üblicherweise zwischen 60 und 62°C. „Primer“ sind Oligonukleotide, deren Basensequenz zu den 5' Enden der zu vervielfältigenden Abschnitte der DNA-Einzelstränge komplementär ist. Sie dienen als Startpunkt für den Anbau von Nukleotiden an den DNA-Einzelstrang. Die DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) katalysiert die Verlängerung der „primer“ zu einem komplementären DNA-Strang, wobei die im Puffer gelösten Nukleotide (dNTP) als Substrat dienen. Am Ende eines Zyklus liegen dann zwei DNA-Doppelstränge vor, die im nächsten Zyklus erneut verdoppelt werden. Es kommt somit zu einem exponentiellen Anstieg der Anzahl der DNA-Kopien.

Für das TaqMan-Verfahren werden neben dem „Primerpaar“ zur Amplifikation des Genprodukts zwei für die beiden Allele spezifische DNA-Sonden benötigt. Die DNA-Sonden sind Oligonukleotide mit einer Größe von ca. 20 Basenpaaren, deren Basensequenz komplementär ist zu dem DNA-Abschnitt, der die polymorphe Sequenz beinhaltet. Die Sonden sind mit verschiedenen, fluoreszierenden Farbstoffen markiert, mit einem Reporterfarbstoff am 5' Ende - FAM (6-Carboxyfluorescein) oder VIC (Fluoreszenzfarbstoff der Firma Applied Biosystems, Darmstadt) - sowie mit einem Quencherfarbstoff - TAMRA (6-Carboxytetramethylrhodamin) - am 3' Ende, wobei sich die Reporterfarbstoffe der beiden allelspezifischen Sonden unterscheiden. Die räumliche Nähe des Quencher-Farbstoffs zum Reporter-Farbstoff unterdrückt dessen Fluoreszenz weitgehend. Die während der PCR an einen DNA-Strang hybridisierte komplementäre Sonde wird von der Taq-Polymerase, die eine 5' → 3' Exonuklease-Aktivität aufweist, hydrolysiert. Durch Hydrolyse der angelagerten Sonde kommt es zur räumlichen Trennung von Quencher- und Reporter-Farbstoff, wodurch sich die Fluoreszenzintensität des Reporterfarbstoffs erheblich erhöht.

Die Zuordnung der Einzelproben zu einem Genotyp erfolgte automatisch unter Verwendung der „Gene detection software“ des „ABI Prism 7700 Sequence Detection System“. Durch

Auswertung der allelspezifischen Fluoreszenzsignale erfolgt die Zuordnung zum jeweiligen Genotyp, wobei die Fluoreszenzsignale der beiden homozygoten Genotypen anhand von „Standards“ vorgegeben sind. Ein Anstieg des Fluoreszenzsignals nur eines Farbstoffes ist charakteristisch für die homozygoten Genotypen, ein Anstieg der Fluoreszenzsignale beider Farbstoffe ist kennzeichnend für den heterozygoten Genotyp.

2.9. Bestimmung des 5A6A-Genotyps des Stromelysin-1-Gens mit dem TaqMan-Verfahren

Eine Genotypbestimmung mit dem TaqMan-Verfahren erfordert DNA-Proben für beide homozygote Genotypen (5A5A und 6A6A) als Reaktionsstandards. Zur Identifikation geeigneter Reaktionsstandards wurden zehn willkürlich ausgewählte DNA-Proben durch Gen-Sequenzierung analysiert, mit dem Ziel, Träger der Genotypen 5A5A und 6A6A zu identifizieren. Die Gensequenzierung wurde in einer von der Klinik unabhängigen Einrichtung durchgeführt (GATC GmbH, Konstanz).

Die Nukleotidsequenzen der für das TaqMan-Verfahren verwendeten „primer“ und Sonden wurden mit Hilfe der „Primer-Express Software“ (Applied Biosystems, Darmstadt) festgelegt. Die Basensequenzen der beiden „primer“ sind in Tabelle 1 gezeigt. Mit Hilfe der PCR wurde ein aus 114 bzw. 115 Basenpaaren bestehendes Genprodukt erzeugt, das der den Polymorphismus tragenden Gen-Region des Stromelysin-1-Promotors entspricht (Nukleotidposition 1127 - 1240 nach der Nummerierung von Quinones et al.). Die für das 5A-Allel spezifische Sonde war am 5' Ende mit dem Reporter-Farbstoff FAM (6-Carboxyfluorescein) markiert, die für das 6A-Allel spezifische Sonde war mit dem Reporter-Farbstoff VIC (Fluoreszenzfarbstoff der Firma Applied Biosystems, die chemische Struktur ist nicht publiziert) markiert. Die Basensequenzen der für das 5A-Allel und 6A-Allel

spezifischen Sonden, entsprechend der komplementären Basensequenz der Promotor-Region des Stromelysin1-Genes, sind in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1: Sequenzen der „primer“ und Sonden für die Amplifikation und Markierung der polymorphen Sequenz (Nukleotidposition 1127 - 1240) des Stromelysin-1-Gens

Basensequenz	
„Primer“:	
„Forward-primer“	5`-GGCACCTGGCCTAAAGACATT-3`
„Reverse-primer“	5`-GTGGCCAAATATTTCCCTGTATTT-3`
Sonden:	
Sonde für das 5A-Allel	5`-FAM-AAGACATGG <u>TTTTT</u> CCCCCATCAAA-3`
Sonde für das 6A-Allel	5`-VIC-AAGACATGG <u>TTTTT</u> CCCCCATCAA-3`

Die unterstrichenen Abschnitte sind komplementär zum 5A- bzw. 6A-Sequenzmotiv

Für den TaqMan Assay wurde ein Reaktionsansatz, bestehend aus zweifach Universal Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt), 300nM „forward-primer“, 300nM „reverse-primer“, 200nM Sonde für das 5A-Allel (FAM) und 200nM Sonde für das 6A-Allel (VIC) verwendet. Von diesem Reaktionsmix wurden je 20µl in jede Vertiefung einer Mikrotiterplatte mit 96 Reaktionskammern gegeben, sowie anschließend 2µl der DNA-Probe bzw. Wasser im Falle der Negativ-Kontrollen. Die Belegung der 96-Lochplatte war dabei folgende: Acht Negativ-Kontrollen mit Wasser statt DNA, acht „Standards“ mit Genotyp 5A5A, acht „Standards“ mit Genotyp 6A6A, 72 DNA-Proben von Patienten mit unbekanntem Genotyp. Die PCR erfolgte mit 40 Zyklen jeweils bestehend aus Denaturierung (15 Sekunden bei 95°C) sowie Anlagerung und Verlängerung der „primer“ (eine Minute bei 62°C). Als Thermocycler wurden Geräte des Typs „GeneAmp PCR System 9600“ oder „GeneAmp PCR System 9700“

(Applied Biosystems, Darmstadt) verwendet. Nach Abschluss der PCR erfolgte die Analyse der Ergebnisse mit dem „ABI Prism 7700 Sequence Detection System“ (Applied Biosystems, Darmstadt).

Zur Kontrolle der Ergebnisse der Genotypisierung wurde bei 20% der untersuchten Patienten eine unabhängige zweite Bestimmung des Genotyps durchgeführt, wobei DNA-Proben verwendet wurden, die getrennt von den in der ersten Bestimmung verwendeten DNA-Proben isoliert wurden. Die Genotypisierung wurde ohne Kenntnis der angiographischen und klinischen Daten der Patienten durchgeführt.

2.10. Statistik

Diskrete Variablen wurden als Zahl oder Prozentanteil angegeben und mittels „Chi-Quadrat-Test“ oder „Fisher exact test“ verglichen. Kontinuierliche Variablen wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben und mittels dem nicht gepaarten zweiseitigen t-Test oder mittels Varianzanalyse für mehr als zwei Gruppen verglichen. Die Größe der Studienpopulation wurde so gewählt, dass die Analyse eine „power“ von mindestens 80% erreicht, wobei die folgenden Annahmen zugrunde gelegt wurden: Der Anteil der Patienten mit 6A6A-Genotyp beträgt 25%, die Restenoserate bei allen Patienten beträgt 30%, die Restenoserate bei den Patienten mit dem Risikogenotyp 6A6A liegt 20% höher als bei Trägern des 5A-Allels (die Restenoseraten wurden auf 35% vs. 29% geschätzt). Um einen Wert des Fehlers α von 0,05 zu erhalten, wurden 2500 Patienten mit kompletten Daten (inklusive Rekoronarangiographie) benötigt. Bei einer erwarteten Rekoronarangiographie-Rate von 75-80% der Patienten, wurden daher 3333 Patienten in die Studie eingeschlossen.

Um feststellen zu können, ob eine Assoziation zwischen dem Stromelysin-1-5A6A-Polymorphismus und der angiographisch definierten Restenoserate nach perkutaner Koronarintervention unabhängig von anderen Faktoren bestand, wurde eine multivariate

Analyse mit Berücksichtigung der folgenden möglichen beeinflussenden Faktoren durchgeführt: Alter, Geschlecht, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, aktives Rauchen, Hypercholesterinämie, akuter Myokardinfarkt, instabile angina pectoris, Myokardinfarkt in der Vorgeschichte, koronare Bypassoperation in der Vorgeschichte, Mehrgefäßerkrankung, linksventrikuläre Ejektionsfraktion, betroffenes Herzkranzgefäß, Komplexität der Läsion, restenotische Läsion, chronischer Gefäßverschluss, Referenzdurchmesser, Länge der Läsion, Durchmesser der Stenose vor Intervention und Art der Intervention (Ballondilatation oder Stentimplantation). In der Subgruppenanalyse der Patienten, die eine Stentimplantation erhielten, wurde zusätzlich der Stent-Typ als möglicher Störfaktor in die multivariate Analyse mit einbezogen. Anhand der multivariaten Analyse wurde die Odds ratio und das 95% Konfidenzintervall berechnet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm S-Plus (Mathsoft Inc, Seattle, Washington USA). Ein P-Wert von $<0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

2.11. Geräte und Materialien

Geräte

PCR-Thermocycler:

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

Zentrifugen:

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

Mixer:

Vortexer	Genio2 Bender & Obein AGV, Zürich, Schweiz
----------	--

Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

DNA-Isolierung:

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

PCR-Reaktionslösung:

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

PCR-Gefäße:

MicroAMP Optical 96-Well Reaction Plate Applied Biosystems

„Primer“ und Sonden für das TaqMan-Verfahren wurden von Applied Biosystems synthetisiert.

3. Ergebnisse

3.1. Patientencharakteristika

Bei den 3333 untersuchten Patienten zeigte sich folgende Genotypverteilung des Stromelysin-1-5A/6A-Polymorphismus: Der 5A5A-Genotyp wurde bei 801 Patienten (24,0%) nachgewiesen, der 5A6A-Genotyp bei 1667 (50,0%) und der 6A6A-Genotyp bei 865 Patienten (26,0%). Die 5A-Allelfrequenz beträgt somit 0,49, die 6A-Allelfrequenz 0,51. Diese Genotypverteilung entspricht dem Hardy-Weinberg-Gesetz ($P=0,97$).

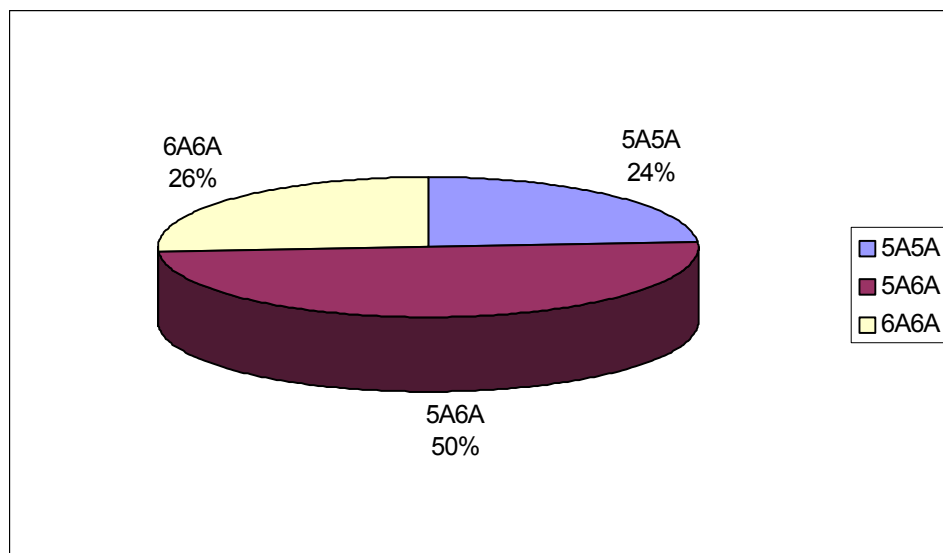


Abbildung 4: Genotypverteilung des Stromelysin-1-5A/6A-Polymorphismus in der untersuchten Patientenpopulation (n = 3333)

Bezüglich der klinischen Charakteristika der Patienten wiesen die unterschiedlichen Genotypgruppen (5A5A, 5A6A und 6A6A) keine signifikanten Unterschiede auf. Die Daten sind in Tabelle 2 aufgeführt. Das mittlere Alter der Patienten ($65,11 \pm 11,0$ für 5A5A, $65,3 \pm 11,1$ für 5A6A und $64,8 \pm 11,6$ für 6A6A; $P = 0,39$), der Anteil an Frauen (27,0% für 5A5A, 24,8% für 5A6A und 25,3% für 6A6A; $P = 0,52$), an Patienten mit arterieller Hypertonie (76,8% für 5A5A, 75,8% für 5A6A und 73,3% für 6A6A; $P = 0,22$), der Anteil an Patienten mit Diabetes mellitus (20,1% für 5A5A, 22,2% für 5A6A und 21,7% für 6A6A; $P = 0,49$), an

Patienten mit Hypercholesterinämie (69,8% für 5A5A, 72,8% für 5A6A und 72,0% für 6A6A; $P = 0,30$) sowie der Anteil an aktiven Rauchern (24,7% für 5A5A, 21,7% für 5A6A und 23,9% für 6A6A; $P = 0,19$) war zwischen den drei Genotypgruppen gleich verteilt. Auch bezüglich kardialer Vorerkrankungen waren zwischen den drei Genotypgruppen keine signifikanten Unterschiede nachweisbar. Der Anteil an Patienten mit einem Myokardinfarkt in der Vorgeschichte betrug 28,6% bei Patienten mit dem 5A5A-Genotyp, 28,4% bei Patienten mit dem 5A6A-Genotyp und 30,5% bei Patienten mit dem 6A6A-Genotyp ($P = 0,52$), der Anteil an Patienten mit durchgemachter koronarer Bypassoperation lag bei 12,0% für Patienten mit dem 5A5A-Genotyp, 11,5% für Patienten mit dem 5A6A-Genotyp und 12,4% für Patienten mit dem 6A6A-Genotyp ($P = 0,79$). Die Häufigkeit einer akut aufgetretenen kardialen Erkrankung zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Klinik war zwischen den drei Genotypgruppen ebenfalls gleich verteilt. Die Häufigkeit einer instabilen angina pectoris betrug 31,7% bei Patienten mit dem 5A5A-Genotyp, 31,4% bei Patienten mit dem 5A6A-Genotyp und 32,5% bei Patienten mit dem 6A6A-Genotyp ($P = 0,85$), einen akuten Myokardinfarkt hatten 23,3% der Patienten mit dem 5A5A-Genotyp, 22,8% der Patienten mit dem 5A6A-Genotyp und 20,2% der Patienten mit dem 6A6A-Genotyp ($P = 0,24$).

Tabelle 2: Klinische Charakteristika der Patienten

	5A5A	5A6A	6A6A	P
	(n=801)	(n=1667)	(n=865)	
Mittleres Alter (Jahre)	65,6±11,0	65,3±11,1	64,8±11,6	0,39
Frauen	216 (27,0)	414 (24,8)	219 (25,3)	0,52
Arterielle Hypertonie	615 (76,8)	1263 (75,8)	634 (73,3)	0,22
Diabetes mellitus	161 (20,1)	370 (22,2)	188 (21,7)	0,49
Aktive Raucher	198 (24,7)	362 (21,7)	207 (23,9)	0,19
Hypercholesterinämie	559 (69,8)	1213 (72,8)	623 (72,0)	0,30
Akuter Myokardinfarkt	187 (23,3)	380 (22,8)	175 (20,2)	0,24
Instabile angina pectoris	254 (31,7)	523 (31,4)	281 (32,5)	0,85
Myokardinfarkt in der Vorgeschichte	229 (28,6)	474 (28,4)	264 (30,5)	0,52
Bypassoperation in der Vorgeschichte	96 (12,0)	191 (11,5)	107 (12,4)	0,79
Linksventrikuläre Ejektionsfraktion (%)	56,0±14,3	56,4±14,7	56,5±14,5	0,82

Die Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung oder Anzahl (Prozent) der Patienten angegeben.

3.2. Eigenschaften der Koronarläsionen und Beschreibung der

Intervention

Bezüglich der koronarangiographischen Befunde zum Zeitpunkt der Intervention waren zwischen den Genotypgruppen keine signifikanten Unterschiede nachweisbar. Die Daten sind in Tabelle 3 dargestellt. Der Schweregrad der koronaren Herzerkrankung, gemessen am Vorliegen einer Ein-, Zwei- oder Dreifäßerkrankung, unterschied sich zwischen den drei Genotypgruppen nicht signifikant ($P = 0,54$). Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion lag in allen Gruppen im Mittel im Normbereich ($56,0\% \pm 14,3\%$ für 5A5A, $56,4\% \pm 14,7\%$ für

5A6A und $56,5\% \pm 14,5\%$ für 6A6A; $P = 0,82$). Die Verteilung der Zielgefäße (LAD: left anterior descendens, LCX: left circumflex, RCA: right coronary artery) wies ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypgruppen auf ($P = 0,92$). Der Anteil komplexer Läsionen betrug $79,0\%$ für 5A5A, $79,7\%$ für 5A6A und $78,7\%$ für 6A6A ($P = 0,84$). Bei $5,7\%$ der Patienten mit dem 5A5A-Genotyp, bei $5,8\%$ der Patienten mit dem 5A6A-Genotyp sowie bei $5,9\%$ der Patienten mit dem 6A6A-Genotyp wurde eine Restenose eines bereits zuvor mit Stentimplantation oder Ballondilatation behandelten Gefäßes interveniert ($P = 0,99$). Bei $7,1\%$ der Patienten mit dem 5A5A-Genotyp, $6,4\%$ der Patienten mit dem 5A6A-Genotyp und bei $7,2\%$ der Patienten mit dem 6A6A-Genotyp erfolgte die Rekanalisation einer chronischen Gefäßokklusion ($P = 0,71$).

Die Länge der zu behandelnden Gefäßläsion wies zwischen den drei Genotypgruppen keine wesentlichen Unterschiede auf ($13,9\text{mm} \pm 8,4\text{mm}$ für 5A5A, $13,4\text{mm} \pm 7,6\text{mm}$ für 5A6A und $14,0\text{mm} \pm 7,7\text{mm}$ für 6A6A; $P = 0,17$). Der Minimale Gefäßdurchmesser ($0,70\text{mm} \pm 0,59\text{mm}$ für 5A5A, $0,70\text{mm} \pm 0,59\text{mm}$ für 5A6A und $0,69\text{mm} \pm 0,56\text{mm}$ für 6A6A; $P = 0,93$), der Referenz-Gefäßdurchmesser, ($2,94\text{mm} \pm 0,56\text{mm}$ für 5A5A, $2,94\text{mm} \pm 0,57\text{mm}$ für 5A6A und $2,94\text{mm} \pm 0,54\text{mm}$ für 6A6A; $P = 0,97$), sowie der Durchmesser Stenose ($76,3\% \pm 19,0\%$ für 5A5A, $76,1\% \pm 19,3\%$ für 5A6A und $76,3\% \pm 18,4\%$ für 6A6A; $P = 0,95$) waren zwischen den drei Gruppen ebenfalls ohne signifikanten Unterschied.

Tabelle 3: Läsionsbezogene Charakteristika

	5A5A (n=801)	5A6A (n=1667)	6A6A (n=865)	P
Anzahl der stenosierten Gefäße				0,54
1	227 (28,3)	477 (28,6)	240 (27,7)	
2	263 (32,8)	495 (29,7)	276 (31,9)	
3	301 (37,6)	674 (40,4)	341 (39,4)	
Linksventrikuläre Ejektionsfraktion (%)	56,0±14,3	56,4±14,7	56,5±14,5	0,82
Zielgefäß				0,92
Hauptstamm	14 (1,7)	22 (1,3)	16 (1,8)	
LAD	334 (41,7)	714 (42,8)	370 (42,8)	
LCx	178 (22,2)	339 (20,3)	181 (20,9)	
RCA	232 (29,0)	508 (30,5)	258 (29,8)	
Venen-Bypass	43 (5,4)	84 (5,0)	40 (4,6)	
ACC/AHA Klassifikation				0,46
A	13 (1,6)	37 (2,2)	28 (3,2)	
B1	155 (19,4)	302 (18,1)	156 (18,0)	
B2	436 (54,4)	925 (55,5)	468 (54,1)	
C	197 (24,6)	403 (24,2)	213 (24,6)	
Komplexe Läsion	633 (79,0)	1328 (79,7)	681 (78,7)	0,84
Restenotische Läsion	46 (5,7)	96 (5,8)	51 (5,9)	0,99
Chronischer Verschluss	57 (7,1)	107 (6,4)	62 (7,2)	0,71
Referenzdurchmesser (mm)	2,94±0,56	2,94±0,57	2,94±0,54	0,97
Länge der Läsion (mm)	13,9±8,4	13,4±7,6	14,0±7,7	0,17
Minimaler Gefäßdurchmesser (mm)	0,70±0,59	0,70±0,59	0,69±0,56	0,93
Durchmesser Stenose (%)	76,3±19,0	76,1±19,3	76,3±18,4	0,95

Die Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung oder Anzahl (Prozent) der Patienten angegeben. LAD (left anterior descendens), LCX (left circumflex), RCA (right coronary artery), ACC (American College of Cardiology), AHA (American Heart Association).

Die wesentlichen Daten zur interventionellen Behandlung der Patienten sind in Tabelle 4 dargestellt. Zwischen den verschiedenen Genotypgruppen bestanden keine Unterschiede in der Art und Durchführung der Koronarintervention. Der Anteil an Stentimplantationen betrug 85,3% bei Patienten mit dem 5A5A-Genotyp, 85,9% bei Patienten mit dem 5A6A-Genotyp und 85,8% bei Patienten mit dem 6A6A-Genotyp ($P = 0,99$). Der Anteil an alleiniger Ballondilatation lag somit bei 14,7% bei Patienten mit dem 5A5A-Genotyp, bei 14,1% bei Patienten mit dem 5A6A-Genotyp und bei 14,2% bei Patienten mit dem 6A6A-Genotyp ($P = 0,93$). Der gemessene maximale Ballondurchmesser ($3,26\text{mm} \pm 0,62\text{mm}$ für 5A5A, $3,27\text{mm} \pm 0,59\text{mm}$ für 5A6A und $3,31\text{mm} \pm 0,55\text{mm}$ für 6A6A; $P = 0,29$) sowie der maximale angewandte Druck während der Intervention ($12,8\text{atm} \pm 2,7\text{atm}$ für 5A5A, $12,8\text{atm} \pm 2,7\text{atm}$ für 5A6A und $12,8\text{atm} \pm 2,8\text{atm}$ für 6A6A; $P = 0,86$) waren ebenfalls gleich. Auch in der Häufigkeit einer begleitenden periprozeduralen antithrombozytären Therapie mit dem Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten Abciximab gab es zwischen den drei Gruppen keine signifikanten Unterschiede (24,5% für 5A5A, 23,2% für 5A6A und 22,4% für 6A6A; $P = 0,61$). Der unmittelbare Behandlungserfolg war in den drei Genotypgruppen identisch: Der Durchmesser Stenose am Ende der Intervention betrug $7,9\% \pm 14,2\%$ bei Patienten mit dem 5A5A-Genotyp, $8,1\% \pm 13,7\%$ bei Patienten mit dem 5A6A-Genotyp und $7,7\% \pm 14,3\%$ bei Patienten mit dem 6A6A-Genotyp ($P = 0,82$).

Tabelle 4: Angaben zur Intervention (Ballondilatation oder Stentimplantation)

	5A5A (n=801)	5A6A (n=1667)	6A6A (n=865)	P
Art der Koronarintervention				
Stentimplantation	683 (85,3)	1432 (85,9)	742 (85,8)	0,99
Ballondilatation	118 (14,7)	235 (14,1)	123 (14,2)	0,93
Ballondurchmesser (mm)	3,26±0,62	3,27±0,59	3,31±0,55	0,29
Maximal Ballondruck (atm)	12,8±2,7	12,8±2,7	12,8±2,8	0,86
Periprozedurale Abciximabtherapie	196 (24,5)	386 (23,2)	194 (22,4)	0,61
Durchmesser Stenose (%) (unmittelbar nach Intervention)	7,9±14,2	8,1±13,7	7,7±14,3	0,82

Die Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung oder Anzahl (Prozent) der Patienten angegeben.

3.3. Angiographische Ergebnisse nach sechs Monaten

Von den insgesamt 3333 eingeschlossenen Patienten wurde bei 2667 Patienten (80,0%) sechs Monate nach Koronarintervention (Ballondilatation oder Stentimplantation) eine Kontroll-Koronarangiographie durchgeführt. Die Ergebnisse der Kontroll-Koronarangiographie sind in Tabelle 5 aufgeführt. Die Häufigkeit einer angiographisch diagnostizierten Restenose unterschied sich zwischen den drei Genotypgruppen nicht signifikant (28,1% für 5A5A, 27,8% für 5A6A und 29,5% für 6A6A; P = 0,71). Auch bezüglich der kontinuierlichen Messgrößen minimaler Gefäßdurchmesser (1,80mm ± 0,87mm für 5A5A, 1,76mm ± 0,86mm für 5A6A und 1,73mm ± 0,88mm für 6A6A; P = 0,33), Durchmesser Stenose (38,6% ± 25,6% für 5A5A, 39,6% ± 25,1% für 5A6A und 40,5% ± 26,0% für 6A6A; P = 0,38) und

Lumenverlust ($1,02\text{mm} \pm 0,77\text{mm}$ für 5A5A, $1,05\text{mm} \pm 0,76\text{mm}$ für 5A6A und $1,06\text{mm} \pm 0,78\text{mm}$ für 6A6A; $P = 0,52$) waren keine wesentlichen Unterschiede nachweisbar.

Tabelle 5: Angiographische Ergebnisse nach sechs Monaten

	5A5A (n=633)	5A6A (n=1347)	6A6A (n=687)	P
Minimaler Gefäßdurchmesser (mm)	$1,80 \pm 0,87$	$1,76 \pm 0,86$	$1,73 \pm 0,88$	0,33
Verlustindex (mm)	$1,02 \pm 0,77$	$1,05 \pm 0,76$	$1,06 \pm 0,78$	0,52
Durchmesser Stenose (%)	$38,6 \pm 25,6$	$39,6 \pm 25,1$	$40,5 \pm 26,0$	0,38
Angiographische Restenose	178 (28,1)	375 (27,8)	203 (29,5)	0,71

Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung oder Anzahl (Prozent) der Patienten angegeben.

Um feststellen zu können, ob eine Assoziation zwischen dem 5A6A-Polymorphismus im Stromelysin-1-Gen und der angiographisch definierten Restenoserate nach perkutaner Koronarintervention unabhängig von anderen Faktoren bestand, wurde eine multivariate Analyse mit Berücksichtigung der folgenden möglichen beeinflussenden Faktoren durchgeführt: Alter, Geschlecht, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, aktives Rauchen, akuter Myokardinfarkt, instabile angina pectoris, Myokardinfarkt in der Vorgeschichte, vorausgegangene koronare Bypassoperation, Mehrgefäßerkrankung, linksventrikuläre Ejektionsfraktion, Zielgefäß der Intervention, Komplexität der Koronarläsion, Intervention einer Restenose, Intervention eines chronischen Gefäßverschlusses, Referenzdurchmesser, Durchmesser der Stenose, Länge der Koronarläsion sowie Art der Intervention (Ballondilatation oder Stentimplantation). Jedoch zeigte sich auch nach Untersuchung auf mögliche beeinflussende Faktoren mittels multivariater Analyse kein

signifikanter Unterschied in der Restenosehäufigkeit zwischen den drei Genotypgruppen ($P = 0,29$; OR = 1,05 (95% CI 0,80-1,38)).

3.4. Klinischer Verlauf innerhalb der ersten zwölf Monate nach

Koronarintervention

Vollständige Daten zum langfristigen klinischen Verlauf innerhalb der ersten zwölf Monate nach Koronarintervention (Ballondilatation oder Stentimplantation) waren für alle eingeschlossenen 3333 Patienten verfügbar, unabhängig vom Vorliegen einer Kontroll-Koronarangiographie. Die Daten sind in Tabelle 6 aufgeführt. Zwischen den verschiedenen Genotypgruppen zeigte sich kein Unterschied in der Häufigkeit einer erneuten Revaskularisation aufgrund von angina pectoris-Symptomatik oder anderen klinischen Ischämiezeichen. Eine nochmalige Ballondilatation wurde bei 13,6% der Patienten mit dem 5A5A-Genotyp, bei 12,2% der Patienten mit dem 5A6A-Genotyp und bei 13,5% der Patienten mit dem 6A6A-Genotyp durchgeführt ($P = 0,58$), eine Bypassoperation wurde bei 2,2% der Patienten mit dem 5A5A-Genotyp, bei 1,9% der Patienten mit dem 5A6A-Genotyp und bei 2,2% der Patienten mit dem 6A6A-Genotyp durchgeführt ($P = 0,83$). Ereignisse wie Tod oder ein akuter Myokardinfarkt traten während des Beobachtungszeitraumes bei 11,7% der Patienten mit dem 5A5A-Genotyp, bei 10,0% der Patienten mit dem 5A6A-Genotyp und bei 9,4% der Patienten mit dem 6A6A-Genotyp auf ($P = 0,24$).

Tabelle 6: Klinischer Verlauf zwölf Monate nach Koronarintervention

	5A5A (n=801)	5A6A (n=1667)	6A6A (n=865)	P
Tod oder Myokardinfarkt	94 (11,7)	166 (10,0)	81 (9,4)	0,24
Erneute Revaskularisation	126 (15,7)	230 (13,8)	134 (15,5)	0,44
Ballondilatation	109 (13,6)	203 (12,2)	117 (13,5)	0,58
Koronare Bypassoperation	18 (2,2)	32 (1,9)	19 (2,2)	0,83

Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung oder Anzahl (Prozent) der Patienten angegeben.

3.5. Untergruppenanalyse

Der Restenoseentwicklung nach Ballondilatation und Stentimplantation liegen unterschiedliche Mechanismen zugrunde. Während „vascular remodeling“ einen wichtigen Faktor für die Entwicklung einer Restenose nach Ballondilatation ohne nachfolgende Stentimplantation darstellt, ist die Entwicklung einer Neointima der hauptsächliche Mechanismus einer Restenoseentwicklung nach Stentimplantation (19, 24, 39). Wir untersuchten einen möglichen Zusammenhang zwischen dem 5A6A-Polymorphismus des Stromelysin-1-Gens und den angiographischen und klinischen Ergebnissen nach Koronarintervention in Abhängigkeit von der Interventionsart - Ballondilatation oder Stentimplantation. Bei 2857 der eingeschlossenen 3333 Patienten wurde eine Stentimplantation durchgeführt, bei 476 eine Ballondilatation ohne anschließende Stentimplantation. Die Verteilung der Genotypen innerhalb der Untergruppen war vergleichbar: In der Gruppe der Patienten, die mit Stentimplantation behandelt worden waren, betrug die Häufigkeit des 5A5A-Genotyps 23,9%, die des 5A6A-Genotyps 50,1% und die des

6A6A-Genotyps 26,0%. In der Gruppe der mit Ballondilatation behandelten Patienten betrug die Häufigkeit des 5A5A-Genotyps 24,8%, die des 5A6A-Genotyps 49,4% und die des 6A6A-Genotyps 25,8%. Die Genotypverteilung entsprach in beiden Gruppen dem Hardy-Weinberg-Gesetz ($P = 0,79$). Eine Kontroll-Koronarangiographie sechs Monate nach Koronarintervention wurde bei 2286 der mit Stentimplantation behandelten Patienten (80,0%) sowie bei 381 der mit Ballondilatation behandelten Patienten (80,0%) durchgeführt. Die Ergebnisse der Kontroll-Koronarangiographie sind in Tabelle 7 dargestellt. Die angiographisch ermittelte Restenosehäufigkeit betrug 26,4% in der Gruppe der Patienten mit Stentimplantation und 39,9% in der Gruppe der Patienten mit Ballondilatation ($P = 0,0001$). Innerhalb der Untergruppen zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied der Restenosehäufigkeit in Abhängigkeit vom Genotyp: In der Gruppe der mit Stentimplantation behandelten Patienten betrug die Restenosehäufigkeit 26,6% bei Patienten mit dem 5A5A-Genotyp, 25,9% bei Patienten mit dem 5A6A-Genotyp und 27,3% bei Patienten mit dem 6A6A-Genotyp ($P = 0,81$). In der Gruppe der mit Ballondilatation behandelten Patienten lag die Restenosehäufigkeit bei 37,0% für Patienten mit dem 5A5A-Genotyp, bei 39,9% für Patienten mit dem 5A6A-Genotyp und bei 42,6% für Patienten mit dem 6A6A-Genotyp ($P = 0,73$). Die weiteren angiographischen Parameter minimaler Gefäßdurchmesser, Durchmesser Stenose und Lumenverlust zeigten ebenfalls keine signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypgruppen, weder in der Gruppe der mit Stentimplantation behandelten Patienten noch in der Gruppe der mit Ballondilatation behandelten Patienten. Die multivariate Analyse (mit Einbeziehung der Faktoren Alter, Geschlecht, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, aktives Rauchen, akuter Myokardinfarkt, instabile angina pectoris, Myokardinfarkt in der Vorgeschichte, vorausgegangene koronare Bypassoperation, Mehrgefäßerkrankung, linksventrikuläre Ejektionsfraktion, Zielgefäß der Intervention, Komplexität der Koronarläsion, Intervention einer Restenose, Intervention eines chronischen

Gefäßverschlusses, Referenzdurchmesser, Durchmesser der Stenose, Länge der Koronarläsion und bei Patienten, bei denen eine Stentimplantation durchgeführt worden war, zudem des verwendeten Stent-Typs) zeigte weder in der Gruppe der Patienten mit Stentimplantation (P = 0,84; OR = 1,03 95% CI 0,78-1,36) noch in der Gruppe der Patienten mit Ballondilatation (P = 0,40; OR = 1,31 95% CI 0,70-2,44) eine Assoziation des Stromelysin-1-Genotyps mit der Restenosehäufigkeit nach perkutaner Koronarintervention.

Tabelle 7: Untergruppenanalyse: Ergebnisse der Kontroll-Koronarangiographie

Patienten mit Stentimplantation				
	5A5A (n=541)	5A6A (n=1159)	6A6A (n=586)	P
Minimaler Gefäßdurchmesser (mm)	1,88±0,87	1,82±0,85	1,81±0,88	0,38
Verlustindex (mm)	1,08±0,75	1,11±0,73	1,11±0,77	0,67
Durchmesser Stenose (%)	37,4±24,9	38,3±24,5	38,5±25,6	0,72
Angiographische Restenose	144 (26,6)	300 (25,9)	160 (27,3)	0,81
Patienten mit Ballondilatation				
	5A5A (n=92)	5A6A (n=188)	6A6A (n=101)	P
Minimaler Gefäßdurchmesser (mm)	1,35±0,73	1,34±0,80	1,24±0,70	0,52
Verlustindex (mm)	0,66±0,81	0,66±0,81	0,78±0,74	0,46
Durchmesser Stenose (%)	45,6±28,5	48,0±26,8	52,3±25,1	0,20
Angiographische Restenose	34 (37,0)	75 (39,9)	43 (42,6)	0,73

Die Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung oder Anzahl (Prozent) der Patienten angegeben.

Die Untergruppenanalyse zeigte auch bezüglich des langfristigen klinischen Verlaufs keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypgruppen, weder in der Gruppe der mit Stentimplantation behandelten Patienten noch in der Gruppe der mit Ballondilatation behandelten Patienten. Die Daten sind in Tabelle 8 dargestellt. Die Notwendigkeit einer erneuten Myokard-Revaskularisation mittels Ballondilatation oder koronarer Bypassoperation aufgrund wiederaufgetretener angina pectoris und/oder einem klinischen Ischämienachweis innerhalb des Beobachtungszeitraumes von einem Jahr war sowohl bei den Patienten mit Stentimplantation, als auch bei den Patienten mit Ballondilatation zwischen den einzelnen Genotypgruppen gleich verteilt. In der Gruppe der Patienten mit Stentimplantation betrug die Häufigkeit einer erneuten Ballondilatation 13,6% für Patienten mit dem 5A5A-Genotyp, 12,2% für Patienten mit dem 5A6A-Genotyp und 12,5% für Patienten mit dem 6A6A-Genotyp ($P = 0,70$). Eine koronare Bypassoperation wurde bei 2,3% der Patienten mit dem 5A5A-Genotyp, bei 2,0% der Patienten mit dem 5A6A-Genotyp und bei 1,9% der Patienten mit dem 6A6A-Genotyp durchgeführt ($P = 0,81$). In der Gruppe der Patienten mit Ballondilatation wurde eine erneute Ballondilatation bei 19,5% der Patienten mit dem 5A5A-Genotyp, bei 13,6% der Patienten mit dem 5A6A-Genotyp und bei 12,3% der Patienten mit dem 6A6A-Genotyp durchgeführt ($P = 0,28$). Eine koronare Bypassoperation wurde bei 4,1% der Patienten mit dem 5A5A-Genotyp, bei 1,7% der Patienten mit dem 5A6A-Genotyp und bei 1,7% der Patienten mit dem 6A6A-Genotyp notwendig ($P = 0,34$). Tod und Myokardinfarkt traten sowohl innerhalb der Gruppe der mit Stentimplantation behandelten Patienten, als auch in der Gruppe der mit Ballondilatation behandelten Patienten mit gleicher Häufigkeit in allen Genotypgruppen auf ($P = 0,54$ bzw. $P = 0,15$).

Tabelle 8: Untergruppenanalyse: Klinischer Langzeitverlauf ein Jahr nach Koronarintervention

Patienten mit Stentimplantation				
	A5A (n=683)	5A6A (n=1432)	6A6A (n=742)	P
Tod oder Myokardinfarkt	80 (11,7)	150 (10,5)	74 (10,0)	0,54
Erneute Revaskularisation	108 (15,8)	197 (13,8)	105 (14,2)	0,55
Ballondilatation	93 (13,6)	174 (12,2)	93 (12,5)	0,70
Koronare Bypassoperation	16 (2,3)	28 (2,0)	14 (1,9)	0,81
Patienten mit Ballondilatation				
	5A5A (n=118)	5A6A (n=235)	6A6A (n=123)	P
Tod oder Myokardinfarkt	14 (11,9)	16 (6,8)	7 (5,7)	0,15
Revaskularisation	18 (15,3)	33 (14,0)	29 (23,6)	0,15
Ballondilatation	16 (13,6)	29 (12,3)	24 (19,5)	0,28
Koronare Bypassoperation	2 (1,7)	4 (1,7)	5 (4,1)	0,34

Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung oder Anzahl (Prozent) der Patienten angegeben.

3.6. Einfluss des verwendeten Stent-Typs auf die Restenosehäufigkeit

Für die Stentimplantation wurden Stents verschiedenen Designs (unterschiedliche Anordnung und Dicke der „struts“) verwendet. Es konnte jedoch bezüglich der Genotypverteilung bei den einzelnen Stent-Typen kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 gezeigt.

Tabelle 9: Untergruppenanalyse: Angiographische Restenose in Abhängigkeit vom verwendeten Stent-Typ

	5A5A	5A6A	6A6A	P
ACS RX Multi-Link (n=698)	21,4	22,7	19,6	0,73
Jostent (n=428)	28,1	30,5	35,7	0,46
ACS-Multi-Link RX Duet (n=321)	28,2	25,3	26,7	0,89
Medtronic AVE (n=292)	28,8	23,5	24,7	0,71
BX Velocity (n=278)	31,5	29,8	31,8	0,95
Andere (n=269)	29,9	25,4	31,3	0,63

Die Daten sind als Prozent der Patienten angegeben. ACS RX Multi-Link (Guidant, Advanced Cardiovascular Systems, Santa Clara, California, USA), Jostent (JOMED International AB, Helsingborg, Schweden), ACS Multi-Link RX Duet, Medtronic AVE (Medtronic AVE, Santa Rosa, California, USA), BX Velocity (Cordis Corp., Miami, Florida, USA).

4. Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde eine mögliche Assoziation des 5A/6A-Polymorphismus im Stromelysin-1-Gen mit dem Auftreten einer Restenose und dem klinischen Langzeitverlauf nach perkutaner Koronarintervention untersucht. Dabei zeigte sich, dass der 5A/6A-Polymorphismus keine Assoziation mit der Entwicklung einer Restenose nach Koronarintervention aufweist. Dieses Ergebnis war unabhängig von der Art der Behandlung. Weder für Patienten, die mit Ballondilatation behandelt worden waren, noch für Patienten bei denen eine Stentimplantation erfolgt war, ließ sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang nachweisen. Auch bezüglich des klinischen Langzeitverlaufs nach perkutaner Koronarintervention konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang mit dem 5A/6A-Polymorphismus nachgewiesen werden.

4.1. Kardiovaskuläre Bedeutung des 5A/6A-Polymorphismus im Stromelysin-1-Gen

Untersuchungen von atherosklerotischen Plaques aus menschlichen Koronararterien zeigten eine gegenüber der normalen Gefäßwand vermehrte Expression des Stromelysin-1-Gens in glatten Gefäßmuskelzellen und Makrophagen (23). Zudem wurde für den 5A/6A-Polymorphismus im Promotor des Stromelysin-1-Gens gezeigt, dass der Promotor mit dem 5A-Sequenzmotiv eine höhere transkriptionelle Aktivität aufweist als der Promotor mit dem 6A-Sequenzmotiv. Eine mögliche Erklärung hierfür liegt in der bevorzugte Bindung eines Transkriptions-Repressor-Proteins an den Promotor mit einer Basenfolge von 6 Adenosin-Basen (72). Daraus entstand die Überlegung, dass Träger des 6A-Allels eine geringere Menge von Stromelysin-1 und somit eine geringere proteolytische Aktivität in der Arterienwand aufweisen, was zu einer Anhäufung von extrazellulärer Matrix in atherosklerotischen Läsionen und zu einem schnelleren Fortschreiten von Koronarstenosen führen könnte.

Richardson et al. zeigten in einer Studie mit 72 an koronarer Herzerkrankung leidenden Patienten, dass homozygote Träger des 6A-Allels ein rascheres Fortschreiten der koronaren Herzerkrankung innerhalb des Beobachtungszeitraumes von drei Jahren aufwiesen, als die Träger mindestens eines 5A-Allels (51). In einer Analyse des „lipid coronary angiography trial“ (LOCAT), in der 395 männliche Patienten nach koronarer Bypassoperation für insgesamt 32 Monate mit dem Lipidsenker Gemfibrozil oder Placebo behandelt wurden, fiel bei Trägern des 6A-Allels in der Placebo-Gruppe ebenfalls ein rascheres Fortschreiten der koronaren Herzerkrankung auf als bei homozygoten Trägern des 5A-Allels (26). Schwarz et al. zeigten eine statistisch signifikante Assoziation des 6A-Allels mit dem Schweregrad der koronaren Herzerkrankung (Schweregrad der koronaren Herzerkrankung nach Gensini-Score) in einer Fallkontrollstudie, in der 1848 Patienten mit entweder bereits bekannter koronarer Herzerkrankung oder Symptomen einer koronaren Herzerkrankungen angiographisch untersucht wurden und 515 gesunde männliche Probanden als Kontrollgruppe dienten. Ein Zusammenhang des 5A/6A-Polymorphismus im Stromelysin-1-Gen mit dem Ausmaß der koronaren Herzerkrankung, gemessen an der Zahl der betroffenen Gefäße, konnte in derselben Studie jedoch nicht nachgewiesen werden (58). Dagegen beschreiben Beyzade et al. in einer erst kürzlich erschienenen Arbeit mit 1200 angiographisch untersuchten kaukasischen Patienten einen Zusammenhang des Stromelysin-1-5A/6A-Polymorphismus mit dem Schweregrad einer koronaren Herzerkrankung. Homozygote Träger des 6A-Allels wiesen - gemessen an der Anzahl der betroffenen Koronargefäße – schwerere Koronarveränderungen auf als Träger des 5A-Allels (OR = 1,52; P = 0,08) (2).

Eine Komplikation der koronaren Herzerkrankung ist das Auftreten eines akuten Koronarsyndroms. Durch die Ruptur eines atherosklerotischen Plaques kommt es zur Freilegung der thrombogenen subendothelialen Strukturen mit nachfolgender Thrombusbildung und subtotalem oder komplettem Verschluss des Koronargefäßes (7, 41).

Dabei wird Stromelysin-1 aufgrund seiner proteolytischen Aktivität und damit der Fähigkeit eine bislang intakte fibröse Kappe eines atherosklerotischen Plaques aufzubrechen, eine große Bedeutung zugeschrieben (14). Daher wurden zahlreiche Untersuchungen zum Einfluss des Stromelysin-1-5A/6A-Polymorphismus auf das Risiko des Auftretens von akuten Myokardinfarkten durchgeführt. Terashima et al. zeigten in einer Fall-Kontroll-Studie mit 330 japanischen Patienten, die einen akuten Myokardinfarkt erlitten hatten, und 330 Kontroll-Personen, dass sich in der Gruppe der Infarktpatienten signifikant mehr Träger des 5A-Allels fanden als in der Kontrollgruppe (48,8% vs. 32,7%; $P = 0,0001$) (67). Übereinstimmende Ergebnisse erzielten auch Beyzade et al. in einem Patientenkollektiv von 1200 kaukasischen Patienten: Träger des 5A-Allels hatten gegenüber für das 6A-Allel homozygoten Individuen ein höheres Myokardinfarkt-Risiko ($OR = 2,02$; $P = 0,032$) (2). Dagegen beschrieben Schwarz et al. zwar einen Einfluss des Stromelysin-1-5A/6A-Polymorphismus auf den Schweregrad der koronaren Herzerkrankung (siehe oben), die Häufigkeit eines akuten Myokardinfarktes war jedoch in den drei verschiedenen Genotypgruppen gleich verteilt: Die Allelfrequenz des 5A-Allels betrug 0,53 (0,51-0,55) in der Gruppe der Patienten ohne Myokardinfarkt und 0,48 (0,46-0,50) in der Gruppe der Patienten mit akutem Myokardinfarkt (0,50-0,55) (58).

4.2. Bedeutung des 5A/6A-Polymorphismus im Stromelysin-1-Gen bei der Entwicklung einer Restenose

Im Zusammenhang mit dem bislang noch ungelösten Problem der Restenose nach perkutaner transluminaler Koronarintervention wurden zahlreiche Untersuchungen durchgeführt, die die Bedeutung der Matrixmetalloproteinasen auf den Prozess der Restenoseentwicklung klären sollten. Während „vascular remodeling“ einen wichtigen Faktor für die Ausbildung einer Restenose nach alleiniger Ballondilatation darstellt, ist die Entwicklung einer Neointima der

hauptsächliche Mechanismus der Entstehung einer Restenose nach koronarer Stentimplantation (19, 24, 39). Matrixmetalloproteinasen sind dabei am Umbau der extrazellulären Matrix beteiligt (6, 47). Mit Hilfe von Genexpressionsstudien in Zellkultur wurde eine geringere transkriptionelle Aktivität des Promotors mit dem 6A-Sequenzmotiv gegenüber dem Promotor mit dem 5A-Sequenzmotiv nachgewiesen (72). Humphries et al. zeigten in einer Studie mit 485 Patienten mit koronarer Herzerkrankung, von denen 198 mit Stentimplantation und 287 mit Ballondilatation behandelt worden waren, dass homozygote Träger des 6A-Allels ein höheres Risiko einer Restenoseentwicklung nach Ballondilatation, nicht jedoch nach Stentimplantation aufweisen: In der Gruppe der 287 Patienten, die mit Ballondilatation behandelt worden waren, beobachteten Humphries et al. zum Zeitpunkt der Kontrollangiographie einen signifikant höheren Lumenverlust ($P = 0,012$) sowie eine signifikant größeren Durchmesser der Stenose ($P = 0,012$) bei den Patienten mit dem 6A6A-Genotyp im Vergleich zu den Patienten mit dem 5A6A-Genotyp oder dem 5A5A-Genotyp. Die angiographische Restenoserate (Durchmesser der Stenose $\geq 50\%$) lag bei homozygoten Trägern des 6A-Allels ebenfalls höher als bei Patienten mit dem 5A6A-Genotyp oder dem 5A5A-Genotyp, die Unterschiede erreichten jedoch keine statistische Signifikanz. In der Gruppe der 198 Patienten, die durch Stentimplantation behandelt wurden, konnte kein Zusammenhang des 5A/6A-Polymorphismus mit den angiographischen Ergebnissen zum Zeitpunkt der Kontrollangiographie nachgewiesen werden (25). Die von Humphries et al. berichteten Ergebnisse stehen damit zum Teil im Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit: Während die Ergebnisse – eine fehlende Assoziation des Stromelysin-1-5A/6A-Polymorphismus mit der Entwicklung einer Restenose nach Koronarintervention – in der Gruppe der mit Stentimplantation behandelten Patienten übereinstimmen, widersprechen sich die Beobachtungen bei Patienten, die durch Ballondilatation behandelt worden waren.

Bei den 2667 Patienten der vorliegenden Studie, bei denen eine Kontroll-Koronarangiographie sechs Monate nach Koronarintervention durchgeführt worden war, unterschied sich die Häufigkeit einer angiographisch diagnostizierten Restenose zwischen den drei Genotypgruppen nicht signifikant (28,1% bei Patienten mit dem 5A5A-Genotyp, 27,8% bei Patienten mit dem 5A6A-Genotyp und 29,5% bei Patienten mit dem 6A6A-Genotyp; $P = 0,71$). Auch bezüglich der kontinuierlichen Messgrößen wie minimaler Gefäßdurchmesser ($P = 0,33$), Durchmesser Stenose ($P = 0,38$) und Lumenverlust ($P = 0,52$) waren keine wesentlichen Unterschiede nachweisbar. Eine getrennte Analyse der Patienten, nach Art des Behandlungsverfahrens - Ballondilatation oder Stentimplantation - ergab ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang des 5A/6A-Polymorphismus mit der Restenosehäufigkeit nach Koronarintervention: In der Gruppe der 2857 Patienten, die mit Stentimplantation behandelt worden waren, betrug die Restenosehäufigkeit 26,6% bei Patienten mit dem 5A5A-Genotyp, 25,9% bei Patienten mit dem 5A6A-Genotyp und 27,3% bei Patienten mit dem 6A6A-Genotyp ($P = 0,81$). In der Gruppe der 75 Patienten, die mit Ballondilatation behandelt worden waren, lag die Restenosehäufigkeit bei 37,0% bei Patienten mit dem 5A5A-Genotyp, bei 39,9% bei Patienten mit dem 5A6A-Genotyp und bei 42,6% bei Patienten mit dem 6A6A-Genotyp ($P = 0,73$). Die weiteren angiographischen Parameter wie minimaler Gefäßdurchmesser, Durchmesser Stenose und Lumenverlust zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypgruppen, weder in der Gruppe der mit Stentimplantation behandelten Patienten noch in der Gruppe der mit Ballondilatation behandelten Patienten.

4.3. Vergleich der Ergebnissen der vorliegenden Studie mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen

Die Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse in der vorliegenden Studie, verglichen mit den Beobachtungen von Humphries et al. ist nicht schlüssig erklärbar. Eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse, besteht möglicherweise in der Tatsache, dass nur 80% der in die Studie eingeschlossenen Patienten für eine Kontroll-Koronarangiographie sechs Monate nach Koronarintervention und somit für die Ermittlung des primären Studienendpunktes zur Verfügung standen. Es konnte jedoch auch kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem klinischen Langzeitverlauf innerhalb eines Jahres nach Koronarintervention und dem Stromelysin-1-5A/6A-Polymorphismus nachgewiesen werden, obwohl die klinischen Daten für alle 3333 eingeschlossenen Patienten ausgewertet wurden. Zwischen den verschiedenen Genotypgruppen (5A5A vs. 5A6A vs. 6A6A) zeigte sich kein Unterschied in der Häufigkeit von erneut aufgetretener AP-Symptomatik bzw. anderen klinischen Ischämiezeichen, die eine nochmalige Revaskularisation nötig machten. Auch fatale klinische Ereignisse wie Tod oder akuter Myokardinfarkt traten innerhalb des Beobachtungszeitraumes bei den Patienten unterschiedlichen Genotyps gleich häufig auf.

Wie bereits an den zuvor beschriebenen Ergebnissen der verschiedenen Untersuchungen zum Einfluss von Stromelysin-1 auf die Entwicklung und den Verlauf einer koronaren Herzerkrankung zu sehen ist, erzielen die einzelnen Arbeitsgruppen oft unterschiedliche bzw. sogar widersprüchliche Ergebnisse. Bei Assoziationsstudien, die den Einfluss eines Genpolymorphismus auf bestimmte Phänomene in der Bevölkerung oder einer Patientengruppe untersuchen, spielt dabei die Genotypverteilung in der untersuchten Bevölkerung eine wichtige Rolle. In der vorliegenden Studie wurden 3333 kaukasische Patienten untersucht. Die Genotypverteilung des Stromelysin-1-5A/6A-Polymorphismus entsprach dabei dem Hardy-Weinberg Gesetz: Der 5A5A-Genotyp wurde bei 801 Patienten

(24,0%) nachgewiesen, der 5A6A-Genotyp bei 1667 (50,0%) und der 6A6A-Genotyp bei 865 Patienten (26,0%). Diese Ergebnisse stimmen mit den Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen überein: In einer von Humphries et al. untersuchten Population mit 485 französischen Patienten, die ebenfalls bei symptomatischer koronarer Herzerkrankung behandelt wurde, fanden sich 23,9% der Patienten mit dem 5A5A-Genotyp, 51,1% der Patienten mit dem 5A6A-Genotyp und 24,9% der Patienten mit dem 6A6A-Genotyp (25). Eine Untersuchung mit 495 niederländischen, an einer koronaren Herzerkrankung erkrankten Patienten ergab eine Genotypverteilung mit 24,1 % 5A5A-Genotyp, 50,2 % 5A6A-Genotyp und 25,7% 6A6A-Genotyp (45). Darüber hinaus stimmt die in der vorliegenden Studie ermittelte Genotypverteilung mit einer Untersuchung überein, die an 515 männlichen Personen ohne kardiovaskuläre Erkrankung durchgeführt worden war: 27,0% der untersuchten Personen wiesen den 5A5A-Genotyp, 48,3 % den 5A6A-Genotyp und 24,7% den 6A6A-Genotyp (58).

Weiterhin besteht bei Assoziationsstudien ohne vorherige Fallzahlabeschätzung das Risiko Zufallsergebnisse zu erhalten. In der vorliegenden Studie wurden jedoch entsprechend der Fallzahlabeschätzung insgesamt 3333 Patienten untersucht, bei 80% dieser Patienten waren die Ergebnisse einer kontrollierenden Koronarangiographie sechs Monaten nach erfolgter Koronarintervention verfügbar. Aufgrund der großen Anzahl der untersuchten Patienten erscheint ein zufälliges Ergebnis eher unwahrscheinlich. Eine Beeinflussung der Studienergebnisse durch die Untersucher wurde verhindert, indem die Ärzte, die die Kontroll-Koronarangiographie ausführten oder die Befunde für diese Untersuchung erstellten, keine Kenntnisse über den Genotyp der Patienten hatten. Des Weiteren hatten die Personen, die an der Genotypisierung der Patienten beteiligt waren, keinen Zugriff auf die klinischen Daten und die angiographischen Befunde des Patienten. Um die exakte Handhabung der DNA sowie die Reproduzierbarkeit der Genotypisierung zu überprüfen, erfolgte bei 20% der untersuchten

Patienten eine unabhängige zweite Bestimmung des Genotyps, wobei DNA-Proben eingesetzt wurden, die getrennt von den in der ersten Bestimmung verwendeten DNA-Proben isoliert wurden.

Als mögliche Erklärung der unterschiedlichen Ergebnisse der vorliegenden Studie und der Beobachtungen von Humphries et al. bleiben schließlich Unterschiede im Studiendesign, sowie in den basalen Charakteristika der eingeschlossenen Patienten: So waren die Patienten in der vorliegenden Studie im Mittel älter (65,2 Jahre) als in der Untersuchung von Humphries et al (58,8 Jahre), des weiteren war in der vorliegenden Studie der Anteil der Frauen in der untersuchten Population höher als bei Humphries et al. (25,7% vs. 15,2%).

4.4. Bedeutung der Ergebnisse

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigten keine statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen dem Stromelysin-1-5A/6A-Polymorphismus und der Entwicklung einer angiographisch definierten Restenose nach perkutaner Koronarintervention. Wie eine Subgruppenanalyse zeigte, trifft diese Aussage für beide Behandlungsmöglichkeiten – alleinige Ballondilatation und Stentimplantation – zu. Trotz dieser Ergebnisse stellt die vorliegende Arbeit den möglichen Einfluss von Stromelysin-1 bei der Entwicklung einer Restenose nach perkutaner Koronarintervention nicht in Frage. Sowohl bei der Entwicklung einer koronaren Herzerkrankung als auch bei der Ausbildung einer Restenose nach Gefäßverletzung mit Bildung einer Neointima und den Prozessen des „vascular remodelings“ handelt es sich um ein multifaktorielles Geschehen, an dem viele verschiedene Faktoren beteiligt sind. Beispielsweise sind neben der Metalloproteinase Stromelysin-1 auch andere Matrixmetalloproteinasen in die Umbauprozessen der extrazellulären Matrix involviert (11, 47). In mehreren Studien wurde eine Assoziation zwischen Polymorphismen in der Promotor-Region von Genen der übrigen Matrixmetalloproteinasen mit der Entwicklung einer

koronaren Herzerkrankung gefunden. Im Promotor des Matrixmetalloproteinase-1-Gens wurde ein Polymorphismus nachgewiesen (Matrixmetalloproteinase-1-1607-1G/2G-Polymorphismus), dessen Allele sich durch das Vorhandensein eines Sequenzmotivs mit einer Guanin-Base oder eines Sequenzmotivs mit einer Folge von 2 Guanin-Basen unterscheiden. In Zellkulturexperimenten wies der Promotor mit dem 2G-Sequenzmotiv eine höhere transkriptionelle Aktivität auf als der Promotor mit dem 1G-Sequenzmotiv (54). Ye et al. zeigten in einer Studie mit 471 kaukasischen Patienten, dass homozygote Träger des 2G-Allels ein geringeres Risiko für die Entwicklung einer koronaren Herzerkrankung aufweisen als Individuen mit Genotyp 1G1G oder Genotyp 1G2G (73). Auch im Promotor des Matrixmetalloproteinase-9-Gens wurde ein Polymorphismus beschrieben (Matrixmetalloproteinase-9-1562-C/T-Polymorphismus), dessen T-Allel in Transfektionsexperimenten gegenüber dem C-Allel eine höhere transkriptionelle Aktivität aufweist (75). In einer Studie mit 374 angiographisch untersuchten Patienten war der Anteil an Patienten mit einer koronaren Dreifäßerkrankung bei Trägern mindestens eines T-Allels signifikant höher als bei homozygoten Trägern des C-Allels (75).

Möglicherweise wirkt sich jedoch - wie im Falle des 5A/6A-Polymorphismus im Promotor des Stromelysin-1-Gens - eine Veränderung bzw. ein Unterschied in nur einem einzigen Einflussfaktor noch nicht auf den klinischen Verlauf oder das angiographische Ergebnis nach Koronarintervention aus, sondern erst eine Kombination mehrerer verschiedener Faktoren. Um den Prozess der Restenose genauer zu verstehen und insbesondere um Prädiktoren des Restenosrisikos zu erhalten, müssen noch weitere Untersuchungen folgen. Möglicherweise erhält man durch Assoziationsstudien, die mehrere Genpolymorphismen untersuchen – sogenannte Haplotypanalysen – genetische Marker für das Risiko von Komplikationen nach perkutaner Koronarintervention.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss 5A/6A-Polymorphismus im Promotor des Stromelysin-1-Gens auf die Entwicklung einer Restenose sowie auf den klinischen Langzeitverlauf nach perkutaner transluminaler Koronarintervention untersucht. Die Ballondilatation mit oder ohne Stentimplantation ist derzeit ein etabliertes und häufig angewandtes Therapieverfahren bei koronarer Herzerkrankung. Ein bisher ungelöstes Problem nach erfolgter Koronarintervention ist jedoch die Entwicklung einer Restenose durch Neointimaproliferation und „vascular remodeling“: Bei der Bildung einer Neointima nach Gefäßverletzung kommt es zur Migration von glatten Gefäßmuskelzellen in die Gefäßintima. Dabei erfolgt eine Entdifferenzierung der normalerweise hoch differenzierten ortsständigen glatten Gefäßmuskelzellen. Die entdifferenzierten glatten Gefäßmuskelzellen sind in der Lage zu migrieren und extrazelluläre Matrix zu synthetisieren. Im Rahmen des „vascular remodelings“ findet ein Umbau des extrazellulären Bindegewebes statt, wobei es teilweise auch zum Abbau der Lamina elastica externa kommt, was zu einer vermehrten Vasokonstriktion führt. Durch die Neointimaproliferation und das „vascular remodeling“ kommt es schließlich zu einer erneuten Lumeneinengung des behandelten Koronargefäßes.

Stromelysin-1 gehört zur Familie der Matrixmetalloproteinasen, die den Abbau der extrazellulären Matrix bewerkstelligen, weshalb ihnen eine Rolle bei der Entwicklung der Restenose nach perkutaner Koronarintervention zugeschrieben wird. Im Promotor des Stromelysin-1-Gens wurde ein Insertions-/Deletions-Polymorphismus nachgewiesen, dessen Basensequenz durch eine Folge von entweder fünf Adenosin-Basen oder durch eine Folge von sechs Adenosin-Basen gekennzeichnet ist (Stromelysin-1-5A/6A-Polymorphismus). In Transfektionsversuchen mit Gewebekulturzellen konnte gezeigt werden, dass der Promotor des Stromelysin-1-Gens mit dem 5A-Sequenzmotiv eine höhere Aktivität aufweist als der Promotor des Stromelysin-1-Gens mit dem 6A-Sequenzmotiv, vermutlich durch die

bevorzugte Bindung eines Transkriptions-Repressor-Proteins an den Promotor mit dem 6A-Sequenzmotiv.

Um den Einfluss des Stromelysin-1-5A/6A-Polymorphismus auf die Restenosehäufigkeit und den klinischen Langzeitverlauf zu untersuchen, wurden 3333 Patienten, bei denen aufgrund einer symptomatischen koronaren Herzerkrankung eine Ballondilatation (476 Patienten) oder Stentimplantation (2857 Patienten) durchgeführt wurde, in die Studie eingeschlossen. Primärer Endpunkt der Studie war das Auftreten einer angiographisch diagnostizierten Restenose (Durchmesser der Stenose \geq 50%) zum Zeitpunkt der Kontroll-Koronarangiographie sechs Monate nach erfolgter Intervention. Sekundäre Endpunkte der Studie waren die Inzidenz von Tod oder akutem Myokardinfarkt sowie die Notwendigkeit einer Myokard-Revaskularisation mittels Ballondilatation oder koronarer Bypassoperation innerhalb des Beobachtungszeitraumes von einem Jahr.

Bei allen Patienten wurde der Stromelysin-1-5A/6A-Genotyp bestimmt. Hierzu wurde DNA von Leukozyten aus dem peripheren Blut extrahiert. Die Genotypisierung erfolgte mit Hilfe des TaqMan-Verfahrens. Sechs Monate nach Koronarintervention wurde bei 80% der Patienten eine Kontroll-Koronarangiographie durchgeführt. Ein regelmäßiges klinisches „Follow-up“ innerhalb eines Beobachtungszeitraumes von einem Jahr erfolgte bei allen eingeschlossenen Patienten. Das wichtigste Ergebnis der Studie ist, dass der Stromelysin-1-5A/6A-Polymorphismus nicht mit der Häufigkeit der Entwicklung einer Restenose nach perkutaner Koronarintervention assoziiert ist. Die Restenoserate betrug 28,1% bei den Patienten mit Genotyp 5A5A, 27,8% bei Patienten mit Genotyp 5A6A und 29,5% bei Patienten mit dem Genotyp 6A6A ($P = 0,71$). Auch bezüglich des klinischen Verlaufs innerhalb eines Jahres nach Koronarintervention zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypgruppen: Die Inzidenz von Tod oder eines akuten Myokardinfarktes sowie die Notwendigkeit einer erneuten Myokard-Revaskularisation

waren in den drei Genotypgruppen gleich verteilt. Auch eine getrennte Untersuchung der Patienten nach Art der Behandlung - Ballondilatation oder Stentimplantation - zeigte keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Stromelysin-1-5A/6A-Genotyp und der Entwicklung einer Restenose nach perkutaner Koronarintervention.

Zusammenfassend ergibt sich, dass sich der 5A/6A Polymorphismus im Promotor des Stromelysin-1-Gens isoliert betrachtet, nicht als prognostischer Faktor für das Risiko der Entwicklung einer Restenose oder für den klinischen Verlauf nach perkutaner Koronarintervention eignet. Da es sich bei der Ausbildung einer Restenose nach Gefäßverletzung um ein multifaktorielles Geschehen handelt, an dem viele verschiedene Faktoren beteiligt sind, wirkt sich ein Unterschied in nur einem einzigen Einflussfaktor möglicherweise nicht auf den klinischen und angiographischen Verlauf nach Koronarintervention aus, sondern erst eine Kombination mehrerer Faktoren.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Ardissino, D., Mannucci, P.M., Merlini, P.A., Duca, F., Fève, 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.

- 2 Beyzade, S., Zhan, g S., Wong, Y., Day, I.N.M., Eriksson, P., Ye S.
Influences of matrix metalloproteinase-3 gene variation on extent of coronary atherosclerosis and risk of myocardial infarction.
Am. Coll. Cardiol. 41 (2003) 2130-2137.

- 3 Birkedal-Hansen, H., Moore, W.G., Bodden, M.K., Windsor, L.J., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A., Engler, J.A.
Matrix metalloproteinases: a review.
Crit. Rev. Oral Biol. Med. 4 (1993) 197-250.

- 4 Buttice, G., Quinones, S., Kurkinen, M.
The AP-1 site is required for basal expression but is not necessary for TPA-response of the human stromelysin gene.
Nucleic Acids Research 19 (1991) 3723-3731.

- 5 Diaz-Meco, M.T, Quinones, S., Municio, M.M., Sanz, L., Bernal, D., Cabrero, E., Saus, J., Moscat, J.
Protein kinase C-independent expression of stromelysin-1 by platelet-derived growth factor, ras oncogene, and phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C.
J. Biol. Chem. 266 (1991) 22597-22602.

- 6 Dollery, C.M., Mc Ewan, J.R., Henney, A.M
Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease.
Circ. Res. 77 (1995) 863-868.

- 7 Falk, E., Prediman, K., Shah, P.K., Fuster, V.
Coronary plaque disruption.
Circulation 92 (1995) 657-671.

- 8 Faxon, D.P., Coats, W., Currier, J.
Remodeling of the coronary artery after vascular injury.
Prog. Cardiovasc. Dis. 40 (1997) 129-140.

- 9 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) 1129-1132.

- 10 Frisch, S.M., Ruley, H.E.
Transcription from the stromelysin-1 promoter is induced by interleukin-1 and repressed by dexamethasone.
J. Biol. Chem. 262 (1987) 16300-16304.
- 11 Galis, Z.S., Khatri, J.J.
Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis. The Good, the bad and the ugly.
Circ. Res. 90 (2002) 251-262.
- 12 Galis, Z.S., Muszynski, M., Sukhova, G.K., Simon-Morrissey, E., Unemori, E.N., Lark, M.W., Amento, E., Libby, P.
Cytokine- stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion.
Circ. Res. 75 (1994) 181-189.
- 13 Galis, Z.S., Sukhova, G.K., Kranzhöfer, R., Clark, S., Libby, P.
Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrix-degrading proteinases.
Proc. Natl. Sci. USA 92 (1995) 402-406.
- 14 Galis, Z.S., Sukhova, G.K., Lark, M.W., Libby, P.
Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques.
J. Clin. Invest. 94 (1994) 2493-2503.

- 15 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.
Circulation 98 (1998) 1164-1171.
- 16 Gawaz, M., Neumann, F.J., Ott, I., May, A., Schömig, A.
Platelet activation and coronary stent implantation: effect of antithrombotic therapy.
Circulation 94 (1996) 279-237.
- 17 George, B.S., Voorhees, W.D. III, Roubin, G.S., Fearnot, N.E., Pinkerton, C.A., Raizner, A.E., King, S.B., Holmes, D.R., Topol, E.J., Kereiakes, D.J.
Multicenter investigation of coronary stenting to treat acute or threatened closure after percutaneous transluminal coronary angioplasty: clinical and angiographic outcomes.
J. Am. Coll. Cardiol. 22 (1993) 135-143.
- 18 Gortchakova, O., Koch, W., von Beckerath, N., Mehili, J., Schömig, A., Kastrati, A.
Association of a genetic variant of endothelial nitric oxide synthase with the 1 year clinical outcome after coronary stent placement.
Eur. Heart J. 24 (2003) 820-827.
- 19 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) 157-163.

- 20 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) 630-636.
- 21 Guidelines Subcommittee.
1999 World Health Organization-International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension.
J. Hypertens. 17 (1999)151-183.
- 22 Hanemaaijer, R., Koolwijk, P., le Clercq, L., de Vree, W.J., van Hinsbergh, V.W.
Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vein and microvascular endothelial cells. Effects of tumor necrosis factor alpha, interleukin 1 and phorbol ester.
Biochem. J. 296 (1993) 803-809.
- 23 Henney, A.M., Wakeley, P.R., Davies, M.J., Foster, K., Hembry, R., Murphy, G., Humphries, S.
Localization of stromelysin gene expression in atherosclerotic plaques by in situ hybridization.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88 (1991) 8154-8158.
- 24 Hoffmann, R., Mintz, G.S., Dussailant, G.R., Popma, J.J., Pichard, A.D., Satler, L.F., Kent, K.M., Griffin, J., Leon, M.B.
Patterns and mechanisms of in-stent restenosis. A serial intravascular ultrasound study.
Circulation 94 (1996) 1247-1254.

- 25 Humphries, S., Bauters, C., Meirhaeghe, A., Luong, L., Bertrand, M., Amouyel, P.
The 5A6A polymorphism in the promoter of the stromelysin-1 (MMP3) gene as a risk factor for restenosis.
Eur. Heart J. 23 (2002) 721-725.
- 26 Humphries, S.E., Luong, L., Talmud, P.J., Frick, H., Kesäniemi, Y.A., Pasternack, A., Taskinen, M.R., Syväne, M.
The 5A/6A polymorphism in the promoter of the stromelysin-1 (MMP-3) gene predicts progression of angiographically determined coronary artery disease in men in the LOCAT gemfibrozil study.
Atherosclerosis 139 (1998) 49-56.
- 27 Imai, K., Yokohama, Y., Nakanishi, I., Ohuchi, E., Fuji, Y., Nakai, N., Okada, Y.
Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) from human rectal carcinoma cells . Activation of the precursor, interaction with other matrix metalloproteinases and enzymic properties.
J. Biol. Chem. 270 (1995) 6691-6697.
- 28 James, T.W., Wagner, R., White, L.A., Zwolak, R.M., Brinckerhoff, C.E.
Induction of collagenase and stromelysin gene expression by mechanical injury in vascular smooth muscle-derived cell line.
J. Cell Physiol. 157 (1993) 426-437.

- 29 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) 507-511.
- 30 Kastrati, A., Koch, W., Berger, P.B., Mehili, J., Stephenson, K., Neumann, F.J., von Beckerath, N., Böttiger, C., Duff, G.W., Schömig, A.
Protective role against restenosis from an interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in patients treated with coronary stenting.
J. Am. Coll. Cardiol. 36 (2000) 2168-2173.
- 31 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) 1498-1505.
- 32 Kastrati, A., Schömig, A., Dirschinger, J., Mehili, J., Dotzer, F., von Welser, N., Neumann, F.J. for the ISAR-SMART Study Investigators.
A randomized trial comparing stenting with balloon angioplasty in small vessels in patients with symptomatic coronary artery disease.
Circulation 102 (2000) 2593-2598.

- 33 Kastrati, A., Schömig, A., Seyfarth, M., Koch, W., Sphend, E., Böttiger, C., Mehili, J., Schömig, K., Von Beckerath, N.
PIA Polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risk of restenosis after coronary stent placement.
Circulation 99 (1999) 1005-1010.
- 34 Kerr, L.D., Holt, J.T., Matrisian, L.M.
Growth factors regulate transin gene expression by c-fos dependent and c-fos independent pathways.
Science 242 (1988) 1424-1427.
- 35 Kerr, L.D., Miller, D.B., Matrisian, L.M.
TGF-beta 1 inhibition of transin/stromelysin gene expression mediated through a fos binding sequence.
Cell 61 (1990) 267-278.
- 36 Kimura, T., Kaburagi, S., Tamura, T., Yokoi, H., Nakagawa, Y., Yokoi, H., Hamasaki, N., Nosaka, H., Nobuyoshi, M., Mintz, G., Popma, J.J., Leon, M.B.
Remodeling of human coronary arteries undergoing coronary angioplasty or atherectomy. Circulation 96 (1997) 475-483.
- 37 King, SB III.
The development of interventional cardiology.
J Am .Coll. Cardiol. 31 Suppl. B(1998) 64B-88B.

- 38 Knauper, V., Wilhelm, S.M., Seperack, P.K., DeClerck, Y.A., Langley, K.E., Osthues, A., Tschesche, H.
Direct activation of human neutrophil procollagenase by recombinant stromelysin.
Biochem. J. 295 (1993) 581-586.
- 39 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) 224-233.
- 40 Levine, G.N., Chodos, A.P., Loscalzo, J.
Restenosis following coronary angioplasty: clinical presentations and therapeutic options. Clin. Cardiol. 18 (1995) 693-703.
- 41 Libby, P.
Molecular bases of the acute coronary syndromes.
Circulation 91 (1995) 2844-2850.
- 42 Lijnen, H.R.
Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling.
Thromb. Haemost. 86 (2001) 324-333.
- 43 Livak, K.J.
Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay.
Genet. Anal. 14 (1999) 130-137.

- 44 Lovdahl, C., Thyberg, J., Cercek, B., Blomgren, K., Dimayuga, P., Kallin, B., Hultgardh-
Nilsson, A.
Antisense oligonucleotides to stromelysin mRNA inhibit injury-induced proliferation of
arterial smooth muscle cells.
Histol. Histopathol. 14 (1999) 1101-1112.
- 45 de Maat, M.P.M., Jukema, L.W., Ye, S., Zwindermann, A.H., Moghaddam, P.M.,
Beekman, M., Kastelein, J.J.P., van Boven, Ad.J., Bruschke, A.V.G., Humphries, S.E.,
Kluft, C., Henney, A.M.
Effect of the stromelysin-1 promoter on efficacy of pravastatin in coronary
atherosclerosis and restenosis.
Am. J. Cardiol. 83 (1999) 852-856.
- 46 Mintz, G.S., Popma, J.J., Pichard, A.D., Kent, K.M., Satler, L.F., Wong, S.C., Hong,
M.K., Kovach, J.A., Leon, M.B.
Arterial remodeling after coronary angioplasty. A serial intravascular ultrasound study.
Circulation 94 (1996) 35-43.
- 47 Nagase, H., Woessner, J.F. Jr.
Matrix metalloproteinases.
J Biol. Chem. 274 (1999) 21491-21494.

- 48 Nicolaes, G.A., Dahlback, B.
Factor V and thrombotic disease: description of a janus-faced protein. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22 (2002) 530-538.
- 49 Quinones, S., Buttice, G., Kurkinen, M.
Promoter elements in the transcriptional activation of the human stromelysin-1 gene by the inflammatory element cytokine, interleukin 1.
Biochem. J. 302 (1994) 471-477.
- 50 Quinones, S., Saus, J., Otani, Y., Harris, E.D. Jr., Kurkinen, M.
Transcriptional regulation of human stromelysin.
J. Biol. Chem. 264 (1989) 8339-8344.
- 51 Richardson, P.D., Davies, M.J., Born, G.V.
Influence of plaque configuration and stress distribution on fissuring of coronary atherosclerotic plaques.
Lancet 2 (1989) 941-944.
- 52 Rosenberg, G.A., Estrada, E.Y., Dencoff, B.S.
Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain.
Stroke 29 (1998) 2189-2195.

- 53 Ross, R.
Atherosclerosis an inflammatory disease.
N. Engl. J. Med. 340 (1999) 115-126.
- 54 Rutter, J.L., Mitchell, T.I., Buttice, G., Meyers, J., Gusella, J.F., Ozelius, L.J.,
Brinckerhoff, C.E.
A single nucleotid polymorphism in the matrix-metalloproteinase-1 promoter creates an
ets binding site and augments transcription.
Cancer Res. 58 (1998) 5321-5325.
- 55 Sanz, L., Berra, E., Municio, M.M., Dominguez, .I, Lozano, J., Johansen, T., Moscat, J.,
Diaz-Meco, M.T.
Zeta PKC plays a critical role during stromelysin promoter activation by platelet-derived
growth factor through a novel palindromic element.
J. Biol. Chem. 269 (1994) 10044-10049.
- 56 Schömig, A., Kastrati, A., Mudra, H., Blasini, R., Schühlen, H., Klauss, V., Richardt,
G., Neumann, F.J.
Four-year experience with Palmaz-Schatz stenting in coronary angioplasty complicated
by dissection with threatened or present vessel closure.
Circulation 90 (1994) 2716-2724.

- 57 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) 1084-1089.
- 58 Schwarz, AA, Haberbosch, W., Tillmanns, H., Gardemann, A.
The stromelysin-1 5A/6A promoter polymorphism is a disease marker for the extent of coronary heart disease.
Dis. Markers 18 (2002) 121-128.
- 59 Schwartz, R.S., Topol, E.J., Serruys, P.W., Sangiorgi, G., Holmes, D.R.
Artery size, neointima and remodeling. Time for some standards.
J. Am. Coll. Cardiol. 32 (1998) 2087-2094.
- 60 Serrano, C.V., Ramires, J.A.F., Venturinelli, M., Arie, S., D'Amico, E., Zweier, J.L., Pileggi, F., Da Luz, P.L.
Coronary angioplasty results in leukocyte and platelet activation with adhesion molecule expression.
J. Am. Coll. Cardiol. 29 (1997) 1276-1283.

- 61 Serruys, P.W., de Jaegere, .P, Kiemeneij, F., Macaya, C., Rutsch, W., Heyndrickx, G., Emanuelsson, H., Marco, J., Legrand, V., Materne, P., Belardi, J., Sigwart, U., Colombo, A., Goy, J.J., van den Heuvel, P., Delcan, J., Morel, M.A., for the Benestent Study Group. A comparison of balloon-expandable stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease.
N. Engl. J. Med. 331 (1994) 489-495.
- 62 Shapiro, S.D., Fliszar, C.J., Broekelmann, T.J., Mecham, R.P., Senior, R.M., Welgus, H.G.
Activation of the 92-kDa gelatinase by stromelysin and 4-Aminophenylmercuric acetate.
J. Biol. Chem. 270 (1995) 6351-6356.
- 63 Siffert, W., Roszkopf, D., Siffert, G., Busch, S., Moritz, A., Eberl, R., Sharma, A.M., Ritz, E., Wichmann, H.E., Jakobs, K.H., Horsthemke, B.
Association of a human G-protein $\beta 3$ subunit variant with hypertension.
Nat. Genet. 18 (1998) 45-48.
- 64 Sirum-Connolly, K., Brinckerhoff, C.E.
Interleukin-1 or phorbol induction of the stromelysin promoter requires an element that cooperates with AP-1.
Nucleic Acids Res. 19 (1991) 335-341.

- 65 Spurr, N.K., Gough, A.C., Gosden, .J, Rout, D., Porteous, D.J., van Heyningen,V., Docherty, A.J.
Restriction fragment length polymorphism analysis and assignment of the metalloproteinases stromelysin and collagenase to the long arm of chromosome 11. *Genomics* 2 (1988) 119-127.
- 66 Suzuki, K., Enghild, J.J., Morodomi, T., Salvesen, G., Nagase, H.
Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin). *Biochemistry* 29 (1990) 10261-10270.
- 67 Terashima, M., Hozuka, A., Kanazawa, K., Inoue, N., Yamada, S., Ito, K., Matsuda, Y., Takai, E., Iwai, C., Kurogane, H., Yoshida, Y., Yokoyama, M.
Stromelysin promoter 5A/6A polymorphism is associated with acute myocardial infarction. *Circulation* 99 (1999) 2717-2719.
- 68 Tesauro, M., Thompson, W.C., Rogliani, P., Qui, L., Chaudhary, P.P., Moss, J.
Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 2832-2835.

- 69 Topol, E.J.
Coronary-artery stents – gauging, gorging and gouging.
N. Engl. J. Med. 339 (1998) 1701-1704.
- 70 Topol, E.J., Serruys, P.W.
Frontiers in interventional cardiology.
Circulation 98 (1998) 1802-1820.
- 71 World Health Organization Study Group.
Diabetes mellitus.
WHO Tech. Rep. Ser. 727 (1985) 1-104.
- 72 Ye, S., Eriksson, P., Hamsten, A., Kurkinen, M., Humphries, S.e., Henney, A.M.
Progression of coronary atherosclerosis is associated with a common variant of the human stromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression.
J. Biol. Chem. 271(1996) 13055-13060.
- 73 Ye, S., Gale, C.R., Martyn, C.N.
Variation in the matrix metalloproteinase-1 gene and risk of coronary heart disease
Eur. Heart J. 24 (2003) 1668-1671.

- 74 Ye, S., Watts, G.F., Mandalia, S., Humphries, S.E., Henney, A.M.
Preliminary report: genetic variation in the human stromelysin promoter is associated with progression of coronary atherosclerosis.
Br. Heart J. 73 (1995) 209-215.
- 75 Zhang, B., Ye, S., Herrmann, S.M., Eriksson, P., de Maat, M., Evans, A., Arveiler, D., Luc, G., Cambien, F., Hamsten, A., Watkins, H., Henney, A.M.
Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis
Circulation 99 (1999) 1788-1794.

Danksagung

Für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit der Promotion möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. A. Kastrati bedanken.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Dr. W. Koch für die freundliche und geduldige Betreuung der Arbeit.

Frau Marianne Eichinger, Frau Angela Ehrenhaft, Herrn Wolfgang Latz sowie allen Mitarbeitern des Labors der experimentellen Kardiologie des Deutschen Herzzentrums möchte ich ganz herzlich für die Unterstützung und die wertvollen Ratschläge während des experimentellen Teils der Arbeit danken.