

Aus der Klinik für Kardiologie der
Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchung der Assoziation von ANP- Polymorphismen und KHK

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Pierre Materne
aus Finsterwalde

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. R. Willenbrock

2. Prof. Dr. med. K.-U. Eckardt

3. Prof. Dr. med. V. Regitz-Zagrosek

Datum der Promotion: 26.02.2009

„Erfahrungen vererben sich nicht - jeder muss sie allein machen.“

Kurt Tucholsky

Meiner Familie

Abstract (Deutsch)

Die koronare Herzkrankheit (KHK) wird als multifaktorielles Krankheitsbild durch die Interaktion von erblichen Merkmalen mit diversen Risikofaktoren hervorgerufen. Bei der komplexen Genetik dieser Erkrankung spielt das atriale natriuretische Peptid (ANP) eine wichtige Rolle.

In einer Fall-Kontroll-Studie wurden dazu 264 KHK-Patienten und 228 Kontrollen auf die Genvarianten G664A, C708T, G1837A und T2238C des ANP untersucht. Die Genotypisierung erfolgte durch PCR und anschließender Sequenzierung für die Polymorphismen G664A und C708T sowie PCR und einem folgenden Restriktionsverdau für die Polymorphismen G1837A (HpaII) und T2238C (ScaI). Weiterhin wurden die Polymorphismen auf eine mögliche Assoziation zum ANP-Spiegel, zur Ejektionsfraktion und zum arteriellen Hypertonus untersucht.

Die Fall- und Kontrollgruppe waren bezüglich der Risikofaktoren Alter, Geschlecht, arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus und Hyperlipidämie ähnlich verteilt. Alle vier untersuchten Genvarianten unterlagen dem Hardy-Weinberg-Gesetz. Unter Annahme eines dominanten Erbganges für das T-Allel des Polymorphismus T2238C konnte eine signifikante Assoziation des T-Allel zur koronaren Herzkrankheit gezeigt werden ($p < 0,05$; $OR = 7,08$). Ferner befinden sich die Polymorphismen G664A und G1837A sowie C708T und T2238C im Kopplungsungleichgewicht. Die untersuchten Polymorphismen zeigten weder eine Assoziation zum ANP-Spiegel noch zur Ejektionsfraktion oder zum arteriellen Hypertonus.

In der Fallgruppe zeigte sich der ANP-Spiegel gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht ($p = 0,014$). Die cGMP/ANP-Ratio war in der Fallgruppe signifikant niedriger ($p < 0,001$) und könnte für eine Abnahme der Aktivität der natriuretischen Peptidrezeptoren bei der KHK sprechen. Bei der Interpretation des erhöhten ANP-Spiegels ist die signifikant unterschiedliche Ejektionsfraktion zwischen der Fall- und Kontrollgruppe in der Diskussion zu berücksichtigen. Der ANP-Spiegel scheint eng mit einer linksventrikulären Funktionsstörung bei KHK-Patienten verknüpft zu sein. Unsere Ergebnisse zeigen auch, dass der T2238C Polymorphismus eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer KHK spielt und durch weitergehende Studien genauer untersucht werden sollte.

Schlüsselwörter: ANP, Polymorphismus, KHK, Assoziationsstudie

Abstract (Englisch)

Coronary heart disease (CHD) is a complex disease affected by environmental as well as genetic factors. The atrial natriuretic peptide (ANP) seems to play a role in this complex genetic background.

264 CHD patients und 228 controls were included in this case control study. We investigated 4 previously known polymorphisms G664A, C708T, G1837A and T2238C of ANP. We used polymerase chain reaction (PCR) and sequencing for the polymorphisms G664A and C708T. The polymorphisms G1837A and T2238C were identified by digestion with restriction endonucleases. Further, we evaluated the relation between these polymorphisms and the ANP-plasma level, the ejection fraction and hypertension.

Both groups were evenly distributed in risk factors age, gender, hypertension, diabetes and hyperlipidemia. All of these single nucleotide polymorphisms were in Hardy-Weinberg-equilibrium. Assuming a dominant inheritance of T-allele in the T2238C polymorphism, we found a significant association of T-allele in CHD patients ($p < 0,05$; $OR = 7,08$). The G664A and G1837A polymorphisms and the C708T and the T2238C displayed a highly significant degree of linkage disequilibrium. None of the polymorphisms were associated with the ANP-plasma level, ejection fraction and hypertension.

The case group showed a significant higher ANP-plasma level ($p = 0,014$) and significant lower cGMP/ANP-Ratio ($p < 0,001$) than the controls, what might be caused by decreased activity of natriuretic peptid receptors in CHD. We found in our CHD patients significant lower ejection fraction, too. These results suggest that ANP-plasma level is closely related to left ventricular dysfunction in CHD. Furthermore, our results imply an important relevance of polymorphism T2238C for CHD development. Further studies for the evaluation of pathophysiologic correlation are needed.

key words: ANP, CHD, polymorphism, association study

INHALTSVERZEICHNIS

1	<i>Einleitung</i>	4
1.1	Die koronare Herzkrankheit (KHK)	4
1.1.1	Epidemiologie	4
1.1.2	Die koronare Herzkrankheit als komplexe genetische Erkrankung	4
1.1.3	Risikofaktoren	5
1.2	Das atriale natriuretische Peptid (ANP)	7
1.2.1	Synthese und Freisetzung des ANP	8
1.2.2	Wirkungen des ANP	9
1.2.3	Bedeutung natriuretischer Peptide für atherosklerotische Erkrankungen	11
1.2.4	Polymorphismen des ANP-Gens	12
1.3	Assoziationsstudien zur Analyse komplexer genetischer Erkrankungen	14
1.4	Fragestellung	17
2	<i>Material und Methoden</i>	18
2.1	Charakterisierung des Patientenkollektivs	18
2.1.1	Charakterisierung der Fall- und Kontrollgruppe	18
2.2	Studienaufbau	18
2.2.1	Patientenrekrutierung	19
2.3	Die Diagnosesicherung der KHK mit der Koronarangiografie	19
2.4	Blutentnahme	20
2.5	DNA-Polymorphismusanalyse	20
2.5.1	DNA-Präparation	20
2.5.2	Polymerasenkettenreaktion (PCR)	21
2.5.3	Sequenzierung	22
2.5.4	Restriktionsverdau	24
2.6	Bestimmung des ANP-Spiegels im Blut	26
2.7	Bestimmung des cGMP-Spiegels im Blut	27

2.8	Kopplungsungleichgewicht	27
2.9	Haplotypenanalyse	27
2.10	Statistische Methoden	27
3	<i>Ergebnisse</i>	29
3.1	Gruppencharakterisierung	29
3.2	Allelfrequenz und Hardy-Weinberg-Verteilung	30
3.3	Auftreten der Polymorphismen in der Fall- und Kontrollgruppe	31
3.3.1	G664A	31
3.3.2	C708T	32
3.3.3	G1837A (HpaII)	34
3.3.4	T2238C (ScaI)	36
3.4	ANP-Polymorphismen und die Ejektionsfraktion	38
3.5	ANP-Polymorphismen und der arterielle Hypertonus	39
3.6	ANP-Polymorphismen und der ANP-Spiegel	39
3.7	Kopplungsgruppe	41
3.8	Haplotypenanalyse	41
3.9	ANP-, cGMP-Spiegel und die cGMP/ANP-Ratio	43
3.9.1	ANP-, cGMP-Spiegel und die cGMP/ANP-Ratio in Fall- und Kontrollgruppe	43
3.9.2	ANP-Spiegel und cGMP/ANP-Ratio bei der Herzinsuffizienz	44
4	<i>Diskussion</i>	46
4.1	Polymorphismen	46
4.1.1	G664A	46
4.1.2	C708T	47
4.1.3	G1837A (HpaII)	47
4.1.4	T2238C (ScaI)	48
4.1.5	Haplotypenanalyse	49
4.2	ANP-, cGMP-Spiegel und die cGMP/ANP-Ratio	49

4.3	Schlussfolgerungen	51
4.4	Klinische Anwendung und Perspektiven	53
4.5	Fehlerdiskussion	56
5	<i>Zusammenfassung</i>	58
6	<i>Literaturverzeichnis</i>	60
7	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	76
8	<i>Tabellenverzeichnis</i>	77
9	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	79
10	<i>Danksagung</i>	81
11	<i>Lebenslauf</i>	82
12	<i>Eidesstattliche Erklärung</i>	83

1 Einleitung

1.1 Die koronare Herzkrankheit (KHK)

1.1.1 Epidemiologie

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind in der Bundesrepublik Deutschland wie auch in den meisten anderen Industrieländern die Haupttodesursache. Die Mortalität von kardiovaskulären Erkrankungen in Europa für Männer im Alter von 45 bis 74 Jahren schwankt von 1490/100000/Jahr in der Ukraine bis 330/100000/Jahr in Frankreich. In nahezu allen europäischen Ländern beträgt die kardiovaskuläre Mortalität 40 % der Gesamtmortalität. Bemerkenswert ist, dass in Westeuropa die Mortalitätsrate zwischen 1970 und 1992 sank, in den osteuropäischen Ländern und in den neuen Bundesländern der BRD dagegen anstieg [1].

In Deutschland sind etwa 40 % der Herzkreislauferkrankungen der KHK zuzurechnen. Mit zunehmendem Alter kommt es gleichzeitig zu einem kontinuierlichen Anstieg der Herzkreislauf Erkrankungen [2]. Die durchschnittlichen Kosten je KHK-Patient über die verbleibende Lebenszeit belaufen sich auf etwa 62.000 € und erhalten damit zunehmend gesundheitspolitische Bedeutung [3].

In Amerika beträgt die Prävalenz der KHK 26 % bei den 65- bis 69-jährigen Männern, bei den gleichaltrigen Frauen dagegen nur 12 % [4]. Nach einem 20-jährigen Verlauf wurde innerhalb der Framingham Studie eine Inzidenz der Angina pectoris von 0,8 % bei den 55- bis 64-jährigen Männern und 0,6 % bei den Frauen ermittelt [5].

Bei Patienten mit einer chronischen stabilen Angina pectoris beträgt die jährliche Mortalität etwa 2-3 % [6].

Nach Daten aus der Framingham Studie ist die Erstmanifestation der KHK bei 50 % der Männer ein Myokardinfarkt, bei fast 48 % der Frauen dagegen Angina pectoris.

1.1.2 Die koronare Herzkrankheit als komplexe genetische Erkrankung

Die koronare Herzkrankheit zählt zu den meistuntersuchten Krankheiten weltweit. Eine Vielzahl von Studien konnte belegen, dass sich die KHK als komplexe Erkrankung darstellt. Als multifaktorielle Krankheit wird sie sowohl durch Umweltfaktoren als auch von genetischen

Größen beeinflusst. Aus diesen vielfältigen Beziehungen zwischen Genotyp und Umwelteinflüssen entsteht ein komplexes Gebilde von Wechselwirkungen, was letztendlich zur Erkrankung oder Nichterkrankung des Individuums führt.

Es ist schon lange bekannt, dass die genetische Disposition bei Patienten mit KHK eine große Rolle spielt. Seit den 60er Jahren gilt eine positive Familienanamnese als Risikofaktor der KHK. Damals konnte gezeigt werden, dass Verwandte 1. Grades von betroffenen Patienten ein zwei- bis sechsfach erhöhtes Risiko gegenüber der entsprechenden Kontrollgruppe haben [7]. Die familiäre Häufung der KHK konnte anhand von weiteren Studien auch koronarangiografisch belegt werden [8]. Ergebnisse aus durchgeführten Zwillingsstudien offenbarten, dass die Konkordanzrate der KHK für monozygote Zwillinge höher ist, als für dizygoten Zwillinge [9].

Der genetische Hintergrund bei komplexen genetischen Erkrankungen spiegelt sich auch in den verschiedenen Risikofaktoren der Krankheit wider. Die Risikofaktoren Hypertonus, Adipositas und Diabetes mellitus sind selbst genetisch determiniert. Bisher wurden für alle drei Erkrankungen eine Vielzahl von Allelvariationen an verschiedenen Genorten beschrieben. Diese Variationen legen durch unterschiedliche Allelkombinationen den Einfluss des Risikofaktors für die KHK fest.

Umweltfaktoren wie Stress, Rauchen, mangelnde Bewegung und fettreiche Ernährung können eigenständig als Risikofaktoren wirken oder in Wechselwirkung mit den genetischen Faktoren die Erkrankung und die Schwere der Erkrankung beeinflussen.

1.1.3 Risikofaktoren

Die traditionellen Risikofaktoren wurden in der Framingham Studie ermittelt. Sie umfassen Gesamt- und LDL-Cholesterin, erhöhten Blutdruck und Blutzucker, Zigarettenkonsum und Alter des Patienten [10]. Das Framingham Score System bestimmt die individuellen Risikofaktoren, addiert sie und ermittelt so das Risiko, innerhalb der nächsten 10 Jahre an der KHK zu erkranken. Grundy et al. teilt die Risikofaktoren in drei Gruppen ein [11]. Die unabhängigen Hauptrisikofaktoren addieren sich laut der Framingham Heart Studie in ihrer Stärke in Bezug auf die Vorhersagbarkeit [10].

Der Hypertonus, die Hypercholesterinämie und der Diabetes mellitus gelten als

Haupttrisikofaktoren und sind in besonderem Maße auch von genetischen Gegebenheiten abhängig.

Der Hypertonus stellt einen Haupttrisikofaktor in der Entwicklung kardiovaskulärer und renaler Erkrankungen, insbesondere für den Schlaganfall, die Atherosklerose und die koronare Herzkrankheit dar [12,13]. Die Hypertonie beschleunigt sowohl den atherosklerotischen Prozess als auch die, durch den erhöhten Druck hervorgerufene Dilatation und Ruptur kleinerer und größerer Gefäße [14]. Die Prävalenz beträgt etwa 10-25 % in der Normalbevölkerung [15]. In der Bevölkerung der Industriestaaten konnte anhand verschiedener Studien gezeigt werden, dass der Blutdruck in Abhängigkeit vom Alter ansteigt [16,17]. In der Framingham Studie war die Inzidenz einer koronaren Herzkrankheit bei Männern im mittleren Alter mit hypertonen Blutdruckwerten ($>160/95$ mmHg) fünfmal höher als bei normotensiven Männern ($\leq 140/90$ mmHg).

In der Entstehung eines Hypertonus spielt das Renin-Angiotensin-System eine entscheidende Rolle. Um einen genetischen Einfluss zu evaluieren, wurden eine Vielzahl von Polymorphismen in diesem Hormonsystem untersucht. So zeigte eine genetische Variante des Angiotensinconvertierenden Enzym (ACE) eine Assoziation zu salzsensitiven Hypertonikern [18]. Untersuchungen von genetischen Varianten der Angiotensin II Rezeptoren zum Hypertonus erbrachten unterschiedliche Ergebnisse [19].

Für die Entwicklung der Hypertonie spielen neben genetischen Faktoren auch Umweltfaktoren wie Salzaufnahme, Alkoholkonsum, Stress und mangelnde körperliche Bewegung eine entscheidende Rolle.

Die Hypercholesterinämie ist ein weiterer Haupttrisikofaktor für die KHK und geht eindeutig mit einer erhöhten Inzidenz der koronaren Herzkrankheit im jüngeren Lebensalter einher [20,21]. Obwohl es laut Framingham Studie keine kritischen Werte gibt, oberhalb derer eine steile Zunahme der Morbidität einsetzt, entstanden Empfehlungen zur Bewertung und Therapie von erhöhten Cholesterinwerten [20,22,23]. Menschen mit erhöhtem LDL-Cholesterol haben ein erhöhtes Risiko an der KHK zu erkranken. Laut der Lipid Research Clinic Prevalence Study haben weiße Männer mit einer KHK und einem LDL ≥ 160 mg/dl ein zwölfmal höheres Risiko an einer KHK zu sterben als Männer mit einer KHK und einem LDL von <130 mg/dl und ein fünfundzwanzigmal erhöhtes Risiko zu jenen, die keine KHK und ein LDL von <130 mg/dl

haben [24]. Die Scandinavian Simvastatin Survival Study konnte zeigen, dass Diabetiker behandelt mit Simvastatin eine größere Reduktion an KHK-Ereignissen aufweisen als Nichtdiabetiker [25].

In der Erforschung des Fettstoffwechsels entstanden sehr gute Untersuchungen zu den Polymorphismen des Apolipoprotein E (ApoE). Die drei Hauptallele des ApoE-Gens werden $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ und $\epsilon 4$ benannt. Das Allel $\epsilon 4$ ist mit einer erhöhten LDL-Cholesterinkonzentration und einem erhöhten KHK-Risiko assoziiert [26,27]. Die höchste Allelfrequenz des $\epsilon 4$ konnte in Finnland nachgewiesen werden, wo höchste Cholesterolverte und eine hohe KHK-Mortalität gefunden wurden [28].

Der Diabetes mellitus ist schon lange als unabhängiger Risikofaktor für Atherosklerose bekannt. Atherosklerose wiederum ist bei 50 % der Diabetiker die Todesursache [20,29]. In den USA leiden 5-10 % der Diabetiker am Typ I Diabetes. Die weltweite Inzidenz schwankt zwischen 0,1/100000 pro Jahr in China und Venezuela und 36,8/100000 pro Jahr in Sardinien und 36,5/100000 im Jahr in Finnland [30-32]. Der größte Teil der Diabetiker ist am Typ II erkrankt, der eine altersabhängig ansteigende Prävalenz aufweist. Für beide Arten des Diabetes scheinen genetische Faktoren eine bedeutende Rolle zu spielen. In Zwillingsstudien konnte gezeigt werden, dass bei monozygoten Zwillingen im Falle des Typ I Diabetes eine Konkordanz von 20-50 % vorlag [33-35]. Beim Diabetes vom Typ II lag die Konkordanzrate mit 55-100 % noch höher [35,36]. Für beide Diabetestypen ist eine heterogene Vielfalt an genetischen Varianten an der Erkrankung mitverantwortlich [37-40].

1.2 Das atriale natriuretische Peptid (ANP)

Das atrial natriuretic peptide (ANP) gehört neben dem brain natriuretic peptide (BNP), dem C-type natriuretic peptide (CNP), und dem dendroaspis natriuretic peptide (DNP) zur Familie der natriuretischen Peptide. Das ANP wurde 1981 von de Bold et al. in der Ratte entdeckt [41]. Das BNP und CNP wurden von Sudoh et al. beschrieben [42,43]. 1992 wurde von Schweitz et al. das DNP als viertes natriuretisches Peptid identifiziert [44]. Die Peptide weisen untereinander und zwischen verschiedenen Spezies eine große Strukturhomologie auf [45,46]. Das ANP des Menschen und der Ratte unterscheiden sich beispielsweise in nur einer Aminosäure [47].

1.2.1 Synthese und Freisetzung des ANP

Das ANP wird beim Menschen auf dem kurzen Arm des ersten Chromosoms durch drei Exons kodiert. Diese werden in m-RNA transkribiert und nach der Translation liegt das präpro-ANP vor [45,48-51]. Das humane präpro-ANP ist 151 Aminosäuren (AS) lang und enthält am N-terminalen Molekülende ein 24 AS langes Signalpeptid, das für den Transport des präpro-ANP über die Membran des endoplasmatischen Retikulums abgespalten werden muss [47,52]. Nach Abspaltung des Signalpeptides liegt pro-ANP vor, welches die Hauptspeicherform des ANP in den atrialen Granula darstellt [53,54]. Nach Spaltung dieses Moleküls entstehen der N-terminale Teil und das biologisch aktive α -ANP (Abbildung 1). Für die biologische Aktivität des aus 28 Aminosäuren bestehenden α -ANP ist eine intramolekulare Disulfidbrücke an den Positionen 7 und 23 von Bedeutung, die dem Peptid eine Ringstruktur gibt [47,55]. Inzwischen gibt es Hinweise, dass auch das N-terminale Aminosäurenprosegment und das pro-ANP biologische Funktionen haben [56,57].

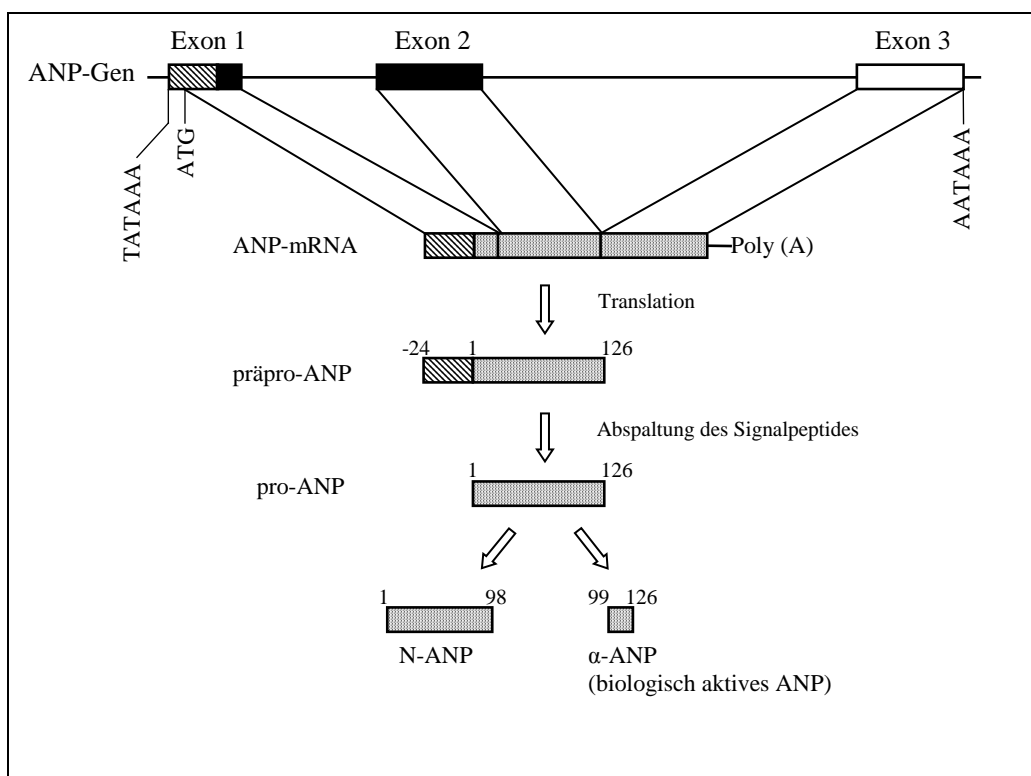


Abbildung 1: schematische Darstellung der ANP-Synthese

ANP wird hauptsächlich in den Vorhöfen produziert, die Ventrikel dagegen exprimieren das Peptid nur während der Fetalzeit und bei Erwachsenen während des Prozesses der Hypertrophie und im Remodelling [58-60]. Eine extrakardiale Expression des ANP konnte nachgewiesen werden. So sind Gehirn, Gefäße und Nieren in der Lage ANP zu synthetisieren, wenn auch in geringerem Maße als Kardiomyozyten [61,62].

Das in den Atrien synthetisierte ANP wird in seiner pro-Form in atrialen und in geringerer Menge in ventrikulären Granulae allein oder zusammen mit pro-BNP gespeichert [53,63,64]. Im Rahmen der Ausschüttung in den Kreislauf erfolgt die Spaltung in den N-terminalen Teil und das biologisch aktive aus 28 AS bestehende α -ANP. N-ANP ist wesentlich leichter zu bestimmen als α -ANP, da es eine signifikant längere Halbwertszeit besitzt und in bis zu fünfzigfach höherer Plasmakonzentration vorliegt [65]. Als Reiz für die akute Ausschüttung von ANP dient hauptsächlich die Dehnung der Vorhöfe, hervorgerufen durch einen Anstieg des intravaskulären Volumens. Weiterhin stimulieren Vasokonstriktoren wie Norepinephrin, Endothelin-1 und Angiotensin II die ANP-Transkription und -Sekretion. Adrenomedullin dagegen wirkt hemmend auf die ANP-Biosynthese [66-70].

1.2.2 Wirkungen des ANP

Die Wirkungen der natriuretischen Peptide werden durch die drei natriuretischen Peptidrezeptoren A, B, und C vermittelt. Die meisten der bekannten Effekte des ANP entstehen durch die Aktivierung des Rezeptors A (NPR-A) und werden über eine cGMP-abhängige Signalkaskade weitergeleitet. Eine Beendigung der ANP-Wirkung wird durch den Abbau mittels der neutralen Endopeptidase und des natriuretischen Peptidrezeptor C erreicht.

Die Ausschüttung des ANP als Antwort auf eine verstärkte Dehnung der Vorhöfe führt im Organismus zu einer verstärkten Diurese und Natriurese, verbunden mit einer Vasodilatation und daraus resultierendem Blutdruckabfall, sowie einem deutlichen Anstieg der cGMP-Konzentration im Urin [71-73]. Durch die Permeabilitätssteigerung des Gefäßendothels kommt es zu einer Verschiebung von Flüssigkeit aus dem intravaskulären Raum in die extravaskuläre Komponente [74]. In hämodynamischen Versuchen am Tiermodell zeigte sich, dass ANP in geringen Dosen den Blutdruck hauptsächlich über eine Reduktion des systemischen Gefäßwiderstandes senkt [75-77]. In den Nieren führt ANP durch Dilatation der afferenten

Arteriolen und Konstriktion der efferenten Arteriolen zu einem Ansteigen der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und verhindert die Reabsorption von Salz im proximalen und distalen Tubulus [78-81]. Das Peptid relaxiert durch erhöhte cGMP-Konzentration die Mesangiumzellen und führt dadurch zu einer vergrößerten effektiven Oberfläche für die Filtration [82,83]. Das renale Ansprechen auf natriuretische Peptide verschlechtert sich im Verlauf der chronischen Herzinsuffizienz, auch wenn die Plasmakonzentration des ANP ansteigt. Der erhöhte ANP-Spiegel korreliert mit der Schwere der Herzinsuffizienz, und ist ein wertvoller Marker für die individuelle Diagnose, Prognose und Risikoeinschätzung des Patienten [60,84]. Weitere wichtige Wirkungen von ANP sind die Inhibition der Synthese bzw. Freisetzung von Endothelin, Renin, Angiotensin und Aldosteron [71,85,86].

Neben diesen klassischen Effekten scheint das ANP als Neuromodulator in der zentralen Kontrolle von kardiovaskulären Funktionen involviert zu sein [87]. Die zentralen Einflüsse auf den Blutdruck entstehen durch Beeinflussung der Barorezeptoren [88], Senkung des Sympathikotonus im Hirnstamm und zentrale Hemmung auf das Durst- und Salzappetitverhalten [89-91]. In klinischen Untersuchungen fand man einen erhöhten Plasma ANP-Spiegel bei Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt [92,93]. Darauf aufbauend konnte die SAVE-Studie den Plasma ANP-Spiegel als Prädiktor für die kardiale Mortalität bei asymptomatischen Patienten mit linksventrikulärer Dysfunktion nach akutem Myokardinfarkt bestimmen [94]. In der CONSENSUS II-Studie war der ANP-Spiegel nach dem Myokardinfarkt stark mit der späteren kardiovaskulären Mortalität assoziiert [95]. Sowohl in der SAVE- als auch in der CONSENSUS II-Studie korrelierte der ANP-Spiegel signifikant mit der linksventrikulären Dysfunktion. Spätere Daten der SAVE-Studie zeigten N-ANP als stärkeren Prädiktor für den kardiovaskulären Tod nach Myokardinfarkt als Alter, früherer Infarkt oder Ejektionsfraktion [96].

Experimentelle Studien untersuchten an Rattenzellkulturen die Wirkungen des ANP und fanden antihypertrophe Effekte auf glatte Gefäßmuskel- und Endothelzellen [97]. Weiterhin konnte eine apoptotische Wirkung des ANP auf Gefäßendothelzellen und neonatalen Kardiomyozyten und eine Inhibition der DNA-Synthese in kardialen Fibroblasten nachgewiesen werden [98-100].

Im Tiermodell senkten hohe ANP-Dosen nicht nur den zentralen Venendruck und die Herzfrequenz, sie reduzierten gleichzeitig auch die Größe des Schlaganfallareals [101,102]. Auf

weitere Studien über die Verbindung des ANP und dem Schlaganfall am Menschen wird im Folgenden noch genauer eingegangen.

1.2.3 Bedeutung natriuretischer Peptide für atherosklerotische Erkrankungen

Neuere Untersuchungen erhärten den Verdacht, dass ANP in der Pathogenese der Atherosklerose eine wichtige Rolle spielt. An Kulturen von Gefäßzellen wurde gezeigt, dass ANP durch Hemmung der Mitogenese eine antiproliferative Wirkung auf Blutgefäße besitzt [96,97]. Bei der Transfektion eines ANP-Vektors in Endothelzellen und glatte Gefäßmuskelzellen reduzierte sich die DNA-Synthese [103]. ANP inhibiert ebenfalls die DNA-Synthese in myokardialen Fibroblasten [98].

Verstärkt wurde die Hypothese, dass die natriuretischen Peptide einen entscheidenden Einfluss auf die Entstehung und Entwicklung von atherosklerotischen Plaques haben, als mit Hilfe immunhistochemischer Untersuchungen an menschlichen Herzkranzgefäßen der Nachweis von natriuretischen Peptiden innerhalb atherosklerotischer Plaques gelang [104].

Eine Tiermodellstudie und eine humane Assoziationsstudie legten eine Rolle des ANP-Gens in der Pathogenese des ischämischen Schlaganfalls nahe. Als Tiermodell diente eine Kreuzung von zwei selektiv gezüchteten Rattenstämmen, den „stroke-prone spontaneously hypertensive rats“ (SHRSP) und den „stroke-resistant spontaneously hypertensive rats“ (SHR) [105]. Es wurden im ANP-Gen dieser Ratten zwei Mutationen gefunden. Die Mutation in der codierenden Region führte zu einer veränderten Verarbeitung des pro-ANP und zu einer erhöhten cGMP-Produktion. Eine weitere Studie konnte im entsprechenden Tiermodell eine erniedrigte ANP-Produktion mit einem früheren Auftreten des Schlaganfalls in Verbindung bringen [106]. Die reduzierte ANP-Transkription im Zusammenhang mit der bekannten proapoptotischen Wirkung könnte den protektiven Effekt dieses Gens gegenüber der Schlaganfallentwicklung bei Ratten erklären.

Es wurde versucht, die im Tiermodell gefundenen Beobachtungen für den Menschen zu bestätigen. Obwohl eine direkte Verbindung bisher nicht nachgewiesen werden konnte, wurde vermutet, dass der erhöhte ANP-Spiegel bei der Pathogenese des Schlaganfalls eine Rolle spielt [107]. Mehr Unterstützung für die potente Rolle des ANP in cerebrovaskulären Erkrankungen kam von einer genetischen Assoziationsstudie [108]. Hier konnte eine signifikante Assoziation

zwischen dem Auftreten des Schlaganfalls und den bekannten Polymorphismen im zweiten Intron (G1837A) und dritten Exon (T2238C) sowie einem neu entdeckten Polymorphismus im ersten Exon (G664A) gezeigt werden. Für Träger des Exon 1 Polymorphismus zeichnete sich unabhängig von anderen Risikofaktoren ein doppelt so hohes Risiko für das Auftreten eines Schlaganfall ab.

Eine weitere humane Assoziationsstudie konnte einen Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus im dritten Exon bei Überlebenden nach Myokardinfarkt und bei Patienten mit einer koronaren Mehrgefäßerkrankung belegen [109].

1.2.4 Polymorphismen des ANP-Gens

In den vergangenen Jahren wurden mehrere Polymorphismen im ANP-Gen des Menschen beschrieben. Bisher sind mehr als zehn verschiedene Polymorphismen bekannt und einige von ihnen wurden im Rahmen von Fall-Kontroll-Studien auf eine mögliche Assoziation mit verschiedenen Krankheitsbildern genauer untersucht. Im Folgenden wird auf die in dieser Arbeit untersuchten Polymorphismen näher eingegangen.

Der Polymorphismus G664A führt im ersten Exon zu einer Valin-Methionin Substitution im proANP-Peptid und konnte mit Hilfe der „single strand confirmation polymorphism“ (SSCP)-Untersuchung nachgewiesen werden [108]. Rubattu et al. beschreiben hier eine positive Assoziation zwischen diesem Polymorphismus und der Schlaganfallinzidenz beim Menschen sowie eine positive Assoziation zwischen dem bereits bekannten HpaII-Polymorphismus und dem Schlaganfall.

Der Polymorphismus C708T zeigt einen Austausch von Cytosin mit Thymin im ersten Intron des ANP-Gens [110]. Erstmals in einer SSCP-Untersuchung nachgewiesen, konnte später ein Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) für das Enzym BstXI nachgewiesen werden. Ein Zusammenhang zwischen diesem Polymorphismus, der Mikroalbuminurie und einem erniedrigten ANP-Spiegel im Blut wurde von Nannipieri et al. gefunden [111,112].

Der Polymorphismus G1837A stellt einen RFLP für die Restriktionsendonuklease HpaII dar und findet sich im zweiten Intron [113]. An der Basenposition 1837 des ANP-Gens befindet sich entweder Guanin oder Adenin, was zur An- bzw. Abwesenheit einer Schnittstelle für HpaII

führt. Eine starke Assoziation zwischen diesem Polymorphismus und der Prävalenz der arteriellen Hypertonie fand sich in der Population schwarzer Amerikaner [114]. Dieser Zusammenhang konnte in weiteren Untersuchungen anderer Studiengruppen nicht bestätigt werden [115]. Weitere Studien zur Assoziation des HpaII-Polymorphismus mit der diabetischen Nephropathie und dem salzsensitiven Bluthochdruck verliefen ebenfalls negativ [116,117]. Allerdings war die Frequenz der HpaII-Allelvariante in einer Kohorte von Hypertonikern in Deutschland höher als in anderen normotensiven europäischen Populationen [118].

Der Polymorphismus T2238C ist als weitere bialele Variante des ANP-Gens im dritten Exon gelegen [119,120]. Durch den Austausch von Thymin mittels Cytosin kommt es zum Verlust des natürlicherweise vorkommenden Stopcodons. Dieser Verlust führt zu einer Verlängerung des humanen ANP um zwei Aminosäuren. Die genetische Detektion des mutierten Stopcodons ist durch den Verlust einer Schnittstelle für das Enzym ScaI möglich. Obwohl das gemeinsame Auftreten des HpaII- und des ScaI-Polymorphismus bei hypertensiven Schwarzamerikanern signifikant häufiger vorkommt als bei normotensiven, konnte keine Assoziation zwischen der Hypertonieprävalenz und dem ScaI-Polymorphismus allein festgestellt werden [114]. Wie oben bereits erwähnt, zeigte eine weitere Studie eine höhere Inzidenz des TT-Genotypen bei Patienten mit nichttödlichem Myokardinfarkt und auch bei Patienten mit einer koronaren Mehrgefäßerkrankung [109].

Die folgende schematische Darstellung soll die Lage der Polymorphismen innerhalb des ANP-Gens verdeutlichen (Abbildung 2).

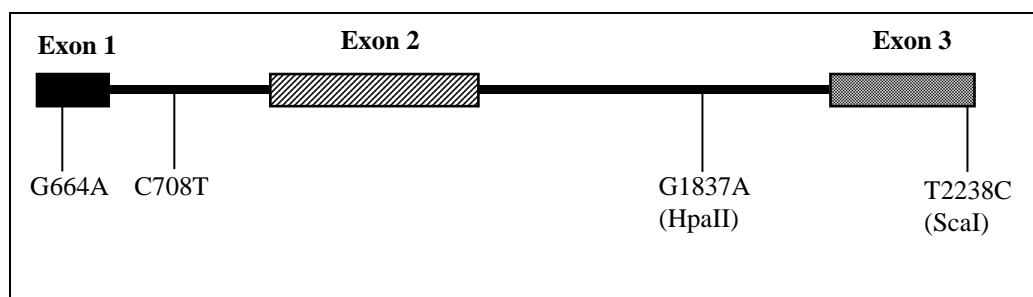


Abbildung 2: Lage der untersuchten Polymorphismen auf dem ANP-Gen

Die nachfolgende Tabelle 1 zeigt eine Liste der untersuchten Polymorphismen mit

Identifikationsnummer und Lokalisation (Intron, Exon). Die letzte Spalte gibt an, ob der Polymorphismus im HapMap-Project (The International HapMap Consortium, 2005) genotypisiert wurde.

Polymorphismus	ID	Lokalisation	HapMap-SNP
G664A	rs5063	1. Exon	X
C708T	rs5064	1. Intron	X
G1837A		2. Intron	
T2238C	rs5065	3. Exon	X

Tabelle 1: Übersicht der untersuchten Polymorphismen

1.3 Assoziationsstudien zur Analyse komplexer genetischer Erkrankungen

Bei vielen komplexen Erkrankungen wird eine Vererbbarkeit angenommen, obwohl sie keine typische Vererbung im Sinne der Mendelschen Gesetze aufweisen. Hier kommt es in der Krankheitsentstehung zu einem Zusammenspiel von mehreren Polymorphismen in verschiedenen Genen und exogenen Faktoren. Diese genetisch komplexen Krankheiten hängen von zwei oder mehr verdächtigen Genloci ab. Befinden sich diese Gene auf einem Chromosom, weichen sie von der Mendelschen Regel der unabhängigen und freien Rekombinierbarkeit der Gene ab und werden als Kopplung zusammen vererbt. Allerdings kann es durch das Phänomen des Crossing over während der Rekombinationsphase zum Aneinanderlagern homologer Chromosomenpaare und zu einem Austausch von DNA-Abschnitten kommen. Das bedeutet, dass das Gesetz der Kopplung nicht in jedem Fall gilt. Diese Rekombination zwischen zwei Genen tritt umso seltener auf, je enger beide Genloci auf dem Chromosomenabschnitt beieinander liegen.

Bei Kopplung zwischen einem Markerallel und einem Krankheitsallel wird davon ausgegangen, dass beide Allele so dicht beieinander liegen, dass sie nahezu immer zusammen vererbt werden. Die heutzutage verwendeten Markersysteme bedienen sich sogenannter Mikrosatelliten und „single nucleotide polymorphisms“ (SNPs), welche im Rahmen des Human Genom Project in dichten Abständen über das gesamte Genom entdeckt wurden.

Bei der Suche nach Chromosomenregionen, die eine funktionsrelevante DNA-Variante enthalten, werden in der genetischen Epidemiologie Kopplungs- und Assoziationsstudien verwendet. Der Kopplungs- oder Segregationsanalyse bedient man sich, um die Kandidatengene innerhalb einer Familie zu ermitteln. Es wird getestet, ob in der Familie das Markerallel überzufällig oft zusammen mit einer Krankheit vererbt wird. Um ein solches Allel erkennen zu können, sollte die Mehrzahl der Personen heterozygot am Markerloкус sein. Nur bei diesen Personen kann man das Phänomen der Rekombination beobachten.

Nach einer erfolgreichen Kopplungsanalyse ist es Aufgabe der Assoziationsstudie, das Markerallel in einer Population auf Assoziation mit einer Krankheit zu untersuchen. Es wird geprüft, ob das Markergen innerhalb einer Fallgruppe häufiger (oder weniger häufig) vorkommt als in der Kontrollgruppe. Wenn eine signifikante Assoziation nachgewiesen wird, ist entweder das Markerallel selbst oder als Kopplungsgruppe zu dem Krankheitsallel mit der Erkrankung verbunden. Ein Vorteil dieser Fall-Kontroll-Studien liegt in der relativ einfachen und kostengünstigen Durchführbarkeit der Methode, Assoziationen aufzudecken. Markersysteme dagegen stehen mit Hilfe des Human Genom Projects in riesiger Auswahl zur Verfügung und zusammen mit der rasanten Technologisierung im Bereich der Molekularbiologie wurde es möglich, relativ preiswert und gleichzeitig qualitativ hochwertig, große Stückzahlen an Proben zu generieren und zu genotypisieren. In einer 1996 veröffentlichten Modellrechnung wurde gezeigt, dass sich schwache Geneffekte am besten durch Assoziationsstudien nachweisen lassen [121]. Mithilfe einer Kopplungsanalyse würde dieser Nachweis nur mit einem unrealistisch großen Stichprobenumfang gelingen.

Assoziationsstudien bergen die Gefahr des Vertrauensverlustes, wenn die Assoziation in weiteren Studien nicht bestätigt werden kann oder sogar widerlegt wird. Dabei werden Vergleiche zwischen Assoziationsstudien durch unterschiedliche Charakterisierung des zu untersuchenden Phänotyp der Krankheit oder ungleiche Definition der Fall- und Kontrollgruppen zwischen den verschiedenen Studien erschwert. Weiterhin können durch verschiedene ethnische Populationen Unterschiede im genetischen Background bestehen. Zu benennen sind auch methodische Schwierigkeiten, wie ungenügend große Fallzahlen oder Verlust der Spezifität [121]. Als Folge davon gibt es für viele Markerallele positive und negative Ergebnisse. Trotzdem bleiben Assoziationsstudien die vielleicht tragfähigste und praktikabelste Möglichkeit zu untersuchen, ob ein bestimmtes Gen mit einem klinisch relevanten Phänotyp in einer bestimmten

Population assoziiert ist.

Worüber eine Assoziationsstudie dagegen keine Aussagen machen kann, ist die Frage nach einer pathologischen oder pathophysiologischen Verbindung zwischen den Umweltfaktoren, dem spezifischen Umweltfaktor und der Krankheit. Eine solche Verbindung herzustellen, ist die Aufgabe weiterer molekulargenetischer Studien mit Hilfe von invitro-Studien und transgenen Tiermodellen [122].

Diese oben genannten Schwierigkeiten machen eine gründliche Planung hinsichtlich der Repräsentativität und Größe des ausgewählten Kollektivs der Kontrollpersonen und der Erkrankten erforderlich. Eine homogene Zusammensetzung des Studienkollektivs ist wichtig, um eine Populationsstratifikation und somit falsch positive Ergebnisse zu vermeiden. Der Auswahl der Kontrollgruppe kommt dabei ein besonderer Stellenwert zu. Selbstverständlich sollte das Markerallel in einem plausiblen biologischen Zusammenhang zur untersuchten Krankheit stehen. Daneben ist eine präzise Definition des Phänotypen wichtig. Zusätzlich wird bei gefundener Assoziation eine Bestätigung in einer zweiten unabhängigen Studie gefordert, wobei Assoziation mindestens einmal in einer familienbasierten Assoziationsstudie beobachtet werden sollte.

1.4 Fragestellung

In der vorliegenden Promotionsarbeit soll der Stellenwert von vier bekannten Polymorphismen des ANP-Gens (C664A, C708T, G1837A, T2238C) bei der koronaren Herzkrankheit untersucht werden. Dafür wurde eine humane Assoziationsstudie in Form einer Fall-Kontroll-Studie mit Probanden aus dem mitteldeutschen Raum durchgeführt. Folgende Fragestellungen standen bei der Arbeit im Vordergrund:

1. Gibt es beim Vergleich der Allel- und Genotypfrequenzen der untersuchten Polymorphismen Unterschiede zwischen den Koronarpatienten und der Kontrollgruppe?
2. Lassen sich Assoziationen der analysierten Genotypen zu dem Risikofaktor arterieller Hypertonus erkennen?
3. Zeigen die analysierten Genotypen einen Zusammenhang zur Ejektionsfraktion?

Bisher gibt es nur wenige Daten über den Einfluss von Polymorphismen des ANP-Gens auf den ANP-Spiegel in einer europäischen Kohorte oder bei Probanden mit einer koronaren Herzerkrankung. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit neben den Polymorphismen bei allen Probanden der Plasma ANP- und cGMP-Spiegel bestimmt und zusätzlich folgende Fragen formuliert:

4. Haben Koronarpatienten einen veränderten ANP-, cGMP-Spiegel und eine veränderte cGMP/ANP-Ratio gegenüber den Probanden der Kontrollgruppe?
5. Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Ejektionsfraktion und dem ANP-, cGMP-Gehalt im Blut und deren entsprechender Ratio?
6. Zeigen die analysierten Genotypen einen Zusammenhang zum ANP-Spiegel im Blut?

2 Material und Methoden

2.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs

Eingeschlossen in unsere Studie wurden männliche und weibliche Patienten, die in der Zeit von 1996 bis 2000 erstmals koronarangiografisch mit dem Verdacht auf eine koronare Herzkrankheit in der Franz-Volhard-Klinik untersucht wurden. Alle Patienten, die aus anderen Indikationen heraus koronarangiografisch untersucht wurden, waren von der Studie ausgeschlossen. Ein der Studie entsprechender Antrag wurde der Ethikkommission vorgelegt und bewilligt.

Die Aufklärung der Patienten erfolgte in schriftlicher Form und einem erläuternden Gespräch. Alle Patienten haben nach der Aufklärung über Ablauf und Ziel der Studie ihr schriftliches Einverständnis zum Studieneinschluss und zur Blutentnahme gegeben. Alle Patienten waren weiße Europäer (Kaukasier).

2.1.1 Charakterisierung der Fall- und Kontrollgruppe

Um ein möglichst aussagefähiges Ergebnis zu erhalten, war es notwendig die Phänotypen der Fall- und Kontrollgruppe streng zu definieren und zu trennen.

Für die Aufnahme in die Fallgruppe war mindestens eine Eingefäßerkrankung mit einer hämodynamisch relevanten Stenose von mindestens 50 % oder eine Zwei- bzw. Dreigefäßerkrankung erforderlich. Diese Befunde entsprechen der Diagnose der koronaren Herzkrankheit.

Die Kontrollgruppe wurde folgendermaßen definiert: Es wurden nur Patienten mit koronarangiografisch unauffälligen Herzkranzgefäßen aufgenommen. Alle Patienten mit beginnenden Veränderungen an den Gefäßen, wie z.B. Plaques und geringgradigen Koronarstenosen konnten nicht in diese Gruppe aufgenommen werden.

2.2 Studienaufbau

Die Rekrutierung der Probanden begann im Dezember 2000 und war im Juli 2001 abgeschlossen. Nach erfolgter Aufklärung der Patienten und Zustimmung zur Aufnahme in die Studie wurde eine einmalige venöse Blutentnahme für die DNA-Polymorphismusanalyse und

der Bestimmung des ANP- und cGMP-Plasmaspiegels vorgenommen. Das Blut wurde zentrifugiert, aliquotiert und anschließend bei -80 °C tiefgefroren.

2.2.1 Patientenrekrutierung

Mit Hilfe des Dokumentationssystems Heartware 1.0v3 der Franz-Volhard-Klinik konnten alle Patienten ermittelt werden, die in den vergangenen Jahren eine Herzkatheteruntersuchung erhielten. Der Befund dieser Untersuchung bildete die Grundlage für den Ein- oder Ausschluss in die Studie und die weitere Einteilung in die Fall- oder Kontrollgruppe.

Mit Hilfe der Software konnten zu den Patientendaten, das Geschlecht, der Herzkatheterbefund und die Risikofaktoren Hypertonie, Diabetes mellitus und Hyperlipidämie in Form von Ja/Nein-Angaben zum Zeitpunkt der Untersuchung erfasst werden.

Alle noch lebenden Patienten mit vorhandener Postadresse wurden mit einer kurzen Beschreibung der Studie nach telefonischer Terminvergabe in die Klinik einbestellt. Der Rücklauf betrug 20 %.

2.3 Die Diagnosesicherung der KHK mit der Koronarangiografie

Die Herzkatheteruntersuchung ist die derzeitige Standarduntersuchungsmethode bei der Diagnostik der koronaren Herzkrankheit [123,124]. Als Indikationen für diese Untersuchung gelten die Empfehlungen der European Society of Cardiology [125]. Die angiografische Darstellung eines veränderten Gefäßlumens ist der beste Nachweis einer Arteriosklerose. Ausdehnung und Schweregrad einer koronaren Herzkrankheit lassen sich objektivieren. Nur die genaue Kenntnis von Lokalisation und Ausmaß der Stenosen kann über die Art und Notwendigkeit von katheterinterventionellen oder chirurgischen Revaskularisationsmaßnahmen Auskunft geben.

Neuere pathologisch-anatomische Studien und intravaskuläre Ultraschalluntersuchungen haben gezeigt, dass das Ausmaß der Plaques bei der Koronarangiografie unterschätzt werden kann [126]. Trotz der technischen Fortschritte in der Computertomografie, in der Magnetresonanztomografie und im intravaskulären Ultraschall, ist die Koronarangiografie

weiterhin die Standardmethode zum Darstellen der Koronaranatomie [6].

2.4 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte vormittags von 8.00 - 12.00 Uhr. Peripheres Venenblut wurde vom sitzenden Patienten in ein 10 ml EDTA Blutröhrchen abgenommen. Das Blutröhrchen wurde bei 4 °C und 5000 U/min für 15 min. zentrifugiert und anschließend der Plasmaüberstand in 1 ml Fraktionen in 5 x 1,5 ml Eppendorfgefäße pipettiert. Das Erythrozytenkonzentrat wurde ebenfalls in 5 x 1,5 ml Eppendorfgefäße zu je 1 ml überführt und sofort bei -80 °C eingefroren.

2.5 DNA-Polymorphismusanalyse

Die DNA-Polymorphismusanalyse kann in folgende Abschnitte untergliedert werden: Als erstes erfolgte die DNA-Präparation. Nachfolgende Arbeitsschritte waren die Polymerasekettenreaktion (PCR) mit anschließendem Restriktionsverdau für die Polymorphismen im 2. Intron (G1837A) und 3. Exon (T2238C). Der Nachweis der Polymorphismen des 1. Exons (G664A) und 1. Introns (C708T) erfolgte durch Generieren eines gemeinsamen PCR-Fragmentes und anschließender Sequenzierung.

2.5.1 DNA-Präparation

Für die DNA-Präparation wurde ein 1 ml Alliquot des EDTA Blutes von -80 °C aufgetaut und davon 200 µl entnommen. Zur Extraktion diente der Invisorb[®] Spin Blood Kit von Invitek (Invitek GmbH, Berlin, Deutschland). Das Vorgehen entsprach dem vorgegebenen Problemprotokoll: DNA-Extraktion aus 100 µl - 200 µl alten gefrorenen Blutproben sowie Blutproben von Spezies mit einem hohen Erythrozytengehalt. Die gewonnene DNA wurde in 200 µl Elution Buffer D aufgelöst. Eine nachfolgend durchgeführte Agarosegelelektrophorese mit Ethidiumbromidfärbung demonstrierte unter UV-Licht sowohl die Reinheit als auch die Quantität der Proben. Zur Quantitätsbestimmung diente eine Standard-DNA von 25 ng/µl.

2.5.2 Polymerasenkettenreaktion (PCR)

Die Polymerasenkettenreaktion ist ein teilweise automatisiertes enzymatisches In-vitro-Verfahren zur Amplifizierung von Nukleotidsequenzen. Es wurden die Gensequenzen mit dem jeweils interessierenden Polymorphismus amplifiziert. Für die nachfolgende Sequenzierung und für den Restriktionsverdau bildete die PCR die Voraussetzung.

Die für die PCR notwendigen Primer wurden von der Firma Biotex (Berlin-Buch, Deutschland) hergestellt. Alle weiteren Komponenten für die PCR und des Restriktionsverdaus wurden von der Firma Promega (Mannheim, Deutschland) bezogen. Für sämtliche PCRs und den Restriktionsverdau wurde der Peltier Thermocycler PTC-225 (MJ Research) verwendet. Alle Agarosegele wurden mit Hilfe der Gelauswerteeinheit „Biometra BioDoc Analyze“ (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland) dokumentiert.

Die Sequenzen der verschiedenen Primer sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

Polymorphismus	Bezeichnung	Sequenz
G664A / C708T	G664A S4	5`- CAGACGTAGGCCAAGAGAGG
	G664A AS2	5`- GGGCACGACCTCATCTTCTA
G1834A (HpaII)	G1837A S2	5`- AGACCATCCTGGCTAACACG
	G1837A AS2	5`- GAGCCTCTTGCAGTCTGTCC
T2238C (ScaI)	T2238C S2	5`- GCCAAGTTATCTTTGCATGG
	T2238C AS2	5`- CTGCAGCTTAGATGGGATGA

Tabelle 2: Sequenzen der verwendeten Primer für die verschiedenen PCRs

In Tabelle 3 sind die verwendeten Reaktionsansätze der einzelnen PCRs dargestellt. Die Amplifikationsbedingungen für die durchgeführten PCRs sind in der Tabelle 4 aufgeführt.

	G664A / C708T	G1837A (HpaII)	T2238C (ScaI)
10x PCR Reaction Buffer	7,5 µl	5 µl	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4,5 µl	3 µl	5 µl
dNTPs (10 mM jedes dNTP)	1,5 µl	1 µl	1 µl
Primer sense (10 µM)	1,5 µl	0,5 µl	1 µl
Primer antisense (10 µM)	1,5 µl	0,5 µl	1 µl
Taq (5 U/µl)	0,4 µl	0,25 µl	0,25 µl
DNA	4 µl	3 µl	3 µl
ddH ₂ O, nucleasefrei	54,1 µl	36,75 µl	33,75 µl
Gesamtvolumen	75 µl	50 µl	50 µl

Tabelle 3: Darstellung der verwendeten Reagenzien für die verschiedenen PCRs

	G664A / C708T	G1837A (HpaII)	T2238C (ScaI)
1. Initiale Denaturierung	5 Min. 94 °C	5 Min. 94 °C	5 Min. 94 °C
2. Annealing	60 Sek. 57 °C	60 Sek. 65 °C	60 Sek. 55 °C
3. Extension	90 Sek. 70 °C	90 Sek. 70 °C	90 Sek. 70 °C
4. Denaturierung	60 Sek. 94 °C	60 Sek. 94 °C	60 Sek. 94 °C
Zyklenzahl (2.-4.)	34	30	34
abschließende Extension	10 Min. 72 °C	10 Min. 72 °C	10 Min. 72 °C
Ende	4 °C	4 °C	4 °C

Tabelle 4: Amplifikationsbedingungen der verschiedenen PCRs

2.5.3 Sequenzierung

Die DNA-Sequenzanalyse erfolgte nach dem Kettenabbruchverfahren von Sanger et al. [127]. Zunächst erfolgte die Amplifikation des zu untersuchenden Genabschnittes mit der zuvor beschriebenen PCR für die Polymorphismen G664A und C708T. Nach erfolgreicher PCR erfolgte ein Aufreinigungsschritt zur Entfernung überschüssiger Primer und nicht gebundener Desoxynukleotidtriphosphate (dNTP). Verwendet wurden hierfür die hydrolytischen Enzyme Exonuklease I (ExoI) und Shrimp-Alkaline-Phosphatase (SAP).

Anschließend erfolgte die Sequenzreaktion mit dem BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit der Firma Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland). Dieser Kit enthält unter anderem ein Gemisch aus dNTPs, mit BigDye-Farbstoffen markierten ddNTPs und die AmpliTaq DNA-Polymerase. Als Sequenzierprimer wurden die Primer der PCR verwendet und hiervon jeweils 2,5 pmol eingesetzt. Vom PCR-Produkt wurden 40 ng zur Sequenzierung benötigt.

Die Sequenzierreaktion wurde im Peltier Thermocycler PTC-225 (MJ Research) mit 31 Zyklen nach folgenden Angaben durchgeführt:

Denaturierung	10 Sek. 96 °C
Annealing	5 Sek. 50 °C
Elongation	4 Min. 60 °C

Tabelle 5: Sequenzierreaktion für die Polymorphismen G664A/C708T

Das Endprodukt dieser Sequenzierungs-PCR wurde zunächst in einer Sephadex G 50[®] Säule aufgereinigt. Anschließend wurde die Kapillar-Gelelektrophorese durch die automatische Sequenzierereinrichtung (ABI 3730 xl Analyser, Applied Biosystem, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe der zugehörigen Sequence Analysis Software und des Chromas Programm 2.13 (Queensland, Australien).

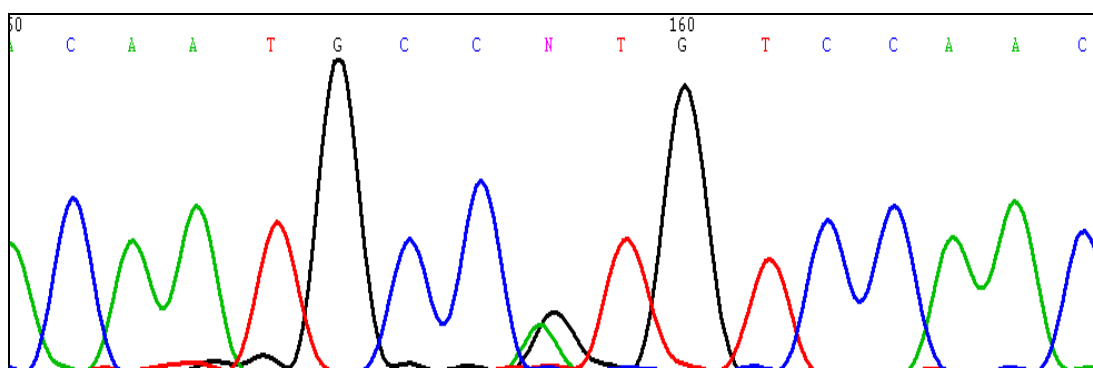


Abbildung 3: Sequenzausschnitt mit einem heterozygoten Genotyp für den Polymorphismus G664A

2.5.4 Restriktionsverdau

2.5.4.1 Polymorphismus G1837A (HpaII)

Zur Identifizierung des Polymorphismus G1837A diente das Schnitzenzym HpaII. Die Länge des zuvor generierten PCR-Produktes betrug 590 Basenpaare. In diesem Fragment liegen je nach Genotyp zwei beziehungsweise drei Schnittstellen für HpaII. Folgende Tabelle 6 dient zur Übersicht der verschiedenen Schnittfragmente des generierten PCR-Produktes, wobei die Anzahl der „+“ die Stärke des Signals unter UV-Licht symbolisiert.

	G1837G	G1837A	A1837A
41 bp	++	+	
94 bp	++	++	+
180 bp	++	++	+
281 bp	++	+	
322 bp		+	+

Tabelle 6: Fragmentlängen des HpaII-Verdau für die möglichen Genotypen

Der 50 µl Reaktionsansatz für den Verdau wurde wie folgt zusammengestellt: 4 µl des Puffers A, 4 µl 1:10 verdünntes BSA, sowie 2 µl HpaII-Restriktionsenzym wurden zu 10 µl ddH₂O und 20 µl des zuvor generierten PCR-Produktes gegeben. Der Verdau erfolgte über 2 h bei 37 °C mit anschließender Inaktivierung des Enzyms durch Erwärmung auf 65 °C für 15 Minuten.

Zur bildlichen Darstellung wurden 18 µl des Reaktionsansatzes mit 3 µl loading puffer auf ein 2,0 %iges mit Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde mit 90 V durchgeführt. Die nachfolgende Abbildung zeigt die verschiedenen Fragmentgrößen der Gelelektrophorese nach 1 Stunde und 30 Minuten.

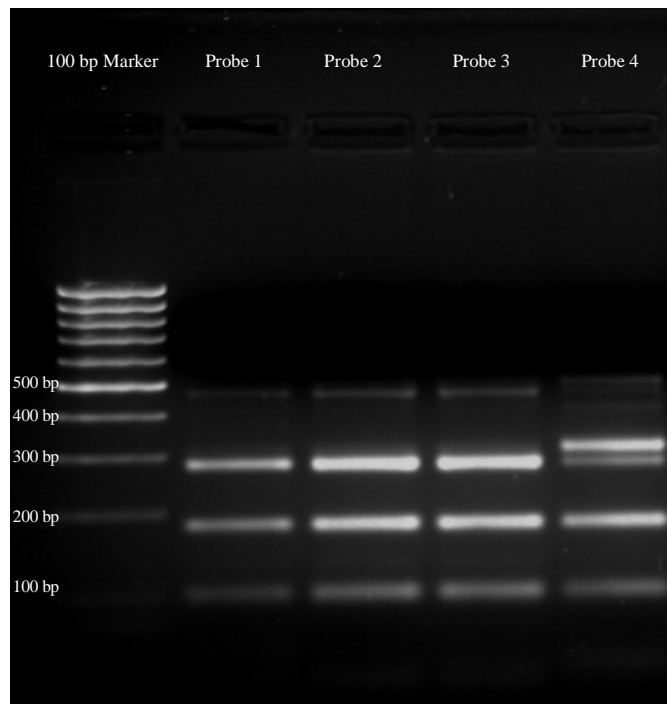


Abbildung 4: Gelelektrophorese nach dem HpaII-Restriktionsverdau. Die Proben 1-3 entsprechen dem Genotyp G1837G. Probe 4 stellt den Genotyp G1837A dar.

2.5.4.2 Polymorphismus T2238C (*ScaI*)

Für den Polymorphismus T2238C wurde das 403 Basenpaar lange PCR-Produkt mit dem Restriktionsenzym *ScaI* verdaut. Die durch den Verdau entstandenen Fragmente und ihre entsprechenden Genotypen zeigt die untenstehende Tabelle 7, wobei die Anzahl der „+“ die Stärke des Signals symbolisieren soll.

	T2238T	T2238C	C2238C
135 bp	++	+	
267 bp	++	+	
403 bp		+	++

Tabelle 7: Fragmentlängen des *ScaI*-Verdau für die möglichen Genotypen

Für den Verdau wurde ein 50 µl Reaktionsansatz mit folgenden Komponenten angesetzt: 4 µl Puffer K, 4 µl 1:10 verdünntes BSA, 2 µl Restriktionsenzym ScaI, 10 µl ddH₂O und 20 µl PCR-Produkt. Es wurde 2 Stunden bei 37 °C verdaut mit anschließender Enzyminaktivierung bei 65 °C für 15 Minuten. Anschließend wurden 20 µl des Reaktionsansatzes und 4 µl loading puffer in ein 2,0 %iges mit Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel appliziert. Eine Spannung von 90 V wurde für 1 Stunde 30 Minuten angelegt. Die Schnittmuster der 3 Genotypen stellt das folgende Foto dar (Abbildung 5).

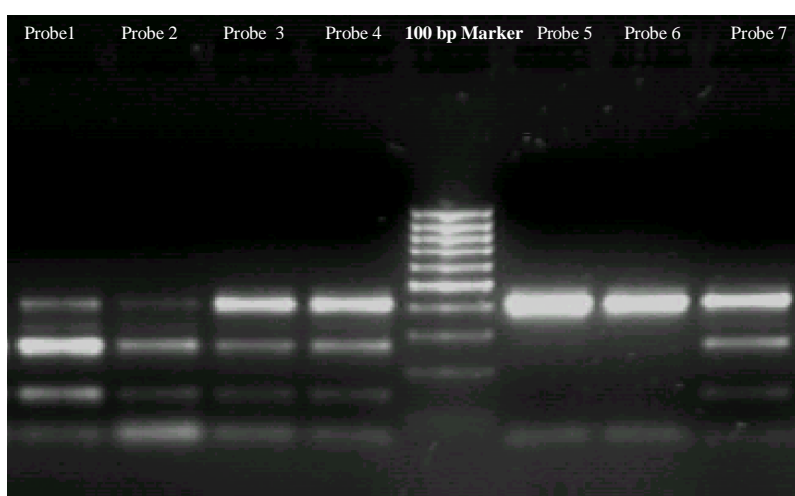


Abbildung 5: Gelelektrophorese nach dem ScaI-Restriktionsverdau. Die Proben 1 und 2 entsprechen dem Genotyp T2238T. Die Proben 3, 4 und 7 stellen den Genotyp T2238C dar und die Proben 5 und 6 entsprechen dem Genotyp C2238C.

2.6 Bestimmung des ANP-Spiegels im Blut

Die Blutproben wurden nach Abnahme in vorgekühlte EDTA-Röhrchen sofort abzentrifugiert und bei -80 °C bis zur Extraktion eingefroren. Die Plasmaextraktion erfolgte mit C18 Sep-Pak Säulen (Waters, Eschborn, Deutschland), die mit Acetonitril (Merck, Darmstadt, Deutschland) und Ammoniumacetat (0,2 %, pH 4.0, Merck, Darmstadt, Deutschland) aktiviert wurden. Nach der Methode von Gutkowska et al. wurde das Plasma über die Säulen gegeben und diese anschließend mit Ammoniumacetat gespült. ANP wurde mit Acetonitril (60 %) und Ammoniumacetat (40 %) eluiert [128]. Die Probenkonzentrationen wurden dann mit einem spezifischen Radioimmunoassay (RIA) unter Verwendung eines ANP-Antikörpers (J. Gutkowska, Montreal, Kanada) gemessen.

2.7 Bestimmung des cGMP-Spiegels im Blut

Für die Bestimmung der cGMP-Konzentration wurden die Plasmaproben mit Perchloressigsäure enteivweißt und cGMP mit Hilfe von Alumina- (AG7, Bio-Rad, Richmond, USA) und Dowex- (AG 50W-X8, Bio-Rad, Richmond, USA) Säulen extrahiert. Anschließend wurde durch einen Radioimmunoassay mit einem anti-cGMP-Antikörper (P. Hamet, Montreal, Kanada) die cGMP-Konzentration bestimmt [129].

2.8 Kopplungsungleichgewicht

Die Überprüfung auf ein Kopplungsungleichgewicht erfolgte durch das Programm HAPLOVIEW (Broad Institute of MIT and Harvard, USA). Dieses Programm untersucht Zusammenhänge zwischen SNPs, die durch Kopplung bedingt sind. Dabei identifiziert HAPLOVIEW Gruppen von SNPs, die einen mehr oder weniger starken Zusammenhang zueinander haben. Als Maß für den Zusammenhang zwischen den SNPs dient das Kopplungsungleichgewicht (linkage disequilibrium, LD) [130]. Als Maßeinheit des LD gilt D' .

2.9 Haplotypenanalyse

Für die vier Genvarianten des ANP-Gens auf dem Chromosom 1 wurden die Haplotypenanalysen mithilfe des Computerprogramms MULTIHAP (Max Planck Institut für molekulare Genetik, Berlin, Deutschland) durchgeführt. Bei gegebenem Genotyp wurde das jeweils wahrscheinlichste zugehörige Haplotypenpaar eines jeden Individuums mit Hilfe des Estimation-Maximization-Algorithmus rekonstruiert [131]. Neben der Zuordnung der Haplotypenpaare zu den verschiedenen Genotypen wurde die relative Häufigkeit der vier möglichen Haplotypen im Fall- und Kontrollkollektiv berechnet.

2.10 Statistische Methoden

Die statistische Analyse erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS (Version 12.0.1, SPSS Inc., 1989-2003). Die Fall- und die Kontrollgruppe wurden mit dem Chi-Quadrat-Test auf Homogenität hinsichtlich der Geschlechterverteilung, des Diabetes mellitus, der Hypertonie und

der Hyperlipidämie untersucht. Die Altersverteilung und die Ejektionsfraktion beider Gruppen wurde nach Überprüfen der Normalverteilung mithilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests mit dem T-Test für unabhängige Stichproben verglichen. Es wurden die absoluten und relativen Häufigkeiten der kategorialen Merkmale im Patienten- und Kontrollkollektiv bestimmt. Nach den beobachteten Allelfrequenzen wurden die erwarteten Allelfrequenzen mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz berechnet. Mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson wurden beobachtete und erwartete Allelhäufigkeiten auf Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht untersucht.

Die Vergleiche bezüglich der Häufigkeit des Auftretens der Polymorphismen in Fall- und Kontrollkollektiv wurden mithilfe des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson (beidseitig) geprüft, gegebenenfalls wurde der exakte Fisher-Test (beidseitig) verwendet. Beide Gruppen wurden in der Gesamtheit und in den gebildeten Subgruppen auf Unabhängigkeit bzw. Homogenität untersucht. Als Schätzgröße für das relative Risiko wurde die Odds-Ratio gewählt und mit dem 95 %-Vertrauensbereich angegeben.

Die analysierten Genotypen der einzelnen Polymorphismen wurden mit dem ANP-Plasmaspiegel, der Ejektionsfraktion und dem arteriellen Hypertonus verglichen. Hierfür fanden der T-Test unabhängiger Stichproben und die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) Verwendung.

Die Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Haplotypen im Patienten- und Kontrollkollektiv wurde mit dem Chi-Quadrat-Test beidseitig geprüft.

Einheitlich wurde für das Signifikanzniveau $p=0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Gruppencharakterisierung

In die Fallgruppe konnten 264 Personen mit nachgewiesener koronarer Herzkrankheit eingeschlossen werden. Das durchschnittliche Alter betrug $58,55 \pm 9,31$ Jahre, 154 waren männlichen Geschlechts. Eine Hyperlipidämie hatten nachweislich 107 Personen. 127 hatten einen bekannten arteriellen Hypertonus und 45 Personen waren Diabetiker.

Die Kontrollgruppe bestand aus 228 Personen. Das Durchschnittsalter der Kontrollgruppe lag bei $56,97 \pm 9,62$ Jahren. Von den 228 Personen waren 125 Männer. Am arteriellen Hypertonus erkrankt waren 91 Personen. Eine Hyperlipidämie hatten 83 Probanden und 27 waren Diabetiker.

Somit waren beide Gruppen bezüglich des Alters, der Geschlechtsverteilung und dem Vorhandensein der Risikofaktoren Hyperlipidämie, arterieller Hypertonus und Diabetes mellitus ähnlich verteilt (Tabelle 8).

	Fallgruppe	Kontrollgruppe	
Gesamt	264	228	
Alter in Jahren (Mittelwert \pm Standardabweichung)	$58,55 \pm 9,31$	$56,97 \pm 9,62$	p=0,07
Geschlecht			
männlich	154	125	p=0,43
weiblich	110	103	
arterieller Hypertonus	127	91	p=0,07
Hyperlipidämie	107	83	p=0,35
Diabetes mellitus	45	27	p=0,10

Tabelle 8: Zusammensetzung der Fall- und Kontrollgruppe

Ein Vergleich der Ejektionsfraktion (EF) beider Gruppen zeigte eine reduzierte Auswurfleistung

des Herzens in der Fallgruppe. Die EF betrug in dieser Gruppe 63,9 % gegenüber einer EF von 75,2 % in der Kontrollgruppe. Dieser Zusammenhang war hoch signifikant ($p < 0,001$).

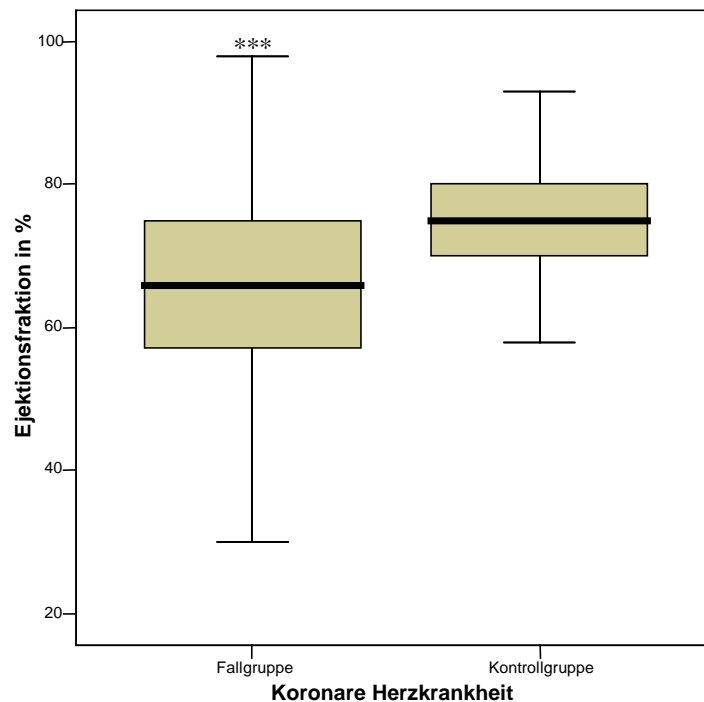


Abbildung 6: Boxplot der Ejektionsfraktion in Fall- und Kontrollgruppe, *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle

3.2 Allelfrequenz und Hardy-Weinberg-Verteilung

Alle untersuchten Polymorphismen wurden auf die Gültigkeit der Hardy-Weinberg-Verteilung untersucht. In der Fallgruppe zeigte sich bei allen untersuchten Polymorphismen eine erwartungsgemäße Aufspaltung der Allele (G664A $p=0,76$; C708T $p=0,21$; G1837A (HpaII) $p=0,78$; T2238C (ScaI) $p=0,06$).

In der Kontrollgruppe kam es ebenfalls zu keiner signifikanten Abweichung von dieser Gesetzmäßigkeit (G664A $p=0,74$; C708T $p=0,64$; G1837A (HpaII) $p=0,75$; T2238C (ScaI) $p=0,71$).

3.3 Auftreten der Polymorphismen in der Fall- und Kontrollgruppe

3.3.1 G664A

Die Verteilung der einzelnen Genotypen des Polymorphismus G664A in der Fall- und Kontrollgruppe sind in der Abbildung 7 verdeutlicht. Der AA-Genotyp trat weder in der Fall- noch in der Kontrollgruppe auf. In der Fallgruppe konnten alle Probanden genotypisiert werden. In der Kontrollgruppe dagegen konnte für zwei Probanden der Genotyp nicht eindeutig bestimmt werden.

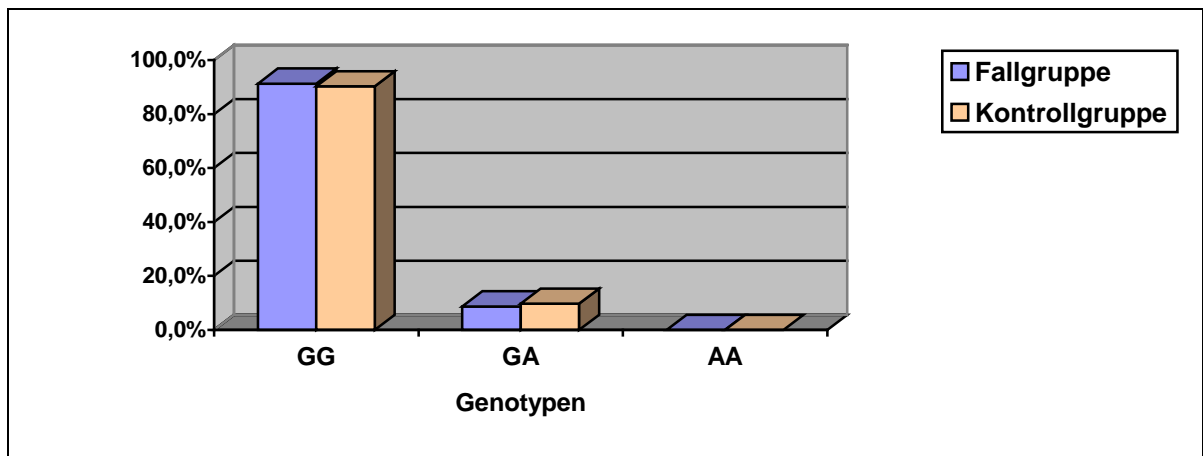


Abbildung 7: Verteilung der Genotypen des Polymorphismus G664A

Die Genotypfrequenzen für den G664A Polymorphismus zwischen der Fall- und Kontrollgruppe zeigen keinen statistischen Unterschied ($p=0,70$). Die errechnete Allelfrequenz für das Allel G liegt mit einer Allelfrequenz von 95,6 % in der Fall- und 95,1 % Kontrollgruppe deutlich über der Allelfrequenz des veränderten A-Allels und war somit in beiden Gruppen ähnlich verteilt (Tabelle 9).

Polymorphismus G664A		Fallgruppe		Kontrollgruppe	
		n	%	n	%
Genotypen	GG	241	91,3	204	90,3
	GA	23	8,7	22	9,7
	AA	0	0,0	0	0,0
Allele	G	505	95,6	430	95,1
	A	23	4,4	22	4,9

Tabelle 9: Genotypen und Allelfrequenzen des Polymorphismus G664A

Bei der Überprüfung eines dominanten genetischen Modells für das mutierte A-Allel zeigten sich keine wesentlichen Differenzen zwischen den KHK-Patienten und der Kontrollgruppe ($p=0,70$; $OR=1,13$) (Tabelle 10). Aufgrund des Fehlens des AA-Genotyps war eine statistisch valide Aussage zur potentiellen Dominanz des G-Allels oder einer kodominanten Wirkung beider Genvarianten nicht möglich.

Gruppierung der Genotypen	Fallgruppe		Kontrollgruppe	
	n	%	n	%
GG	241	91,3	204	90,3
GA und AA	23	8,7	22	9,7

Tabelle 10: A-dominanter Erbgang des Polymorphismus G664A

3.3.2 C708T

Die Abbildung 8 stellt grafisch die Verteilung der Genotypen des Polymorphismus C708T in der Fall- und Kontrollgruppe dar. Der Genotyp TT trat in der Fallgruppe nicht auf. Zwei Probanden

der Kontrollgruppe konnten nicht eindeutig einem Genotyp zugeordnet werden.

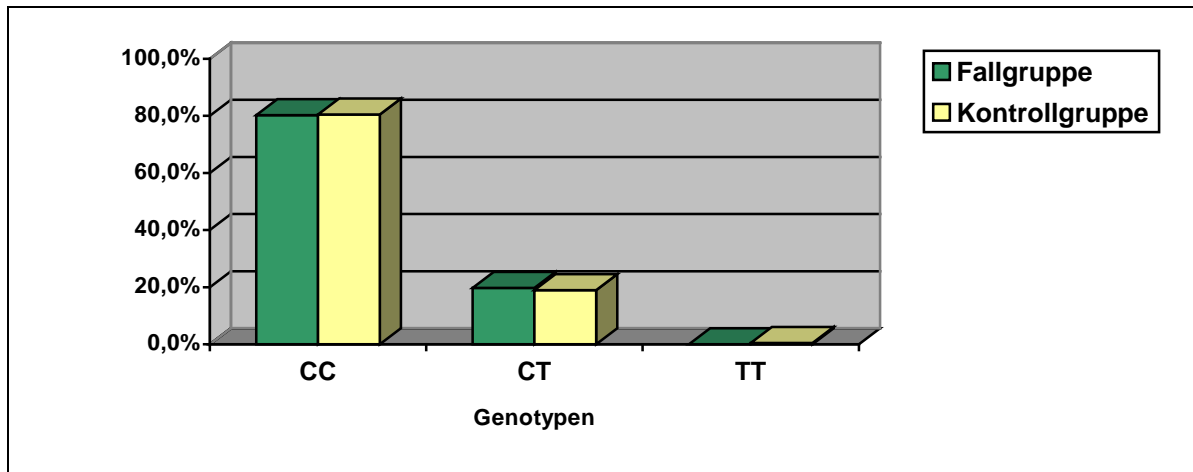


Abbildung 8: Verteilung der Genotypen des Polymorphismus C708T

In der Genotypfrequenz konnte für diesen Polymorphismus kein signifikanter Unterschied zwischen der Fall- und Kontrollgruppe nachgewiesen werden ($p=0,55$). Bei der Untersuchung der Allelfrequenz war das Wildallel C mit 90,2 % deutlich häufiger vertreten als das T-Allel (9,8 %). In der Kontrollgruppe war die Verteilung ähnlich (C: 90,0 %; T: 10,0 %) (Tabelle 11).

Polymorphismus C708T		Fallgruppe		Kontrollgruppe	
		n	%	n	%
Genotypen	CC	212	80,3	182	80,5
	CT	52	19,7	43	19,0
	TT	0	0,0	1	0,4
Allele	C	476	90,2	407	90,0
	T	52	9,8	45	10,0

Tabelle 11: Genotypen und Allelfrequenzen des Polymorphismus C708T

Bei der Annahme eines T-dominanten Erbganges zeigte sich kein Unterschied zwischen den KHK-Probanden und der Kontrollgruppe ($p=0,95$). Eine Untersuchung eines C-dominanten Erbganges beziehungsweise eines kodominanten Erbganges ist bei fehlendem homozygoten TT-Genotypen in der Fallgruppe statistisch nicht sinnvoll.

Gruppierung der Genotypen	Fallgruppe		Kontrollgruppe	
	n	%	n	%
CC	212	80,3	182	80,5
TC und TT	52	19,7	44	19,5

Tabelle 12: T-dominanter Erbgang des Polymorphismus C708T

3.3.3 G1837A (HpaII)

Die Genotypverteilung des Polymorphismus G1837A war mit einem p-Wert von 0,62 zwischen Fall- und Kontrollgruppe nicht signifikant verschieden und wird durch die Abbildung 9 verdeutlicht. Der Genotyp AA trat weder in der Fall- noch in der Kontrollgruppe auf. Der Genotyp eines Probanden aus der Fallgruppe konnte nicht eindeutig bestimmt werden.

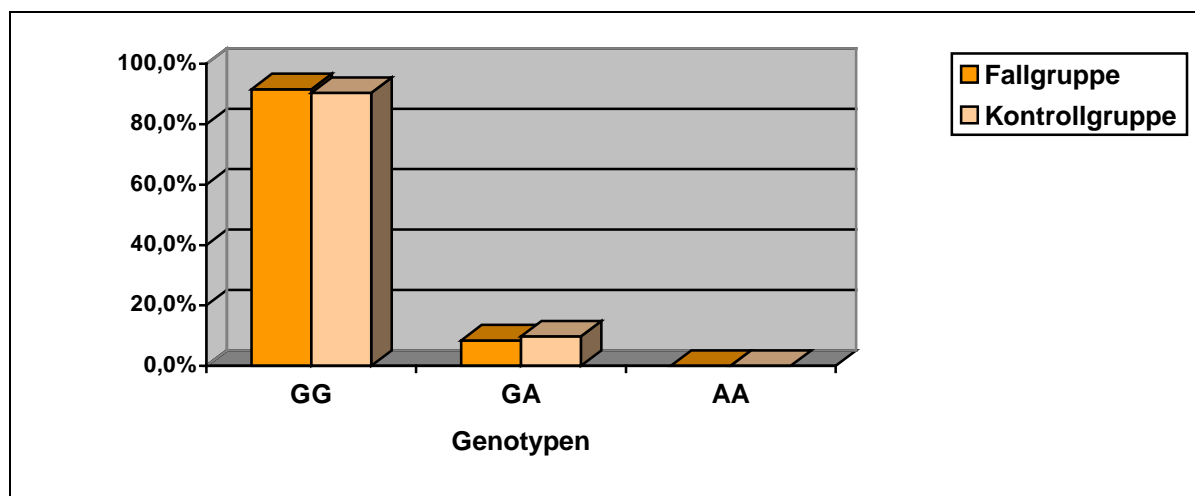


Abbildung 9: Verteilung der Genotypen des Polymorphismus G1837A

Die Allelfrequenz des Wildallel G lag in der Fall- und Kontrollgruppe erwartungsgemäß höher als vom A-Allel. Beide Allele zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (Tabelle 13).

Polymorphismus G1837A		Fallgruppe		Kontrollgruppe	
		n	%	n	%
Genotypen	GG	241	91,6	206	90,4
	GA	22	8,4	22	9,7
	AA	0	0,0	0	0,0
Allele	G	504	95,8	434	95,2
	A	22	4,2	22	4,8

Tabelle 13: Genotypen und Allelfrequenzen des Polymorphismus G1837A

Wie in der Tabelle 14 dargestellt, ergab die Überprüfung des dominanten Modells für das A-Allel keine signifikante Assoziation des Polymorphismus G1837A zur koronaren Herzkrankheit ($p=0,62$; $OR=1,17$). Aufgrund des Fehlens des AA-Genotyps konnte eine statistische Auswertung des kodominanten und dominanten Erbganges für das G-Allel nicht erfolgen.

Gruppierung der Genotypen	Fallgruppe		Kontrollgruppe	
	n	%	n	%
GG	241	91,6	206	90,3
GA und AA	22	8,4	22	9,7

Tabelle 14: A-dominanter Erbgang des Polymorphismus G1837A

3.3.4 T2238C (ScaI)

Die Abbildung 10 verdeutlicht das Auftreten der Genotypen des T2238C Polymorphismus, gelegen im dritten Exon des ANP-Gens und spiegelt die Häufigkeiten der Tabelle 15 wider. Bereits grafisch fällt ein höheres Vorkommen der homozygoten TT- und CC-Genotypen in der Kontrollgruppe auf. Für einen Probanden der Fallgruppe gelang es nicht, den Genotyp eindeutig zu bestimmen.

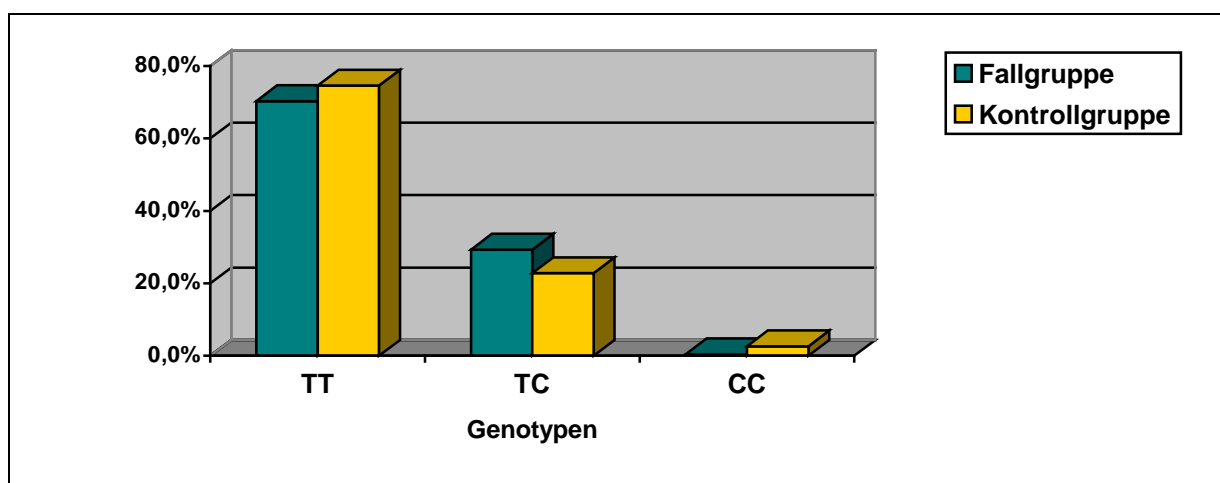


Abbildung 10: Verteilung der Genotypen des Polymorphismus T2238C

Polymorphismus T2238C		Fallgruppe		Kontrollgruppe	
		n	%	n	%
Genotypen	TT	185	70,3	170	74,6
	TC	77	29,3	52	22,8
	CC	1	0,4	6	2,6
Allele	T	447	85,0	392	86,0
	C	79	15,0	64	14,0

Tabelle 15: Genotypen und Allelfrequenzen des Polymorphismus G1837A

Insgesamt zeigt sich die Genotypverteilung zwischen der Fall- und Kontrollgruppe signifikant

verschieden ($p=0,04$). Dagegen stellt sich die Allelaufteilung zwischen Fall- und Kontrollgruppe nicht statistisch unterschiedlich dar. Das T-Allel tritt erwartungsgemäß deutlich häufiger als das C-Allel auf (Tabelle 15).

Die Untersuchung eines dominanten Erbganges für das T-Allel zeigte eine signifikante Assoziation des T-Allels zur koronaren Herzkrankheit ($p=0,04$; $OR=7,08$) (Tabelle 16).

Gruppierung der Genotypen	Fallgruppe		Kontrollgruppe	
	n	%	n	%
TT + TC	262	99,6	222	97,4
CC	1	0,4	6	2,6

Tabelle 16: T-dominanter Erbgang des Polymorphismus T2238C

Dagegen wies die Überprüfung für den rezessiven und kodominanten Erbgang dieses Polymorphismus keine Assoziationen zur KHK auf ($p= 0,30$, $OR=0,81$ (Tabelle 17); $p=0,66$, $OR=0,92$ (Tabelle 18)).

Gruppierung der Genotypen	Fallgruppe		Kontrollgruppe	
	n	%	n	%
TT	185	70,3	170	74,6
TC und CC	78	29,7	58	25,4

Tabelle 17: C-dominanter Erbgang des Polymorphismus T2238C

Allelaufspaltung	Fallgruppe		Kontrollgruppe	
	n	%	n	%
T	447	85,0	392	86,0
C	79	15,0	64	14,0

Tabelle 18: kodominanter Erbgang des Polymorphismus T2238C

3.4 ANP-Polymorphismen und die Ejektionsfraktion

Die Polymorphismen und deren analysierte Genotypen wurden mit der entsprechenden Ejektionsfraktion verglichen. Bei fehlenden homozygoten Varianten der Polymorphismen G664A, C708T und G1837A (HpaII) konnten nur die Normalvariante und die heterozygote Variante mit der Ejektionsfraktion verglichen werden. Für den Polymorphismus T2238C (ScaI) konnte ein Vergleich zwischen den drei möglichen Genotypen erfolgen.

Polymorphismus	Genotyp	n	Ejektionsfraktion in %	p-Wert
G664A	G664G	382	69,62	0,52
	G664A	40	68,22	
C708T	C708C	333	69,37	0,73
	C708T	89	69,90	
G1837A (HpaII)	G1837G	384	69,59	0,75
	G1837A	39	68,90	
T2238C (ScaI)	T2238T	303	69,33	0,34
	T2238C	115	69,83	
	C2238C	5	77,80	

Tabelle 19: Die Genotypen der verschiedenen Polymorphismen und deren Ejektionsfraktion

Die Genotypen der Polymorphismen G664A, C708T und G1837A (HpaII) wiesen zueinander keinen Unterschied der Ejektionsfraktion auf. Beim Polymorphismus T2238C fiel eine höhere

Ejektionsfraktion des CC-Genotypen gegenüber dem TT- und TC-Genotypen auf, auch wenn das Signifikanzniveau verfehlt wurde ($p=0,34$). Diese Ergebnisse sind in der obenstehenden Tabelle 19 zusammengefasst.

3.5 ANP-Polymorphismen und der arterielle Hypertonus

In der Literatur sind Assoziationen zwischen ANP-Polymorphismen und dem arteriellen Hypertonus beschrieben. Wir untersuchten die analysierten Genotypen der vier Polymorphismen auf einen Zusammenhang mit dem arteriellen Hypertonus.

Es zeigten sich bei allen untersuchten Genotypen keine signifikanten Assoziationen zum arteriellen Hypertonus. Die statistischen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 20 dargestellt.

Polymorphismus	Genotyp	n	Hypertoniker (n)	p-Wert
G664A	G664G	445	200	0,36
	G664A	45	17	
C708T	C708C	394	174	0,85
	C708T	95	43	
G1837A (HpaII)	G1837G	447	199	0,87
	G1837A	44	19	
T2238C (ScaI)	T2238T	355	157	0,79
	T2238C	129	57	
	C2238C	7	4	

Tabelle 20: Die Genotypen der Polymorphismen und der arterielle Hypertonus

3.6 ANP-Polymorphismen und der ANP-Spiegel

Es wurden die analysierten Genotypen der einzelnen Polymorphismen und deren ANP-Spiegel

miteinander verglichen. Aufgrund der geringen oder fehlenden Anzahl von homozygoten Varianten der Polymorphismen G664A, C708T und G1837A (HpaII) konnten nur die Normalvariante und die heterozygote Variante und deren entsprechende ANP-Spiegel miteinander verglichen werden. Für den Polymorphismus T2238C (ScaI) konnte der Vergleich zwischen den drei möglichen Genotypen erfolgen.

Für die Polymorphismen G664A und C708T ließen sich für den homozygot normalen Genotypen (GG bzw. CC) gegenüber den heterozygoten Genotypen ein tendenziell erhöhter ANP-Spiegel nachweisen, wobei das Signifikanzniveau verfehlt wurde. Die homozygote normale Variante (GG) des G1837A (HpaII) Polymorphismus zeigte dagegen einen eher niedrigen ANP-Spiegel gegenüber dem GA-Genotypen, allerdings ohne statistische Signifikanz.

Die Ergebnisse sind im Einzelnen der folgenden Tabelle 21 zu entnehmen.

Polymorphismus	Genotyp	n	ANP-Spiegel (fmol/ml)	p-Wert
G664A	G664G	433	62,21	0,82
	G664A	44	60,64	
C708T	C708C	385	62,92	0,45
	C708T	91	58,75	
G1837A (HpaII)	G1837G	435	61,88	0,89
	G1837A	43	62,99	
T2238C (ScaI)	T2238T	346	58,56	0,96
	T2238C	125	62,74	
	C2238C	7	61,77	

Tabelle 21: Die Genotypen der Polymorphismen und deren ANP-Spiegel

3.7 Kopplungsgruppe

Die einzelnen Polymorphismen wurden mithilfe des Computerprogramms HAPLOVIEW auf ein gemeinsames Auftreten im Sinne einer Kopplungsgruppe untersucht. Die Ergebnisse werden in der folgenden Tabelle 22 dargestellt. Es zeigte sich ein signifikantes Kopplungsungleichgewicht zwischen den Polymorphismen G664A vs. G1837A und C708T vs. T2238C, d.h., es traten der 1. und 3. Polymorphismus gemeinsam auf, gleiches gilt für den 2. und 4. Polymorphismus.

Dagegen konnten wir keine Verbindung zwischen den direkt benachbarten Polymorphismen G664A vs. C708T, C708T vs. G1837A und G1837A vs. T2238C finden.

Polymorphismenpaare	D'	
	Kontrolle	Fall
G664A vs. C708T	-1,00	-1,00
G664A vs. G1837A	0,95	0,95
G664A vs. T2238C	-1,00	-1,00
C708T vs. G1837A	-1,00	-1,00
C708T vs. T2238C	0,78	0,95
G1837A vs. T2238C	-1,00	-1,00

Tabelle 22: Kopplungsgruppenanalyse: D' als Maß des Kopplungsungleichgewicht (linkage disequilibrium)

3.8 Haplotypenanalyse

Für alle vier untersuchten Polymorphismen des ANP wurde eine Haplotypenanalyse durchgeführt. Es zeigte sich in der Auswertung, dass die Haplotypen „1111“, „1112“, „1212“ am häufigsten vertreten waren. Alle weiteren Haplotypen kamen sowohl in der Fall- als auch in der Kontrollgruppe sehr viel seltener vor (<5 %) und wurden zugunsten einer besseren Übersicht in der Tabelle 23 vernachlässigt. Auffallend ist, dass die Polymorphismen G664A und G1837A (Positionen 1 und 3) nahezu keine Variationen aufweisen.

Haplotypen	Fallgruppe	Kontrollgruppe
1111	0,80	0,79
1112	0,05	0,06
1212	0,09	0,08

Tabelle 23: Häufigkeiten der Haplotypen in der Fall- und Kontrollgruppe, die Haplotypen sind wie folgt kodiert:
 1=identisch mit der Referenzsequenz (SNP an Position 664G; SNP an Position 708C; SNP an Position 1837G; SNP an Position 2238T)
 2=nicht identisch mit der Referenzsequenz (SNP an Position 664A; SNP an Position 708T; SNP an Position 1837A ; SNP an Position 2238C).

Aus den drei häufigsten Haplotypen ergeben sich im Folgenden die häufigsten Haplotypenpaare in der Rekonstruktion, wobei zu bemerken ist, dass für den Genotyp „1313“ theoretisch auch das Haplotypen-Paar „1211 1112“ denkbar wäre, welches aber sehr viel seltener auftritt. Das Haplotypen-Paar „1111 1212“ bestätigt somit indirekt unsere Befunde und Ergebnisse der einzelnen Polymorphismen und auch der Kopplungsanalyse. Bemerkenswert ist, dass zum einen die heterozygote Variante des Polymorphismus T2238C (ScaI) in zwei der drei häufigsten Genotypen vertreten ist und zum anderen in Verbindung mit dem heterozygoten zweiten Polymorphismus (C708T) signifikant häufiger in der Fallgruppe auftritt ($p=0,02$) (Tabelle 24).

Genotyp	Haplotypenpaare		p-Wert
1111	1111	1111	0,08
1113	1111	1112	0,06
1313	1111	1212	0,02

Tabelle 24: Häufigkeitsverteilung der Haplotypenpaare; die Genotypen sind wie folgt kodiert:
 1=homozygot für das der Referenzsequenz entsprechende Nukleotid auf beiden Chromosomen;
 2=homozygot für das von der Referenzsequenz abweichende Nukleotid auf beiden Chromosomen
 3=heterozygot

3.9 ANP-, cGMP-Spiegel und die cGMP/ANP-Ratio

3.9.1 ANP-, cGMP-Spiegel und die cGMP/ANP-Ratio in Fall- und Kontrollgruppe

Der ANP-Plasmaspiegel wurde mit Hilfe eines Radioimmunoassays bestimmt. Der ANP-Spiegel in der Fallgruppe lag im Median bei 50,20 fmol/ml. Demgegenüber zeigte sich der ANP-Spiegel in der Kontrolle mit 45,75 fmol/ml deutlich niedriger. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war signifikant ($p=0,01$). Die Abbildung 11 verdeutlicht den Zusammenhang grafisch.

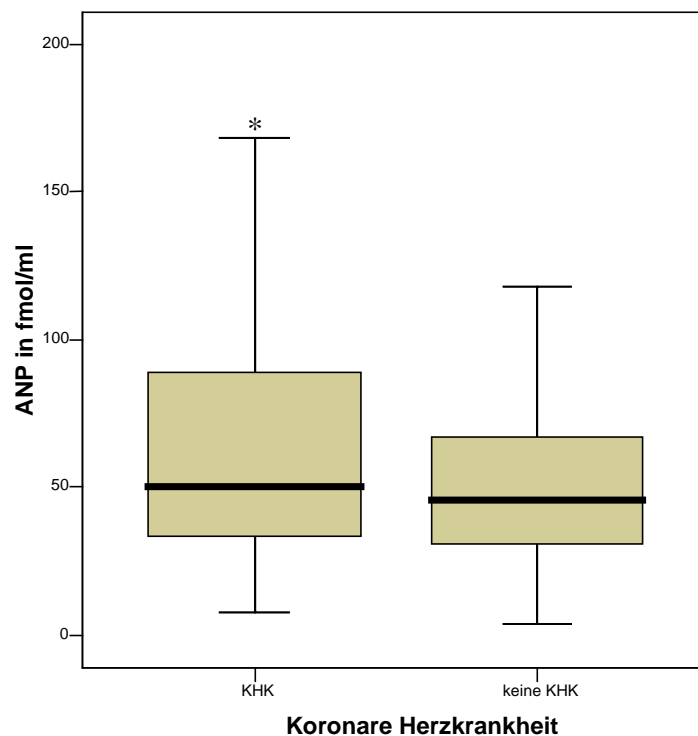


Abbildung 11: Boxplot vom ANP-Spiegel in der Fall- und Kontrollgruppe, * $p<0,05$ vs. Kontrolle

Wie in der Abbildung 12 gezeigt, lag der cGMP-Spiegel zwischen beiden Gruppen mit einem Median von 8,00 pmol/ml in der Fall- und 8,60 pmol/ml in der Kontrollgruppe. Tendenziell zeigte sich somit ein erhöhter Plasmaspiegel des second messengers in der Kontrollgruppe, der jedoch das Signifikanzniveau verfehlte ($p=0,07$).

Da sich der cGMP-Spiegel in beiden Gruppen nahezu gleich verhielt, der ANP-Plasmaspiegel jedoch in der Fallgruppe deutlich erhöht war, zeigt sich die cGMP/ANP-Ratio in der Fallgruppe, wie im zweiten Boxplot der Abbildung 12 dargestellt, hochsignifikant erniedrigt ($p<0,001$).

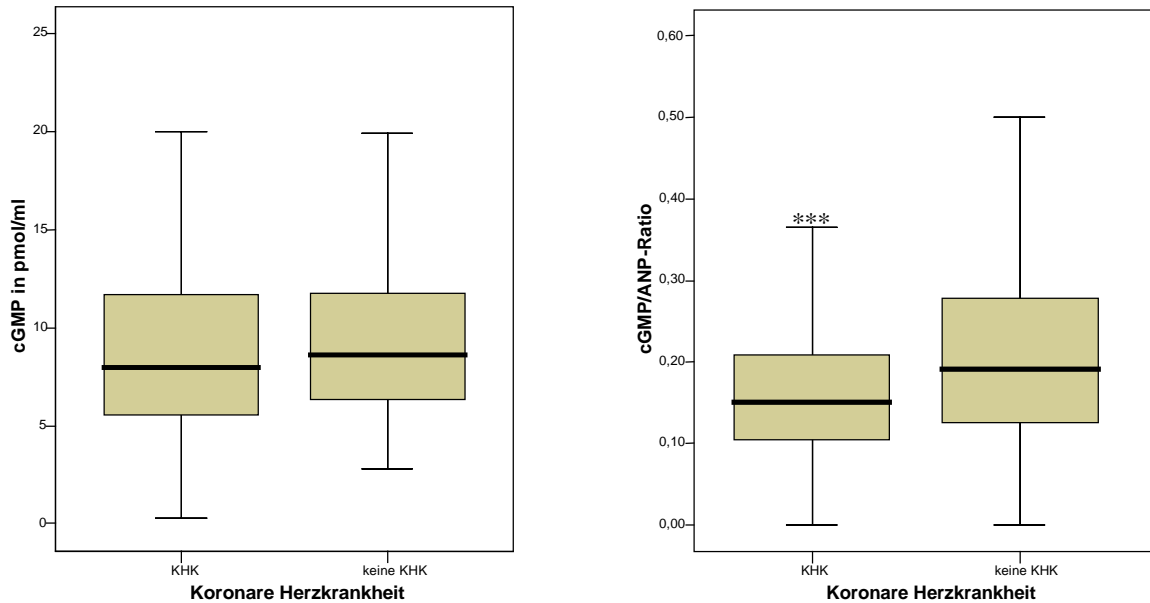


Abbildung 12: Boxplot des cGMP-Spiegel und der cGMP/ANP-Ratio, *** p<0,001 vs. Kontrolle

3.9.2 ANP-Spiegel und cGMP/ANP-Ratio bei der Herzinsuffizienz

Veränderte ANP-Plasmaspiegel bei der chronischen Herzinsuffizienz sind in der Literatur beschrieben. Innerhalb dieser Arbeit erfolgte eine weitere Untersuchung des ANP-Plasmaspiegels sowie der cGMP/ANP-Ratio bei herzinsuffizienten Probanden. Für die statistische Auswertung wurde in diesem Falle eine Herzinsuffizienz mit einer EF <41 % definiert. Es zeigte sich in der Gruppe der Herzinsuffizienten ein signifikant erhöhter ANP-Spiegel (p=0,006) und eine signifikante Erniedrigung der cGMP/ANP-Ratio (p=0,008) (Tabelle 25 und Abbildung 13).

	EF <41 %	EF >40 %	
ANP fmol/ml	94,30	46,90	p=0,006
cGMP/ANP-Ratio	0,11	0,17	p=0,008

Tabelle 25: ANP-Spiegel und cGMP/ANP-Ratio bei Patienten mit Herzinsuffizienz

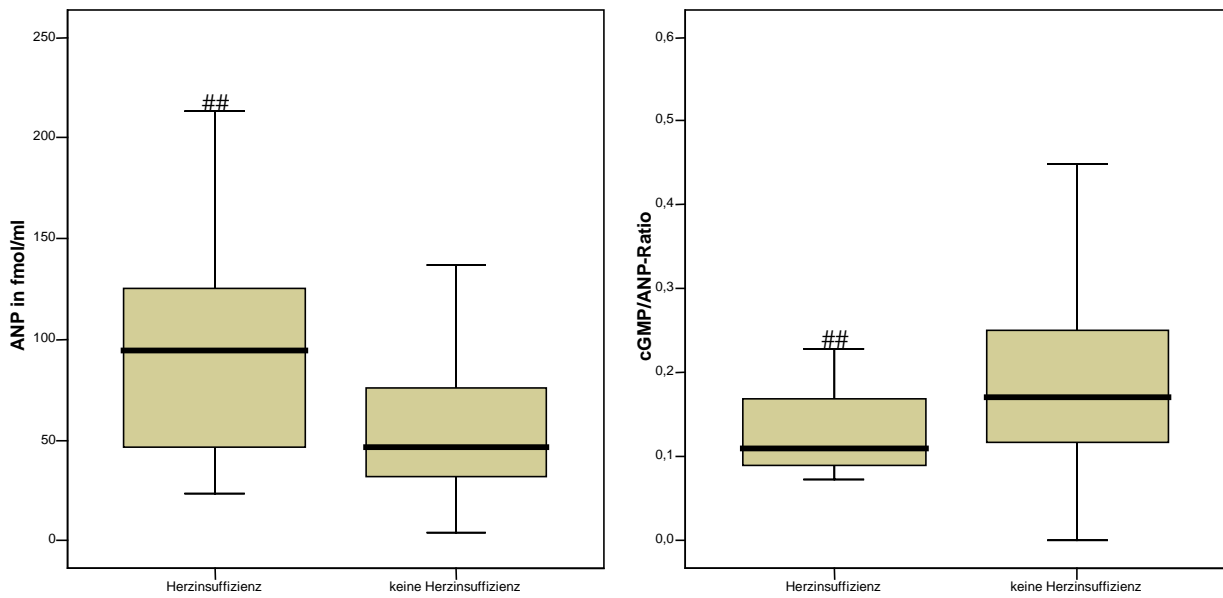


Abbildung 13: Boxplot vom ANP-Spiegel und der cGMP/ANP-Ratio bei herzinsuffizienten und nicht herzinsuffizienten Probanden, ## $p < 0,01$ vs. keine Herzinsuffizienz

4 Diskussion

Aufgrund der Wirkung des ANP, den Blutdruck zu senken und die Salzausscheidung zu fördern, wurde intensiv geforscht, inwiefern genetische Varianten im ANP-System in die Ätiologie des essentiellen Hypertonus involviert sind [114,115,117,132]. Bisher sind einige Polymorphismen des humanen ANP-Gen als potentielle Marker des salzsensitiven Hypertonus bekannt [114,117,133]. Dass das ANP auch eine entscheidende Rolle in der Regulierung des koronaren Blutflusses und der Atherosklerose hat, zeigte Levin bereits 1998 [58]. ANP ist ein potenter Vasodilatator mit antimitogener Aktivität in verschiedenen Zelltypen, einschließlich der glatten Gefäßmuskulatur und endothelialen Zellen [97,134,135]. Eine Studie an mit einem neutrale Endopeptidase-Inhibitor (NEP-Inhibitor) behandelten Ratten zeigte eine Unterdrückung der Atherosklerose in den Gefäßen [136]. Durch die NEP-Inhibition wird ein erhöhter Blutspiegel von endogenen vasoaktiven Peptiden, unter anderem auch den natriuretischen Peptiden, erreicht. Dieser Effekt einer geringer ausgeprägten Atherosklerose wird auch dem ANP zugeschrieben. Daher erweist sich das ANP als entsprechendes Kandidatengen für eine Assoziationsstudie mit der koronaren Herzerkrankung. In der vorliegenden Fall-Kontroll-Studie wurden vier bekannte Polymorphismen des humanen ANP in Hinblick auf eine mögliche Assoziation mit der Entstehung der koronaren Herzkrankheit untersucht.

4.1 Polymorphismen

4.1.1 G664A

Die Allelfrequenz des Polymorphismus betrug 0,04 in der Fallgruppe versus 0,05 in der Kontrollgruppe und unterschied sich damit nicht signifikant zwischen beiden Gruppen. Der homozygote Genotyp AA fand sich weder in der Fall- noch in der Kontrollgruppe. Die ermittelte Allelfrequenz entspricht den angegebenen Ergebnissen von Rubattu et al., wo sich eine Allelfrequenz für das A-Allel von 0,03 in der Kontrollgruppe und 0,06 in der Fallgruppe berechnet [108]. Die Ergebnisse entsprechen auch den veröffentlichten Häufigkeiten im Rahmen des International HapMap Project. Die für A angegebenen Allelfrequenzen werden hier mit 0,05 in der afrikanischen Population und 0,09 in der japanischen Population angegeben. Die homozygote AA-Variante konnte bisher in keiner der vier untersuchten Populationen nachgewiesen werden.

4.1.2 C708T

Für den Polymorphismus C708T fand sich eine Allelhäufigkeit von 0,10 in der Fall- und Kontrollgruppe. Die homozygote T708T Variante war nur einmal in der Kontrollgruppe vertreten. Das International HapMap Project konnte die homozygote Mutation nur in der afrikanischen Population nachweisen. Die dort angegebenen Allelhäufigkeiten schwanken sehr stark zwischen den verschiedenen Populationen. In der chinesischen und japanischen Bevölkerungsstichprobe konnte dieser SNP nicht nachgewiesen werden. In der europäischen Population zeigte sich eine Allelhäufigkeit von 0,09 für das T-Allel und entspricht somit dem Ergebnis dieser Arbeit. Dagegen ließ sich die Allelfrequenz in der afrikanischen Population mit einer Frequenz von 0,31 nachweisen. Demnach scheint dieser Polymorphismus einem besonders starken ethnischen Einfluss zu unterliegen.

Wir konnten in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass dieser Polymorphismus im Kopplungsungleichgewicht mit dem Polymorphismus T2238C, wie bereits von Roussel et al. beschrieben, steht [137].

4.1.3 G1837A (*HpaII*)

Erstmalig wird in dieser Arbeit der Polymorphismus G1837A (*HpaII*) auf den Zusammenhang zur koronaren Herzkrankheit untersucht. Wir ermittelten eine Allelfrequenz für das A-Allel von 0,04 in der Fall- und 0,05 in der Kontrollgruppe, wobei die AA-Variante weder in der Fall- noch in der Kontrollgruppe auftrat. Im Rahmen der Kopplungsgruppenanalyse konnten wir zeigen, dass sich der Polymorphismus G1837A im Kopplungsungleichgewicht mit dem Polymorphismus des 1. Exons (G664A) befindet und bestätigten die Ergebnisse von Rubattu et al. [108].

Dieser im zweiten Intron liegende Polymorphismus wurde 2000 von Kato et al. im Zusammenhang mit dem essentiellen Hypertonus anhand einer japanischen Population untersucht [138]. Die hier ermittelte Allelfrequenz lag bei 0,08 für das A-Allel in einer Gruppe von 179 gesunden Studenten. Rubattu et al. untersuchte diesen Polymorphismus anhand der weißen US-Bevölkerung im Zusammenhang mit dem Auftreten des ischämischen Apoplex [108]. Es wird hier eine Allelfrequenz von 0,1 in der Fall- und 0,075 in der Kontrollgruppe angegeben. In dieser Studie zeigte sich für den dominanten Erbgang des A-Allel eine signifikante Assoziation zum ischämischen Apoplex. Das ist insofern interessant, da dieser im

Intron gelegene Polymorphismus keine Auswirkung auf die Struktur des ANP hat. Später konnte dieselbe Forschungsgruppe keinen Zusammenhang zwischen einer linksventrikulären Hypertrophie bei essentiellen Hypertonikern und dem HpaII-Polymorphismus finden [139].

4.1.4 T2238C (*ScaI*)

Durch den Polymorphismus im Stopcodon verlängert sich das ANP um zwei Aminosäuren. Die hieraus entstehenden Folgen auf die Funktion des ANP sind bisher unbekannt.

Die Genotypverteilung in unserer Arbeit zeigte insgesamt mehr C-homozygote Individuen in der Kontrollgruppe, dagegen anteilmäßig weniger TC-Heterozygote (Abbildung 10). Insgesamt war die Verteilung der Genotypen in Fall- und Kontrollgruppe signifikant verschieden ($p < 0,05$). Unter Annahme eines T-dominanten Erbganges zeigt sich das T-Allel signifikant häufiger in der Fallgruppe. Somit scheint nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit das Tragen des CC-Genotypes einen protektiven Effekt in Bezug auf die koronare Herzkrankheit zu besitzen ($OR = 7,08$).

Die unsererseits ermittelte Allelfrequenz für des C-Allel von 0,15 in der Fall- und 0,14 in der Kontrollgruppe lag dagegen deutlich unter der von Gruchala et al. an polnischen KHK-Patienten ermittelten mit 0,40 [109]. Es gilt hier anzumerken, dass in dieser Studie zwischen Probanden mit stattgehabten Myokardinfarkt und Probanden mit nachgewiesener Ein-, Zwei- oder Dreifäßerkrankung unterteilt wurde. Somit fehlt hier eine Kontrollgruppe und kann daher nur als Vergleich mit unserer Fallgruppe dienen. Der von Gruchala et al. ermittelte Zusammenhang der KHK und der Mutation am Stopcodon des ANP drückt sich auch in der Abweichung der Genotypen vom Hardy-Weinberg-Gesetz aus. Eine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gesetz sahen wir weder in der Fall-, noch in der Kontrollgruppe.

Anders als in der vorliegenden Arbeit und den vergleichbaren Ergebnissen von Rubattu et al., untersuchten Kato und Mitarbeiter hypertensive und normotensive Japaner und stellten eine deutlich niedrigere Frequenz der Genvariante fest (Allelfrequenz 0,02) [108,138].

Es ist bemerkenswert, dass offensichtlich klare ethnische Unterschiede hinsichtlich der Allelfrequenz dieses Polymorphismus in verschiedenen Populationen bestehen. Es spiegeln sich die von Population zu Population stark unterschiedlichen Allelfrequenzen auch in den

Ergebnissen des International HapMap Project wider. So ließ sich der Polymorphismus in der chinesischen Population nicht nachweisen, zeigte sich dagegen mit einer Häufigkeit von 0,41 in der europäischen Population und entspricht somit den bereits zitierten Daten von Gruchala et al.

4.1.5 Haplotypenanalyse

Haplotypen sind Kombinationen von Allelen innerhalb von bestimmten Abschnitten eines Chromosomenstranges. Um Assoziationsanalysen mit mehreren beteiligten SNPs zusätzlich auf mögliche Assoziationen von Kombinationen dieser SNPs mit der Erkrankung zu untersuchen, wird das Augenmerk mehr und mehr auf Haplotypen gelegt [140]. Da bei den in dieser Arbeit angewandten Genotypisierungsmethoden nicht unterschieden werden konnte, welches Allel des jeweils untersuchten SNPs auf welchem der beiden Chromosomen lag, konnten auch bei der Untersuchung mehrerer auf einem Chromosom liegender SNPs keine Rückschlüsse auf die Kombination der aufeinander folgenden Allele auf einem Chromosomenstrang gezogen werden. Um mögliche Haplotypen zu identifizieren, die sich aus der Kombination der Allele mehrerer SNPs ergaben, musste man sich deshalb mathematischer Modelle bedienen.

Die Genotypen der Haplotypenanalyse für die SNPs dieser Studie konnten im wesentlichen die Ergebnisse der einzelnen Polymorphismen und der Kopplungsanalyse bestätigen. Es zeigte sich der Genotyp „1313“ mit der heterozygoten Variante des Polymorphismus C708T und T2238C (ScaI) signifikant häufiger in der Fallgruppe. Indirekt bestätigt das Haplotypenpaar „1111 1212“ somit auch das Ergebnis der Kopplungsanalyse, wo ein Kopplungsungleichgewicht zwischen diesen Polymorphismen nachgewiesen werden konnte.

4.2 ANP-, cGMP-Spiegel und die cGMP/ANP-Ratio

ANP-, cGMP-Spiegel und cGMP/ANP-Ratio bei KHK-Patienten und Kontrollen

Der Vergleich der ANP-Plasmaspiegel dieser Arbeit zeigte einen signifikant erhöhten ANP-Spiegel in der Fall- gegenüber der Kontrollgruppe.

Es ist bekannt, dass die zirkulierenden Peptide die kardiale Funktion reflektieren, das Remodelling und die Hypertrophie des Herzens beeinflussen und die Prognose bei einer

koronaren Herzerkrankung voraussagen können [141-143]. Mehrere Studien konnten ein Ansteigen der Peptidplasmaspiegel im Rahmen einer KHK mit linksventrikulärer Dysfunktion belegen [141,144]. Nishikimi konnte dagegen erhöhte Peptidplasmaspiegel, insbesondere für N-ANP bei KHK-Patienten mit normaler linksventrikulärer Funktion aufzeigen [145]. Auch wenn der hierfür verantwortliche Mechanismus noch nicht ausreichend verstanden ist, wird als mögliche Ursache eine diastolische Relaxationsstörung diskutiert. Eine vorübergehende myokardiale Ischämie ist ebenfalls als Ursache zu erwägen. Dies konnte 1992 von Malatino et al. erstmals gezeigt und anschließend anhand von Studien an KHK-Patienten, die sich einer körperlichen Belastung unterzogen, bestätigt werden [146,147].

Über die Ursache des erhöhten ANP-Plasmaspiegels in der Fallgruppe lässt sich noch weiter diskutieren, da sich in der Fallgruppe eine signifikante Erniedrigung der Ejektionsfraktion findet. Daher kann man postulieren, dass sich in der Fallgruppe vermehrt Patienten mit einer Herzinsuffizienz als Folge der KHK befinden. Eine enge Korrelation zwischen der Schwere der Herzinsuffizienz und der Höhe des Plasmaspiegels natriuretischer Peptide wurde bereits vor 20 Jahren beschrieben [148,149]. Mitarbeiter der Arbeitsgruppe, in welcher auch die vorliegende Arbeit entstand, zeigten anhand eines experimentellen Tiermodells auf molekularbiologischer Ebene diesen Zusammenhang auf [150].

Die biologischen Wirkungen von ANP und BNP werden durch den second messenger cGMP nach Aktivierung der membranständigen Guanylatzyklase vermittelt [151]. Parallel zur erhöhten ANP-Plasmakonzentration in der Fallgruppe zeigte sich die cGMP-Konzentration in beiden Gruppen nahezu unverändert. Der unterschiedliche Verlauf der Konzentrationen von ANP und cGMP spiegelt sich in den Quotienten aus plasmatischem cGMP und ANP wider. So war die cGMP/ANP-Ratio in der Fallgruppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe ($p < 0,001$).

Da die cGMP/ANP-Ratio das pro ANP gebildete cGMP repräsentiert und somit ein Maß für die Rezeptoraktivierung darstellt, können diese Beobachtungen als Abnahme der NP-Rezeptoraktivität bei der koronaren Herzkrankheit, oder wie oben diskutiert durch die hieraus resultierende Herzinsuffizienz interpretiert werden. Als Ursache einer abnehmenden cGMP-Produktion werden verschiedene Mechanismen diskutiert. So wurde eine Rezeptor-downregulation bei kardiomyopathischen Hamstern und Patienten mit Herzinsuffizienz beschrieben [152,153]. Denkbar ist auch eine erhöhte Aktivität der die natriuretischen Peptide

abbauenden neutralen Endopeptidase oder eine verstärkte Expression des Clearancerezeptors [154].

ANP-Polymorphismen und ANP-Spiegel

In der vorliegenden Arbeit wurde für keinen der vier untersuchten Polymorphismen ein Zusammenhang zum ANP-Plasmaspiegel gefunden.

Wang et al. untersuchten 2003 den genetischen Einfluss auf die Plasmaspiegel der natriuretischen Peptide [155]. Demnach scheint der Blutspiegel der natriuretischen Peptide ebenso wie andere kardiovaskuläre Risikofaktoren vererbbar zu sein. Somit können die Gene, welche den Plasmaspiegel der natriuretischen Peptide beeinflussen, unabhängig zu den bekannten Risikofaktoren, Einfluss auf die koronare Herzkrankheit nehmen. Eine genetische Prädisposition für niedrige Peptidspiegel könnte zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber den Salzhaushalt betreffende Erkrankungen führen [155]. Die Untersuchung einzelner Polymorphismen und deren Einfluss auf den Plasmaspiegel der natriuretischen Peptide zeigte unterschiedliche Ergebnisse. Kato untersuchte im Jahr 2000 die Polymorphismen G664A, G1837A (HpaII) und T2238C (ScaI), sowie zwei weitere Polymorphismen des ANP von gesunden Japanern auf Assoziation zum ANP-Plasmaspiegel [138]. Für keinen der untersuchten Polymorphismen konnte ein Einfluss auf den ANP-Spiegel belegt werden. Xue et al. untersuchten anhand hypertensiv erkrankter Chinesen einen Zusammenhang zwischen zwei ANP-Polymorphismen und kardialer Hypertrophie und dem ANP-Plasmaspiegel [156]. Es zeigte sich eine signifikante Erniedrigung des ANP-Plasmaspiegels bei einem Polymorphismus in der ANP-Promotorregion innerhalb der hypertensiven Probanden mit linksventrikulärer Hypertrophie.

4.3 Schlussfolgerungen

Von den vier untersuchten Polymorphismen dieser Studie zeigte der Polymorphismus T2238C (ScaI) eine Assoziation zur koronaren Herzkrankheit unter Annahme eines T-dominanten Erbganges. Hier sollten weitergehende und umfangreichere Studien zur Klärung der Rolle dieses Polymorphismus in der Genese der KHK erfolgen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der

Polymorphismus T2238C (ScaI) im Kopplungsungleichgewicht zum Polymorphismus C708T steht. Dennoch ließ sich für diesen im ersten Intron gelegenen Polymorphismus keine eigenständige Assoziation zur KHK nachweisen. Zurückzuführen ist diese fehlende Signifikanz auf die fehlenden homozygoten TT-Varianten sowie auch auf die relativ geringe Zahl der heterozygoten TC-Träger, bedingt durch die niedrige Allelfrequenz dieses Polymorphismus. In diesem Fall scheint eine weitergehende Untersuchung anhand einer größeren Zahl von Probanden sinnvoll.

Für die Polymorphismen G664A und G1837A (HpaII) konnten wir im Gegensatz zu den Ergebnissen von Rubattu et al. und der positiven Assoziation zum ischämischen Apoplex, keine Assoziation zur KHK nachweisen.

Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit betraf die mögliche Assoziation der vier Polymorphismen zum Risikofaktor arterieller Hypertonus. Auch wenn das ANP eine wichtige Rolle in der Blutdruckregulierung spielt, konnte in dieser Arbeit kein Zusammenhang zwischen den vier untersuchten Polymorphismen G664A, C708T, G1837A, T2238C und dem arteriellen Hypertonus festgestellt werden, auch wenn in der Literatur bereits ein Zusammenhang mit den Polymorphismen G1837A (HpaII) und T2238C (ScaI) beschrieben wurde [114].

Ebenfalls negativ fiel die Untersuchung der Polymorphismen bezüglich des ANP-Spiegels aus und bestätigte somit die vorliegenden Ergebnisse von Kato et al. [138]. Auch wenn eine Strukturveränderung des ANP aufgrund eines Polymorphismus und ein entsprechend veränderter ANP-Spiegel durch eine beispielsweise veränderte Affinität am entsprechenden Rezeptor vorstellbar ist, scheinen die hier untersuchten Polymorphismen keine entscheidende Rolle zu spielen.

Wie bereits postuliert, könnten Polymorphismen des ANP-Gen eine veränderte Struktur und somit eine veränderte Rezeptoraffinität zur Folge haben. Dieser Hypothese entsprechend untersuchte diese Arbeit unter anderem den Zusammenhang zwischen den Polymorphismen und der Herzinsuffizienz. Es ließ sich keine Assoziation der untersuchten Polymorphismen zur Ejektionsfraktion zeigen.

Weiterhin wurde der Zusammenhang zwischen dem ANP- und cGMP-Spiegel, sowie deren entsprechende Ratio zur koronaren Herzerkrankung untersucht. Wir fanden einen signifikant erhöhten ANP-Spiegel in der Fallgruppe. In der Literatur wird ein erhöhter ANP-Spiegel bei

KHK-Patienten mit einer linksventrikulären Dysfunktion in Zusammenhang gebracht. Da die Fallgruppe unserer Arbeit eine signifikante Erniedrigung der Ejektionsfraktion gegenüber der Kontrollgruppe aufwies, könnte sich der erhöhte ANP-Spiegel auf eine durch die KHK hervorgerufene Herzinsuffizienz zurückführen lassen. Diese Hypothese wird indirekt durch den Vergleich der cGMP-Spiegel in beiden Gruppen gestützt. Der cGMP-Spiegel zeigte sich in beiden Gruppen nahezu unverändert. Da der cGMP-Spiegel als Maß für die Rezeptoraktivität des ANP gilt, weist ein fehlender Anstieg des cGMP in der Fallgruppe auf einen Wirkungsverlust des ANP hin und entspricht somit den Erkenntnissen bei der chronischen Herzinsuffizienz.

4.4 Klinische Anwendung und Perspektiven

Polymorphismen des ANP

Die verschiedenen klinischen Bilder der KHK stellen die Kardiologie vor völlig unterschiedliche Probleme. Beispielsweise erfordert ein akutes Koronarsyndrom eine andere Behandlung als eine stabile Angina pectoris. Um Inzidenz und Letalität der koronaren Herzkrankheit zu senken und Prognose und Lebensqualität dieser Patienten zu verbessern, ist eine Optimierung von Prophylaxe und Therapie erforderlich [157]. Das setzt eine stärkere Berücksichtigung der ätiologischen Vielfalt dieses Krankheitsbildes voraus. Es gilt, die Patienten durch klinische, paraklinische, technische und auch genetische Untersuchungen präziser zu charakterisieren. Nur so ist es möglich, eine effiziente und individuell differenzierte Therapie durchzuführen. Die therapeutischen Möglichkeiten zur Beeinflussung des Verlaufs der koronaren Herzkrankheit erstrecken sich von rein konservativen, über interventionelle bis hin zu operativen Maßnahmen. Zur Verbesserung der Langzeitergebnisse ist es erforderlich nach Kriterien zu suchen, die sinnvoll zwischen den Einsatz der einen oder anderen Methode unterscheiden. Möglicherweise könnte die Bestimmung ausgewählter Genpolymorphismen diese interdisziplinäre Entscheidungsfindung bei klinischen Grenzfällen erleichtern. Auch das Ansprechen auf medikamentöse Therapieformen könnte durch polymorphe Varianten von Kandidatengen beeinflusst werden. Träger genetischer Varianten des ANP, die mit einer erniedrigten Blutkonzentration dieses Proteins einhergehen, würden möglicherweise besonders von einer Behandlung mit einem NEP-Inhibitor profitieren.

Eine Überprüfung der Zusammenhänge zwischen polymorphen Genvarianten und der koronaren

Herzkrankheit ist nur durch weiterführende Studien möglich. Laut den Initiatoren des HapMap Projectes wird es in Zukunft durch sinkende Kosten und steigende Möglichkeiten in der Genotypisierung einen Wechsel der Assoziationsstudien von Kandidatengenomen zu genomweiten Analysen geben [158]. Ob die in der vorliegenden Studie untersuchten Varianten dabei eine wesentliche Rolle spielen werden, bleibt abzuwarten.

ANP-Spiegel

Der Stellenwert der koronaren Herzkrankheit in der Mortalitätsstatistik macht es erforderlich, möglichst frühzeitig asymptomatische KHK-Patienten zu erkennen, um diese wiederum möglichst frühzeitig einer entsprechenden Therapie zuführen zu können. Eine mögliche diagnostische Hilfe in der nichtinvasiven Diagnostik können Biomarker darstellen. Die Anforderungen an solch einen Biomarker sind hoch, da dieser nur von klinischem Nutzen ist, wenn er einfach und reproduzierbar zu bestimmen ist und eine hohe Sensitivität und Spezifität aufweist. Hierbei wird für die koronare Herzkrankheit große Hoffnung in die natriuretischen Peptide gesetzt. Es zeigte sich für erhöhte ANP-Plasmaspiegel eine Korrelation mit der Langzeitüberlebensrate nach einem akuten Herzinfarkt [95]. Die Arbeitsgruppe um C. Hall konnte insbesondere das N-ANP als unabhängigen Prognosefaktor für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz und der zukünftigen kardiovaskulären Mortalität nach einem akuten Herzinfarkt feststellen [96]. Da das BNP im Gegensatz zum ANP hauptsächlich aus dem linken Ventrikel exprimiert wird, ist gegenwärtig das BNP bzw. NT-proBNP als Biomarker insbesondere in Hinsicht auf die linksventrikuläre Funktion hochinteressant. In einer Subpopulation der PEACE-Studie zeigte sich in der univariablen Analyse, dass sowohl BNP als auch NT-proBNP signifikante Prädiktoren der kardiovaskulären Mortalität, des Schlaganfalls und der Herzinsuffizienz, nicht aber des tödlichen oder nichttödlichen Herzinfarktes darstellten [159]. Nach der Angleichung der Risikofaktoren blieb NT-proBNP in der multivariablen Analyse ein unabhängiger signifikanter Prädiktor für kardiovaskuläre Mortalität, Herzinsuffizienz und Insult.

Wolber et al. formulierten 2006 ein diagnostisches Score System, welches durch physische Belastung, klinische Daten und BNP-Plasmaspiegel nichtinvasiv zwischen Menschen mit einer KHK und kardial gesunden Menschen unterscheiden kann [160]. Als Biomarker für die akute Dyspnoe zur Differenzierung einer kardial bedingten Dyspnoe haben sich inzwischen BNP und

NT-proBNP als entsprechende Biomarker etabliert [161].

Der therapeutische Einsatz von natriuretischen Peptiden wird ebenfalls intensiv erforscht. Als Gegenspieler des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) spielen die natriuretischen Peptide eine besondere Rolle in der Phase der akuten myokardialen Schädigung. Die persistierende Aktivierung des RAAS, des sympathischen Nervensystems und des Endothelin 1 Systems geht mit dem Überwiegen vasokonstriktorischer Systeme einher. Die hiermit verbundene Zunahme von Vor- und Nachlast des geschädigten Myokards bedeutet eine weitere Verschlechterung der kardialen Situation. Ferner ist für Noradrenalin, dem Transmitter des aktivierten sympathischen Nervensystems, eine direkte kardiotoxische Wirkung bekannt. Angiotensin II (AT II) und Endothelin-1 werden mit mitogenen Wirkungen in Verbindung gebracht, die Relevanz im Hinblick auf kardiales und vaskuläres Remodelling erlangen. Wichtige Antagonisten der vasokonstriktorisches wirkenden Mediatoren sind das ANP und das BNP. Entsprechend intensiv wird an deren therapeutischem Einsatz geforscht. Bereits 1989 untersuchte Adnot et. al. die Wirkungen von Infusionen mit atrialem natriuretischem Peptid [162]. Für die intravenöse ANP-Applikation konnte Hayashi et al. eine Verbesserung der linksventrikulären Funktion nach einem akuten Vorderwandinfarkt gegenüber der mit Nitroglycerin behandelten Vergleichsgruppe dokumentieren [163]. An isolierten Rattenherzen konnte demonstriert werden, dass die Applikation von synthetischem ANP das Infarktareal verkleinert [164]. In einer großen prospektiven, doppelblind randomisierten Studie konnte 2007 gezeigt werden, dass die Patienten mit einem akuten Herzinfarkt, welche eine Reperfusionstherapie und zusätzlich ANP-Infusionen erhalten hatten, ein verkleinertes Infarktareal, weniger Reperfusionsschäden und eine bessere Prognose als die Kontrollpatienten hatten [165]. So wird vielleicht in naher Zukunft das ANP einen wichtigen Stellenwert in der Therapie des akuten Koronarsyndroms darstellen.

Nesiritide als synthetisch hergestelltes BNP wird gegenwärtig ebenfalls ausgiebig erforscht und erprobt. Nesiritide ist bereits in den USA zur Behandlung von Patienten mit dekompensierter Herzinsuffizienz mit starker Dyspnoe in Ruhe oder bei minimaler Belastung zugelassen. Bei diesen Patienten wird durch die Verabreichung von BNP der pulmonale kapilläre Wedge Druck reduziert und somit die Dyspnoe verringert. Einschränkung zu den positiven Wirkungen von Nesiritide wirkte das Ergebnis einer Metaanalyse von Sackner-Bernstein [166]. Beim Vergleich von Nesiritide mit anderen nichtinotropen Substanzen wie Diuretika und Nitrate zeigte sich eine

erhöhte 30 Tage Sterberate in der Nesiritidegruppe.

In den nächsten Jahren werden weitere klinische Studien den Stellenwert der natriuretischen Peptide als Biomarker zur Diagnostik und Prognoseeinschätzung der KHK und deren therapeutischen Nutzen in der Therapie der koronaren Herzkrankheit und auch der Herzinsuffizienz klären.

4.5 Fehlerdiskussion

Abweichende Ergebnisse der eigenen Daten von veröffentlichten Daten in der Literatur erfordern ein intensives Auseinandersetzen mit den Gründen für diese Differenzen. Assoziationsstudien, wie die vorliegende Arbeit, müssen dabei einer besonders kritischen Analyse unterzogen werden, da es durch soziale, geographische und ethnische Unterschiede sowie nicht berücksichtigte Einflussfaktoren innerhalb der Studiengruppen zu Verzerrungen und somit zu widersprüchlichen Ergebnissen kommen kann.

Für die Anerkennung einer polymorphen Genvariante als Risikofaktor einer Erkrankung sind daher hohe Anforderungen notwendig. Jeder Mensch ist Träger einer Vielzahl polymorpher Erbanlagen, die nur zum Teil eine direkte Auswirkung auf den Phänotypen haben. Solche genetischen Varianten können jedoch auch mit einer erhöhten Empfänglichkeit oder auch Resistenz gegenüber Erkrankungen einhergehen. Um eine Verknüpfung zwischen Polymorphismus und Krankheit herzustellen, müssen deshalb verschiedene Kriterien erfüllt sein:

1. Es ist eine plausible Beziehung zwischen dem kodiertem Protein und der Pathogenese der Erkrankung notwendig.
2. Eine ausreichende Studiengröße mit einer entsprechenden Fallzahl ist erforderlich. In kleinen Studien zeigen sich immer wieder eindrucksvolle Ergebnisse, die nach einer Analyse von Kastrati et al. möglicherweise durch ein „publication bias“ bedingt sind [167]. Es gilt aber zu berücksichtigen, dass bei großen Studienpopulationen eine stärkere Unschärfe bei der Patientenselektion ihrerseits wieder zur Abschwächung der beobachteten Effekte führen kann.
3. Die ethnische Zugehörigkeit und Homogenität der untersuchten Gruppe spielt eine entscheidende Rolle bei der Begutachtung der Ergebnisse. Die starken Schwankungen der Genotypenfrequenzen zwischen den verschiedenen ethnischen Bevölkerungsgruppen

unterstreichen diese Notwendigkeit. Mit 264 Koronarpatienten und 228 Kontrollprobanden als Vergleichsgruppe ist die Fallzahl der vorliegenden Arbeit zwar relativ klein, zeichnet sich aber dafür durch eine klare klinische Charakterisierung und geographische Begrenzung aus. Die Patientenrekrutierung erfolgte aus der Region Berlin/Brandenburg und alle Personen waren weiße Europäer (Kaukasier). Einschlusskriterien waren eine koronarangiografisch nachgewiesene Stenose von $>50\%$ in einem Koronargefäß oder eine Zwei- bzw. Dreifäßerkrankung. In anderen Studien wird dagegen die Fallgruppe anhand klinischer Kriterien definiert [168,169]. Durch Unterschiede bei Alter, Geschlechterverteilung, Begleiterkrankungen, ethnischer Zugehörigkeit und Lebensweise sind verschiedene Studienpopulationen insgesamt nur eingeschränkt miteinander vergleichbar.

Eine weitere Schwachstelle bei der Auswahl der Patienten in fast allen Publikationen, wie auch in der vorliegenden Arbeit, ist die fehlende Erfassung der primär letalen Myokardinfarkte, da die überwiegend retrospektiven Analysen nur die Überlebenden nach einem stattgehabten Myokardinfarkt rekrutieren. Unter diesem Gesichtspunkt könnte spekuliert werden, dass diese Patienten über protektive Eigenschaften verfügen müssten.

In der hier präsentierten Studie wurde versucht, durch eine eindeutige Einteilung der Risikofaktoren und einen entsprechenden koronarangiografischen Normalbefund die Kontrollgruppe klar zu definieren. In ihrer Zusammensetzung unterschied sich die Kontrollgruppe bezüglich der unsererseits bestimmten Risikofaktoren nicht signifikant von der Gruppe der Koronarpatienten. Hierbei ist einschränkend zu bemerken, dass weitere bekannte und wichtige Risikofaktoren, wie Rauchen, Adipositas, positive Familienanamnese aufgrund technischer Einschränkungen nicht erfasst wurden. Die ideale Vergleichsgruppe einer entsprechenden Fall-Kontroll-Studie würde somit aus einer randomisierten Zufallsauswahl aus der gesunden Bevölkerungsgruppe mit einem unauffälligen Koronarbefund und einem identischen Risikoprofil bezüglich aller bekannten Risikofaktoren zur Fallgruppe bestehen.

5 Zusammenfassung

Die koronare Herzkrankheit (KHK) wird als multifaktorielles Krankheitsbild durch die Interaktion von erblichen Merkmalen mit diversen Risikofaktoren hervorgerufen. Während Risikofaktoren wie beispielsweise arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus und Hyperlipidämie weitgehend aufgeklärt sind, liegt die komplexe Genetik dieser Erkrankung noch weitgehend im Unklaren. Das atriale natriuretische Peptid (ANP) scheint hierbei eine wichtige Rolle zu spielen.

In Form einer retrospektiven Fall-Kontroll-Studie wurden dazu anhand von 264 KHK-Patienten und 228 Kontrollpersonen die bekannten Polymorphismen G664A, C708T, G1837A und T2238C des ANP untersucht. Die Genotypisierung erfolgte durch PCR und anschließender Sequenzierung für die Polymorphismen G664A und C708T sowie PCR und folgendem Restriktionsverdau bei den Polymorphismen G1837A und T2238C. Darüber hinaus wurden im Blut der ANP- und cGMP-Spiegel sowie die entsprechende cGMP/ANP-Ratio bestimmt. Die Einteilung in die Fall- und Kontrollgruppe erfolgte anhand des Koronarangiografiebefundes. Von allen teilnehmenden Probanden waren weiterhin das Geschlecht, das Alter zum Zeitpunkt der Untersuchung, die Ejektionsfraktion des Herzens und das Vorliegen der Risikofaktoren arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus und Hyperlipidämie bekannt. Neben dem Einfluss der Polymorphismen auf die KHK untersuchte diese Studie auch den Zusammenhang zum ANP-Plasmaspiegel, der Ejektionsfraktion und dem arteriellen Hypertonus.

Die Fall- und Kontrollgruppe waren bezüglich der Risikofaktoren Alter, Geschlecht, arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus und Hyperlipidämie nicht signifikant verschieden. Alle vier untersuchten Genvarianten unterlagen dem Hardy-Weinberg-Gesetz. Unter Annahme eines dominanten Erbganges für das T-Allel des Polymorphismus T2238C konnte eine signifikante Assoziation des T-Allel zur koronaren Herzkrankheit gezeigt werden ($p=0,04$; $OR=7,081$). Ferner befinden sich die Polymorphismen G664A und G1837A sowie C708T und T2238C im Kopplungsungleichgewicht. Die untersuchten Polymorphismen zeigten weder eine Assoziation zum ANP-Spiegel noch zur Ejektionsfraktion oder zum arteriellen Hypertonus.

In der Fallgruppe zeigte sich der ANP-Spiegel gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht (50,20 fmol/ml vs. 45,75 fmol/ml; $p=0,014$). Die cGMP/ANP-Ratio war in der Fallgruppe signifikant niedriger ($p<0,001$) und könnte für eine Abnahme der Aktivität der natriuretischen Peptidrezeptoren bei der koronaren Herzkrankheit sprechen. Bei der Interpretation des erhöhten

ANP-Spiegels ist die signifikant unterschiedliche Ejektionsfraktion zwischen der Fall- und Kontrollgruppe in der Diskussion zu berücksichtigen (63,92 % vs. 75,2 2%; $p < 0,001$).

Daraus schlussfolgernd ergeben sich bezugnehmend auf die anfänglichen Fragestellungen folgende Kernaussagen zu den vorliegenden Ergebnissen:

1. Homozygote CC-Träger des T2238C Polymorphismus haben bei Annahme eines T-dominanten Erbganges ein um den Faktor sieben erniedrigtes Risiko an einer KHK zu erkranken. Die Polymorphismen G664A, C708T und G1837A zeigen keine Assoziation zur koronaren Herzerkrankung.
2. Die vier untersuchten Polymorphismen des ANP zeigen keine Assoziation zum arteriellen Hypertonus.
3. Die vier untersuchten Polymorphismen des ANP zeigen keine Assoziation zur Ejektionsfraktion oder Herzinsuffizienz.
4. KHK-Patienten haben einen erhöhten ANP-Spiegel. Der erhöhte ANP-Spiegel scheint eng mit einer linksventrikulären Funktionsstörung verknüpft zu sein.
5. Eine erniedrigte cGMP/ANP-Ratio in der Fallgruppe unterstützt die publizierte These, dass es bei einer Herzinsuffizienz zu einem Wirkungsverlust der natriuretischen Peptide kommt.
6. Die vier untersuchten Polymorphismen des ANP zeigen keine Assoziation zum ANP-Spiegel.

6 Literaturverzeichnis

1. Sans, S.; Kesteloot, H. und Kromhout, D. (1997): The burden of cardiovascular diseases mortality in Europe. Task Force of the European Society of Cardiology on Cardiovascular Mortality and Morbidity Statistics in Europe, *Eur.Heart J.* 18 [8], Seite 1231-1248.
2. AOK Bundesverband. Krankheitsartenstatistik 1995 (1998) Arbeitsunfähigkeits- und Krankenhausfälle nach Krankheitsarten, Alter, Dauer. Bonn. 1998.
3. Klever-Deichert, G.; Hinzpeter, B.; Hunsche, E. und Lauterbach, K. W. (1999): [Costs of coronary heart diseases over the remaining life time in coronary heart disease cases--an analysis of the current status of coronary heart disease cases in Germany from the social perspective], *Z.Kardiol.* 88 [12], Seite 991-1000.
4. Mittelmark, M. B.; Psaty, B. M.; Rautaharju, P. M.; Fried, L. P.; Borhani, N. O.; Tracy, R. P.; Gardin, J. M. und O'Leary, D. H. (1993): Prevalence of cardiovascular diseases among older adults. The Cardiovascular Health Study, *Am.J.Epidemiol.* 137 [3], Seite 311-317.
5. Margolis, J. R.; Gillum, R. F.; Feinleib, M.; Brasch, R. und Fabsitz, R. (1976): Community surveillance for coronary heart disease: the Framingham Cardiovascular Disease survey. Comparisons with the Framingham Heart Study and previous short-term studies, *Am.J.Cardiol.* 37 [1], Seite 61-67.
6. Angehrn, W (2001): Die chronische koronare Herzkrankheit, *Schweiz Med Forum* 48, Seite 1187-1191.
7. Slack, J. und Evans, K.A. (1966): The increased risk of death from ischaemic heart disease in first-degree relatives of 121 men and 96 women with ischaemic heart disease, *J.Med.Genet.* 3, Seite 2357-2392.
8. Shea, S.; Ottman, R.; Gabrieli, C.; Stein, Z. und Nichols, A. (1984): Family history as an independent risk factor for coronary artery disease, *J.Am.Coll.Cardiol.* 4 [4], Seite 793-801.
9. de Faire, U. und Pedersen, N. (1994): Studies of twins and adoptees in coronary heart disease, *Genetic Factors in Coronary Heart Disease* , Seite 55-68, Kluwer Acad.Publ.
10. Wilson, P. W.; D'Agostino, R. B.; Levy, D.; Belanger, A. M.; Silbershatz, H. und Kannel, W. B. (1998): Prediction of coronary heart disease using risk factor categories, *Circulation* 97 [18], Seite 1837-1847.
11. Grundy, S. M.; Pasternak, R.; Greenland, P.; Smith S Jr und Fuster, V. (1999): Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the

- American College of Cardiology, *Circulation* 100 [13], Seite 1481-1492.
12. MacMahon, S.; Peto, R.; Cutler, J.; Collins, R.; Sorlie, P.; Neaton, J.; Abbott, R.; Godwin, J.; Dyer, A. und Stamler, J. (1990): Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 1, Prolonged differences in blood pressure: prospective observational studies corrected for the regression dilution bias, *lancet* 335 [8692], Seite 765-774.
 13. Alexander, R. W. (1995): Theodore Cooper Memorial Lecture. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective, *Hypertension* 25 [2], Seite 155-161.
 14. Grim, C.E. und Robinson, M.T. (1994): 11. Blood pressure variation, Goldbourt U und et al., *Genetic Factors in Coronary Heart Disease*, Seite 153-177, Kluwer Acad. Publ.
 15. Burke, W. und Motulsky, A.G. (1992): Hypertension, King RA und et al., *The Genetic basis of Common Diseases*, Seite 170-191, Oxford Univ.Press, New York.
 16. Whelton, P. K. (1994): Epidemiology of hypertension, *lancet* 344 [8915], Seite 101-106.
 17. Epstein, F.H. und Eckoff, R.D. (1967): The epidemiology of high blood pressure, Stamler J; Stamler R und Pullman TN, *The Epidemiology of Hypertension*, Seite 155-166, Grune and Stratton, New York.
 18. Poch, E.; Gonzalez, D.; Giner, V.; Bragulat, E.; Coca, A. und de la, Sierra A. (2001): Molecular basis of salt sensitivity in human hypertension. Evaluation of renin-angiotensin-aldosterone system gene polymorphisms, *Hypertension* 38 [5], Seite 1204-1209.
 19. Baudin, B. (2005): Polymorphism in angiotensin II receptor genes and hypertension, *Exp.Physiol* 90 [3], Seite 277-282.
 20. Strategies for the prevention of coronary heart disease: a policy statement of the European Atherosclerosis Society, (1987), *Eur.Heart J.* 8 [1], Seite 77-88.
 21. Kannel, W. B.; Castelli, W. P.; Gordon, T. und McNamara, P. M. (1971): Serum cholesterol, lipoproteins, and the risk of coronary heart disease. The Framingham study, *Ann.Intern.Med.* 74 [1], Seite 1-12.
 22. Assmann, G. und Schulte, H. (1990): Primary prevention of coronary heart disease in the Federal Republic of Germany. Analysis of cost-effectiveness, *Drugs* 40 Suppl 1, Seite 33-37.
 23. The recognition and management of hyperlipidaemia in adults: A policy statement of the European Atherosclerosis Society, (1988), *Eur.Heart J.* 9 [5], Seite 571-600.
 24. Pekkanen, J.; Linn, S.; Heiss, G.; Suchindran, C. M.; Leon, A.; Rifkind, B. M. und

- Tyroler, H. A. (1990): Ten-year mortality from cardiovascular disease in relation to cholesterol level among men with and without preexisting cardiovascular disease, *N.Engl.J.Med.* 322 [24], Seite 1700-1707.
25. Pyorala, K.; Pedersen, T. R.; Kjekshus, J.; Faergeman, O.; Olsson, A. G. und Thorgeirsson, G. (1997): Cholesterol lowering with simvastatin improves prognosis of diabetic patients with coronary heart disease. A subgroup analysis of the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S), *Diabetes Care* 20 [4], Seite 614-620.
 26. Wilson, P. W.; Myers, R. H.; Larson, M. G.; Ordovas, J. M.; Wolf, P. A. und Schaefer, E. J. (1994): Apolipoprotein E alleles, dyslipidemia, and coronary heart disease. The Framingham Offspring Study, *JAMA* 272 [21], Seite 1666-1671.
 27. Lahoz, C.; Schaefer, E. J.; Cupples, L. A.; Wilson, P. W.; Levy, D.; Osgood, D.; Parpos, S.; Pedro-Botet, J.; Daly, J. A. und Ordovas, J. M. (2001): Apolipoprotein E genotype and cardiovascular disease in the Framingham Heart Study, *Atherosclerosis* 154 [3], Seite 529-537.
 28. Stengard, J. H.; Zerba, K. E.; Pekkanen, J.; Ehnholm, C.; Nissinen, A. und Sing, C. F. (1995): Apolipoprotein E polymorphism predicts death from coronary heart disease in a longitudinal study of elderly Finnish men, *Circulation* 91 [2], Seite 265-269.
 29. Laakso, M.; Ronnema, T.; Pyorala, K.; Kallio, V.; Puukka, P. und Penttila, I. (1988): Atherosclerotic vascular disease and its risk factors in non-insulin-dependent diabetic and nondiabetic subjects in Finland, *Diabetes Care* 11 [6], Seite 449-463.
 30. Karvonen, M.; Viik-Kajander, M.; Moltchanova, E.; Libman, I.; LaPorte, R. und Tuomilehto, J. (2000): Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group, *Diabetes Care* 23 [10], Seite 1516-1526.
 31. Keen, H. und Ekoe, J. M. (1984): The geography of diabetes mellitus, *Br.Med.Bull.* 40 [4], Seite 359-365.
 32. Karvonen, M.; Tuomilehto, J.; Libman, I. und LaPorte, R. (1993): A review of the recent epidemiological data on the worldwide incidence of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. World Health Organization DIAMOND Project Group, *Diabetologia* 36 [10], Seite 883-892.
 33. Kyvik, K. O.; Green, A. und Beck-Nielsen, H. (1995): Concordance rates of insulin dependent diabetes mellitus: a population based study of young Danish twins, *BMJ* 311 [7010], Seite 913-917.
 34. Kaprio, J.; Tuomilehto, J.; Koskenvuo, M.; Romanov, K.; Reunanen, A.; Eriksson, J.; Stengard, J. und Kesaniemi, Y. A. (1992): Concordance for type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based cohort of twins in Finland, *Diabetologia* 35 [11], Seite 1060-1067.

35. Barnett, A. H.; Eff, C.; Leslie, R. D. und Pyke, D. A. (1981): Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs, *Diabetologia* 20 [2], Seite 87-93.
36. Pyke, D. A. (1979): Diabetes: the genetic connections, *Diabetologia* 17 [6], Seite 333-343.
37. Ballinger, S. W.; Shoffner, J. M.; Hedaya, E. V.; Trounce, I.; Polak, M. A.; Koontz, D. A. und Wallace, D. C. (1992): Maternally transmitted diabetes and deafness associated with a 10.4 kb mitochondrial DNA deletion, *Nat.Genet.* 1 [1], Seite 11-15.
38. Oka, Y.; Katagiri, H.; Yazaki, Y.; Murase, T. und Kobayashi, T. (1993): Mitochondrial gene mutation in islet-cell-antibody-positive patients who were initially non-insulin-dependent diabetics, *lancet* 342 [8870], Seite 527-528.
39. Oka, Y.; Katagiri, H.; Ishihara, H.; Asano, T.; Kikuchi, M. und Kobayashi, T. (1995): Mitochondrial diabetes mellitus--glucose-induced signaling defects and beta-cell loss, *Muscle Nerve* 3, Seite S131-S136.
40. O'Rahilly, S. (1997): Science, medicine, and the future. Non-insulin dependent diabetes mellitus: the gathering storm, *BMJ* 314 [7085], Seite 955-959.
41. de Bold, A. J.; Borenstein, H. B.; Veress, A. T. und Sonnenberg, H. (1981): A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats, *life sci.* 28 [1], Seite 89-94.
42. Sudoh, T.; Kangawa, K.; Minamino, N. und Matsuo, H. (1988): A new natriuretic peptide in porcine brain, *Nature* 332 [6159], Seite 78-81.
43. Sudoh, T.; Minamino, N.; Kangawa, K. und Matsuo, H. (1990): C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 168 [2], Seite 863-870.
44. Schweitz, H.; Vigne, P.; Moinier, D.; Frelin, C. und Lazdunski, M. (1992): A new member of the natriuretic peptide family is present in the venom of the green mamba (*Dendroaspis angusticeps*), *J.Biol.Chem.* 267 [20], Seite 13928-13932.
45. Seidman, C. E.; Duby, A. D.; Choi, E.; Graham, R. M.; Haber, E.; Homcy, C.; Smith, J. A. und Seidman, J. G. (1984): The structure of rat preproatrial natriuretic factor as defined by a complementary DNA clone, *Science* 225 [4659], Seite 324-326.
46. Seidman, C. E.; Bloch, K. D.; Klein, K. A.; Smith, J. A. und Seidman, J. G. (1984): Nucleotide sequences of the human and mouse atrial natriuretic factor genes, *Science* 226 [4679], Seite 1206-1209.
47. Koller, K. J. und Goeddel, D. V. (1992): Molecular biology of the natriuretic peptides and their receptors, *Circulation* 86 [4], Seite 1081-1088.

48. Maki, M.; Takayanagi, R.; Misono, K. S.; Pandey, K. N.; Tibbetts, C. und Inagami, T. (1984): Structure of rat atrial natriuretic factor precursor deduced from cDNA sequence, *Nature* 309 [5970], Seite 722-724.
49. Yamanaka, M.; Greenberg, B.; Johnson, L.; Seilhamer, J.; Brewer, M.; Friedemann, T.; Miller, J.; Atlas, S.; Laragh, J.; Lewicki, J. und . (1984): Cloning and sequence analysis of the cDNA for the rat atrial natriuretic factor precursor, *Nature* 309 [5970], Seite 719-722.
50. Zivin, R. A.; Condra, J. H.; Dixon, R. A.; Seidah, N. G.; Chretien, M.; Nemer, M.; Chamberland, M. und Drouin, J. (1984): Molecular cloning and characterization of DNA sequences encoding rat and human atrial natriuretic factors, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 81 [20], Seite 6325-6329.
51. Oikawa, S.; Imai, M.; Ueno, A.; Tanaka, S.; Noguchi, T.; Nakazato, H.; Kangawa, K.; Fukuda, A. und Matsuo, H. (1984): Cloning and sequence analysis of cDNA encoding a precursor for human atrial natriuretic polypeptide, *Nature* 309 [5970], Seite 724-726.
52. Baxter JD; Lewicki JA und Gardner DG (1988): Atrial natriuretic peptide, *Bio-Technology* 6, Seite 529-546.
53. de Bold, A. J. (1985): Atrial natriuretic factor: a hormone produced by the heart, *Science* 230 [4727], Seite 767-770.
54. Bloch, K. D.; Scott, J. A.; Zisfein, J. B.; Fallon, J. T.; Margolies, M. N.; Seidman, C. E.; Matsueda, G. R.; Homcy, C. J.; Graham, R. M. und Seidman, J. G. (1985): Biosynthesis and secretion of proatrial natriuretic factor by cultured rat cardiocytes, *Science* 230 [4730], Seite 1168-1171.
55. Abe, T.; Nishiyama, K.; Snajdar, R.; He, X. und Misono, K. S. (1993): Aortic smooth muscle contains guanylate-cyclase-coupled 130-kDa atrial natriuretic factor receptor as predominant receptor form. Spontaneous switching to 60-kDa C-receptor upon cell culturing, *Eur.J.Biochem.* 217 [1], Seite 295-304.
56. Nakayama, K.; Ohkubo, H.; Hirose, T.; Inayama, S. und Nakanishi, S. (1984): mRNA sequence for human cardiodilatin-atrial natriuretic factor precursor and regulation of precursor mRNA in rat atria, *Nature* 310 [5979], Seite 699-701.
57. Vesely, D. L. (1995): Atrial natriuretic hormones originating from the N-terminus of the atrial natriuretic factor prohormone, *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* 22 [2], Seite 108-114.
58. Levin, E. R.; Gardner, D. G. und Samson, W. K. (1998): Natriuretic peptides, *N.Engl.J.Med.* 339 [5], Seite 321-328.
59. Gu, J.; D`Andrea, M. und Seethapathy, M. (1989): Atrial natriuretic peptide and its messenger ribonucleic acid in overloaded and overload-released ventricles of rat,

- Endocrinology 125, Seite 2066-2074.
60. Saito, Y.; Nakao, K.; Arai, H.; Nishimura, K.; Okumura, K.; Obata, K.; Takemura, G.; Fujiwara, H.; Sugawara, A.; Yamada, T. und . (1989): Augmented expression of atrial natriuretic polypeptide gene in ventricle of human failing heart, *J.Clin.Invest* 83 [1], Seite 298-305.
 61. Gardner, D.G.; Deschepper, C.F.; Ganong, W.F.; Hane, S.; Fiddes, J.; Baxter, J.D. und Lewicki, J. (1986): Extra-atrial expression of the gene for atrial natriuretic factor, *Proc Natl Acad Sci USA* 83, Seite 6697-6701.
 62. Gardner, D.G.; Vlasuk, G.P.; Baxter, J.D.; Fiddes, J.C. und Lewicki, J.A. (1987): Identification of atrial natriuretic factor gene transcripts in the central nervous system of the rat, *Proc Natl Acad Sci USA* 84, Seite 2175-2179.
 63. Davidson, N. C. und Struthers, A. D. (1994): Brain natriuretic peptide, *J.Hypertens.* 12 [4], Seite 329-336.
 64. Yasue, H.; Yoshimura, M.; Sumida, H.; Kikuta, K.; Kugiyama, K.; Jougasaki, M.; Ogawa, H.; Okumura, K.; Mukoyama, M. und Nakao, K. (1994): Localization and mechanism of secretion of B-type natriuretic peptide in comparison with those of A-type natriuretic peptide in normal subjects and patients with heart failure, *Circulation* 90 [1], Seite 195-203.
 65. Yandle TG; Richards AM; Nicholls MG; Cueno R; Espiner EA und Livesy JH (1986): Metabolic clearance rate and plasma half-life of alfa-human atrial natriuretic peptide in man, *Life Sci* 38, Seite 1827-1833.
 66. Knowlton, K. U.; Baracchini, E.; Ross, R. S.; Harris, A. N.; Henderson, S. A.; Evans, S. M.; Glembotski, C. C. und Chien, K. R. (1991): Co-regulation of the atrial natriuretic factor and cardiac myosin light chain-2 genes during alpha-adrenergic stimulation of neonatal rat ventricular cells. Identification of cis sequences within an embryonic and a constitutive contractile protein gene which mediate inducible expression, *J.Biol.Chem.* 266 [12], Seite 7759-7768.
 67. Levin, E. R.; Isackson, P. J. und Hu, R. M. (1991): Endothelin increases atrial natriuretic peptide production in cultured rat diencephalic neurons, *Endocrinology* 128 [6], Seite 2925-2930.
 68. Sato, A.; Canny, B. J. und Autelitano, D. J. (1997): Adrenomedullin stimulates cAMP accumulation and inhibits atrial natriuretic peptide gene expression in cardiomyocytes, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 230 [2], Seite 311-314.
 69. Focaccio, A.; Volpe, M.; Ambrosio, G.; Lembo, G.; Pannain, S.; Rubattu, S.; Enea, I.; Pignatola, S. und Chiariello, M. (1993): Angiotensin II directly stimulates release of atrial natriuretic factor in isolated rabbit hearts, *Circulation* 87 [1], Seite 192-198.

70. Volpe, M.; Atlas, S. A.; Sosa, R. E.; Marion, D. E.; Mueller, F. B.; Sealey, J. E. und Laragh, J. H. (1990): Angiotensin II-induced atrial natriuretic factor release in dogs is not related to hemodynamic responses, *Circ.Res.* 67 [3], Seite 774-779.
71. de Zeeuw, D.; Janssen, W. M. und de Jong, P. E. (1992): Atrial natriuretic factor: Its (patho)physiological significance in humans, *Kidney Int* 41, Seite 1115-1133.
72. Inagami, T. (1989): Atrial natriuretic factor, *J.Biol.Chem.* 264 [6], Seite 3043-3046.
73. Awazu, M. und Ichikawa, I. (1993): Biological significance of atrial natriuretic peptide in the kidney, *Nephron* 63 [1], Seite 1-14.
74. Wijeyaratne, C. N. und Moulton, P. J. (1993): The effect of alpha human atrial natriuretic peptide on plasma volume and vascular permeability in normotensive subjects, *J.Clin.Endocrinol.Metab* 76 [2], Seite 343-346.
75. Volpe, M.; Mele, A. F.; Indolfi, C.; De Luca, N.; Lembo, G.; Focaccio, A.; Condorelli, M. und Trimarco, B. (1987): Hemodynamic and hormonal effects of atrial natriuretic factor in patients with essential hypertension, *J.Am.Coll.Cardiol.* 10 [4], Seite 787-793.
76. Winquist, R. J.; Faison, E. P.; Waldman, S. A.; Schwartz, K.; Murad, F. und Rapoport, R. M. (1984): Atrial natriuretic factor elicits an endothelium-independent relaxation and activates particulate guanylate cyclase in vascular smooth muscle, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 81 [23], Seite 7661-7664.
77. Kleinert, H. D.; Volpe, M.; Odell, G.; Marion, D.; Atlas, S. A.; Camargo, M. J.; Laragh, J. H. und Maack, T. (1986): Cardiovascular effects of atrial natriuretic factor in anesthetized and conscious dogs, *Hypertension* 8 [4], Seite 312-316.
78. Maack, T.; Marion, D. N.; Camargo, M. J.; Kleinert, H. D.; Laragh, J. H.; Vaughan, E. D., Jr. und Atlas, S. A. (1984): Effects of auriculin (atrial natriuretic factor) on blood pressure, renal function, and the renin-aldosterone system in dogs, *Am.J.Med.* 77 [6], Seite 1069-1075.
79. Sosa, R. E.; Volpe, M.; Marion, D. N.; Glorioso, N.; Laragh, J. H.; Vaughan, E. D., Jr.; Maack, T. und Atlas, S. A. (1985): Effect of atrial natriuretic factor on renin secretion, plasma renin and aldosterone in dogs with acute unilateral renal artery constriction, *J.Hypertens.Suppl* 3 Suppl 3, Seite S299-S302.
80. Sonnenberg, H.; Honrath, U.; Chong, C. K. und Wilson, D. R. (1986): Atrial natriuretic factor inhibits sodium transport in medullary collecting duct, *Am.J.Physiol* 250 [6 Pt 2], Seite F963-F966.
81. Harris, P. J.; Thomas, D. und Morgan, T. O. (1987): Atrial natriuretic peptide inhibits angiotensin-stimulated proximal tubular sodium and water reabsorption, *Nature* 326 [6114], Seite 697-698.

82. Stockand, J. D. und Sansom, S. C. (1997): Regulation of filtration rate by glomerular mesangial cells in health and diabetic renal disease, *Am.J.Kidney Dis.* 29 [6], Seite 971-981.
83. Fried, T. A.; McCoy, R. N.; Osgood, R. W. und Stein, J. H. (1986): Effect of atriopeptin II on determinants of glomerular filtration rate in the in vitro perfused dog glomerulus, *Am.J.Physiol* 250 [6 Pt 2], Seite F1119-F1122.
84. Burnett, J. C., Jr.; Kao, P. C.; Hu, D. C.; Hesser, D. W.; Heublein, D.; Granger, J. P.; Opgenorth, T. J. und Reeder, G. S. (1986): Atrial natriuretic peptide elevation in congestive heart failure in the human, *Science* 231 [4742], Seite 1145-1147.
85. Ganguly, A.; Chiou, S.; West, L. A. und Davis, J. S. (1989): Atrial natriuretic factor inhibits angiotensin-induced aldosterone secretion: not through cGMP or interference with phospholipase C, *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 159 [1], Seite 148-154.
86. Fujisaki, H.; Ito, H.; Hirata, Y.; Tanaka, M.; Hata, M.; Lin, M.; Adachi, S.; Akimoto, H.; Marumo, F. und Hiroe, M. (1995): Natriuretic peptides inhibit angiotensin II-induced proliferation of rat cardiac fibroblasts by blocking endothelin-1 gene expression, *J.Clin.Invest* 96 [2], Seite 1059-1065.
87. Nakao, K.; Morii, N.; Itoh, H.; Yamada, T.; Shiono, S.; Sugawara, A.; Saito, Y.; Mukoyama, M.; Arai, H.; Sakamoto, M. und . (1986): Atrial natriuretic polypeptide in the brain: implication of central cardiovascular control, *J.Hypertens.Suppl* 4 [6], Seite S492-S496.
88. Yang, R.; Jin, H.; Wyss, J. M.; Chen, Y. F. und Oparil, S. (1992): Salt supplementation does not alter the pressor effect of blocking atrial natriuretic peptide in nucleus tractus solitarii, *Hypertension* 20 [2], Seite 242-246.
89. Schultz, H. D.; Gardner, D. G.; Deschepper, C. F.; Coleridge, H. M. und Coleridge, J. C. (1988): Vagal C-fiber blockade abolishes sympathetic inhibition by atrial natriuretic factor, *Am.J.Physiol* 255 [1 Pt 2], Seite R6-R13.
90. Blackburn, R. E.; Samson, W. K.; Fulton, R. J.; Stricker, E. M. und Verbalis, J. G. (1995): Central oxytocin and ANP receptors mediate osmotic inhibition of salt appetite in rats, *Am.J.Physiol* 269 [2 Pt 2], Seite R245-R251.
91. Burrell, L. M.; Lambert, H. J. und Baylis, P. H. (1991): Effect of atrial natriuretic peptide on thirst and arginine vasopressin release in humans, *Am.J.Physiol* 260 [3 Pt 2], Seite R475-R479.
92. Jougasaki, M.; Yasue, H.; Mukoyama, M.; Nakao, K. und Takahashi, K. (1990): Appearance of atrial natriuretic peptide in the ventricles in patients with myocardial infarction, *Am.Heart J.* 119 [1], Seite 92-96.

93. Tan, A. C.; van Loenhout, T. T.; Lamfers, E. J.; Hooghoudt, T. E.; Kloppenborg, P. W. und Benraad, T. J. (1989): Atrial natriuretic peptide after myocardial infarction, *Am.Heart J.* 118 [3], Seite 490-494.
94. Rouleau, J. L.; Packer, M.; Moye, L.; de Champlain, J.; Bichet, D.; Klein, M.; Rouleau, J. R.; Sussex, B.; Arnold, J. M.; Sestier, F. et al. (1994): Prognostic value of neurohumoral activation in patients with an acute myocardial infarction: effect of captopril, *J.Am.Coll.Cardiol.* 24 [3], Seite 583-591.
95. Omland, T.; Bonarjee, V. V.; Lie, R. T. und Caidahl, K. (1995): Neurohumoral measurements as indicators of long-term prognosis after acute myocardial infarction, *Am.J.Cardiol.* 76 [4], Seite 230-235.
96. Hall, C.; Rouleau, J. L.; Moye, L.; de Champlain, J.; Bichet, D.; Klein, M.; Sussex, B.; Packer, M.; Rouleau, J.; Arnold, M. O. et al. (1994): N-terminal proatrial natriuretic factor. An independent predictor of long-term prognosis after myocardial infarction, *Circulation* 89 [5], Seite 1934-1942.
97. Itoh, H; Pratt, R. E. und Dzau, V. J. (1990): Atrial natriuretic polypeptide inhibits hypertrophy of vascular smooth muscle cells, *J Clin Invest* 86, Seite 1690-1697.
98. Suenobu, N.; Shichiri, M.; Iwashina, M.; Marumo, F. und Hirata, Y. (1999): Natriuretic peptides and nitric oxide induce endothelial apoptosis via a cGMP-dependent mechanism, *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 19 [1], Seite 140-146.
99. Wu, C. F.; Bishopric, N. H. und Pratt, R. E. (1997): Atrial natriuretic peptide induces apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes, *J.Biol.Chem.* 272 [23], Seite 14860-14866.
100. Cao, L. und Gardner, D. G. (1995): Natriuretic peptides inhibit DNA synthesis in cardiac fibroblasts, *Hypertension* 25 [2], Seite 227-234.
101. Volpe, M.; Vecchione, F.; Cuocolo, A.; Lembo, G.; Pignalosa, S.; Condorelli, M. und Trimarco, B. (1988): Hemodynamic responses to atrial natriuretic factor in nephrectomized rabbits: attenuation of the circulatory consequences of acute volume expansion, *Circ.Res.* 63 [2], Seite 322-329.
102. Volpe, M.; Cuocolo, A.; Vecchione, F.; Lembo, G.; Pignalosa, S.; Condorelli, M. und Trimarco, B. (1989): Influence of volume expansion on hemodynamic effects of atrial natriuretic factor in rabbits, *Am.J.Physiol* 256 [3 Pt 2], Seite H852-H858.
103. Morishita, R.; Gibbons, G. H.; Pratt, R. E.; Tomita, N.; Kaneda, Y.; Ogihara, T. und Dzau, V. J. (1994): Autocrine and paracrine effects of atrial natriuretic peptide gene transfer on vascular smooth muscle and endothelial cellular growth, *J.Clin.Invest* 94 [2], Seite 824-829.
104. Casco, V. H.; Veinot, J. P.; Kuroski de Bold, M. L.; Masters, R. G.; Stevenson, M. M.

- und de Bold, A. J. (2002): Natriuretic peptide system gene expression in human coronary arteries, *J Histochem Cytochem* 50 [6], Seite 799-809.
105. Rubattu, S.; Lee-Kirsch, M. A.; DePaolis, P.; Giliberti, R.; Gigante, B.; Lombardi, A.; Volpe, M. und Lindpaintner, K. (1999): Altered structure, regulation, and function of the gene encoding the atrial natriuretic peptide in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat, *Circ.Res.* 85 [10], Seite 900-905.
106. Rubattu, S.; Giliberti, R.; Ganten, U. und Volpe, M. (1999): Differential brain atrial natriuretic peptide expression co-segregates with occurrence of early stroke in the stroke-prone phenotype of the spontaneously hypertensive rat, *J.Hypertens.* 17 [12 Pt 2], Seite 1849-1852.
107. Estrada, V.; Tellez, M. J.; Moya, J.; Fernandez-Durango, R.; Egido, J. und Fernandez Cruz, A. F. (1994): High plasma levels of endothelin-1 and atrial natriuretic peptide in patients with acute ischemic stroke, *Am.J.Hypertens.* 7 [12], Seite 1085-1089.
108. Rubattu, S.; Ridker, P.; Stampfer, M. J.; Volpe, M.; Hennekens, C. H. und Lindpaintner, K. (1999): The gene encoding atrial natriuretic peptide and the risk of human stroke, *Circulation* 100 [16], Seite 1722-1726.
109. Gruchala, M.; Cieciewicz, D.; Wasag, B.; Targonski, R.; Dubaniewicz, W.; Nowak, A.; Sobiczewski, W.; Ochman, K.; Romanowski, P.; Limon, J. und Rynkiewicz, A. (2003): Association of the ScaI atrial natriuretic peptide gene polymorphism with nonfatal myocardial infarction and extent of coronary artery disease, *Am.Heart J.* 145 [1], Seite 125-131.
110. Nannipieri, M.; Penno, G.; Pucci, L.; Colhoun, H.; Motti, C.; Bertacca, A.; Rizzo, L.; De Giorgio, L.; Zerbini, G.; Mangili, R. und Navalesi, R. (1999): Pronatriodilatin gene polymorphisms, microvascular permeability, and diabetic nephropathy in type 1 diabetes mellitus, *J.Am.Soc.Nephrol.* 10 [7], Seite 1530-1541.
111. Nannipieri, M.; Penno, G.; Pucci, L.; Colhoun, H.; Motti, C.; Bertacca, A.; Rizzo, L.; De Giorgio, L.; Zerbini, G.; Mangili, R. und Navalesi, R. (1999): Pronatriodilatin gene polymorphisms, microvascular permeability, and diabetic nephropathy in type 1 diabetes mellitus, *J.Am.Soc.Nephrol.* 10 [7], Seite 1530-1541.
112. Nannipieri, M.; Manganiello, M.; Pezzatini, A.; De Bellis, A.; Seghieri, G. und Ferrannini, E. (2001): Polymorphisms in the hANP (human atrial natriuretic peptide) gene, albuminuria, and hypertension, *Hypertension* 37 [6], Seite 1416-1422.
113. Ramasawmy, R.; Kotea, N.; Lu, C.; Sayada, C.; Baligadoo, S. und Krishnamoorthy, R. (1993): A new polymorphic restriction site at the human atrial natriuretic peptide (hANP) gene locus, *Hum.Genet.* 91 [5], Seite 509-510.
114. Rutledge, D. R.; Sun, Y. und Ross, E. A. (1995): Polymorphisms within the atrial

- natriuretic peptide gene in essential hypertension, *J.Hypertens.* 13 [9], Seite 953-955.
115. Chiang, F. T.; Tseng, C. D.; Hsu, K. L.; Lo, H. M.; Chern, T. H. und Tseng, Y. Z. (1996): Atrial natriuretic peptide gene polymorphism is not associated with essential hypertension: evidence of association with ethnic origin, *J.Hum.Hypertens.* 10 [5], Seite 334.
116. Schmidt, S.; Bluthner, M.; Giessel, R.; Strojek, K.; Bergis, K. H.; Grzeszczak, W. und Ritz, E. (1998): A polymorphism in the gene for the atrial natriuretic peptide and diabetic nephropathy. Diabetic Nephropathy Study Group, *Nephrol.Dial.Transplant.* 13 [7], Seite 1807-1810.
117. Schorr, U.; Beige, J.; Ringel, J.; Turan, S.; Kreutz, R.; Distler, A. und Sharma, A. M. (1997): Hpa II polymorphism of the atrial natriuretic peptide gene and the blood pressure response to salt intake in normotensive men, *J.Hypertens.* 15 [7], Seite 715-718.
118. Beige, J.; Ringel, J.; Hohenbleicher, H.; Rubattu, S.; Kreutz, R. und Sharma, A. M. (1997): HpaII-polymorphism of the atrial-natriuretic-peptide gene and essential hypertension in whites, *Am.J.Hypertens.* 10 [11], Seite 1316-1318.
119. Ramasawmy, R.; Kotea, N.; Lu, C. Y.; Sayada, C.; Baligadoo, S. und Krishnamoorthy, R. (1992): Investigation of the polymorphic ScaI site by a PCR-based assay at the human atrial natriuretic peptides (hANP) gene locus, *Hum.Genet.* 90 [3], Seite 323-324.
120. Masharani, U.; Nakashima, P. F.; Lim, D. W. und Frossard, P. M. (1988): NsiI and ScaI restriction fragment length polymorphisms at the atrial natriuretic peptides (ANP) gene locus, *Hum.Genet.* 80 [3], Seite 307.
121. Risch, N. und Merikangas, K. (1996): The future of genetic studies of complex human diseases, *Science* 273 [5281], Seite 1516-1517.
122. Gambaro, G.; Anglani, F. und D'Angelo, A. (2000): Association studies of genetic polymorphisms and complex disease, *lancet* 355 [9200], Seite 308-311.
123. Fuster, V.; Badimon, L.; Badimon, J. J. und Chesebro, J. H. (1992): The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1), *N.Engl.J.Med.* 326 [4], Seite 242-250.
124. Fuster, V.; Ross, R. und Topol, E.J. (1996): *Atherosclerosis and coronary artery disease*, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, New York, Seite 1-21.
125. Management of stable angina pectoris. Recommendations of the Task Force of the European Society of Cardiology, (1997), *Eur.Heart J.* 18 [3], Seite 394-413.
126. Nissen, S. E.; Gurley, J. C.; Grines, C. L.; Booth, D. C.; McClure, R.; Berk, M.; Fischer, C. und DeMaria, A. N. (1991): Intravascular ultrasound assessment of lumen size and

- wall morphology in normal subjects and patients with coronary artery disease, *Circulation* 84 [3], Seite 1087-1099.
127. Sanger, F.; Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 74 [12], Seite 5463-5467.
128. Gutkowska, J.; Bonan, R.; Roy, D.; Bourassa, M.; Garcia, R.; Thibault, G.; Genest, J. und Cantin, M. (1986): Atrial natriuretic factor in human plasma, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 139 [1], Seite 287-295.
129. Willenbrock, R.; Pagel, I.; Scheuermann, M.; Hohnel, K.; Mackenzie, H. S.; Brenner, B. M. und Dietz, R. (1999): Renal function in high-output heart failure in rats: role of endogenous natriuretic peptides, *J.Am.Soc.Nephrol.* 10 [3], Seite 572-580.
130. Barrett, J. C.; Fry, B.; Maller, J. und Daly, M. J. (2005): Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps, *Bioinformatics.* 21 [2], Seite 263-265.
131. Hoehe, M. R.; Kopke, K.; Wendel, B.; Rohde, K.; Flachmeier, C.; Kidd, K. K.; Berrettini, W. H. und Church, G. M. (2000): Sequence variability and candidate gene analysis in complex disease: association of mu opioid receptor gene variation with substance dependence, *Hum.Mol.Genet.* 9 [19], Seite 2895-2908.
132. Barley, J.; Carter, N. D.; Cruickshank, J. K.; Jeffery, S.; Smith, A.; Charlett, A. und Webb, D. J. (1991): Renin and atrial natriuretic peptide restriction fragment length polymorphisms: association with ethnicity and blood pressure, *J.Hypertens.* 9 [11], Seite 993-996.
133. Ciechanowicz, A.; Kurzawski, G.; Widecka, K.; Gozdzik, J.; Adler, G. und Czekalski, S. (1997): [Mutation T-->C of nucleotide 2238 in the gene of atrial natriuretic peptide (ANP) precursor and heterogeneity of sodium-sensitive hypertension. Preliminary report], *Pol.Arch.Med.Wewn.* 98 [12], Seite 501-509.
134. Abell, T. J.; Richards, A. M.; Ikram, H.; Espiner, E. A. und Yandle, T. (1989): Atrial natriuretic factor inhibits proliferation of vascular smooth muscle cells stimulated by platelet-derived growth factor, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 160 [3], Seite 1392-1396.
135. Hirata, K.; Akita, H.; Yokoyama, M. und Watanabe, Y. (1992): Impaired vasodilatory response to atrial natriuretic peptide during atherosclerosis progression, *Arterioscler.Thromb.* 12 [1], Seite 99-105.
136. Kugiyama, K.; Sugiyama, S.; Matsumura, T.; Ohta, Y.; Doi, H. und Yasue, H. (1996): Suppression of atherosclerotic changes in cholesterol-fed rabbits treated with an oral inhibitor of neutral endopeptidase 24.11 (EC 3.4.24.11), *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 16 [8], Seite 1080-1087.

137. Roussel, R.; Tregouet, D. A.; Hadjadj, S.; Jeunemaitre, X. und Marre, M. (2004): Investigation of the human ANP gene in type 1 diabetic nephropathy: case-control and follow-up studies, *Diabetes* 53 [5], Seite 1394-1398.
138. Kato, N.; Sugiyama, T.; Morita, H.; Nabika, T.; Kurihara, H.; Yamori, Y. und Yazaki, Y. (2000): Genetic analysis of the atrial natriuretic peptide gene in essential hypertension, *Clin.Sci.(Lond)* 98 [3], Seite 251-258.
139. Rubattu, S.; Bigatti, G.; Evangelista, A.; Lanzani, C.; Stanzione, R.; Zagato, L.; Manunta, P.; Marchitti, S.; Venturelli, V.; Bianchi, G.; Volpe, M. und Stella, P. (2006): Association of atrial natriuretic peptide and type a natriuretic peptide receptor gene polymorphisms with left ventricular mass in human essential hypertension, *J.Am.Coll.Cardiol.* 48 [3], Seite 499-505.
140. Heid, I. M.; Lamina, C.; Bongardt, F.; Fischer, G.; Klopp, N.; Huth, C.; Kuchenhoff, H.; Kronenberg, F.; Wichmann, H. E. und Illig, T. (2005): [How about the uncertainty in the haplotypes in the population-based KORA studies?], *Gesundheitswesen* 67 Suppl 1, Seite S132-S136.
141. de Lemos, J. A.; Morrow, D. A.; Bentley, J. H.; Omland, T.; Sabatine, M. S.; McCabe, C. H.; Hall, C.; Cannon, C. P. und Braunwald, E. (2001): The prognostic value of B-type natriuretic peptide in patients with acute coronary syndromes, *N.Engl.J.Med.* 345 [14], Seite 1014-1021.
142. Omland, T.; Aakvaag, A.; Bonarjee, V. V.; Caidahl, K.; Lie, R. T.; Nilsen, D. W.; Sundsfjord, J. A. und Dickstein, K. (1996): Plasma brain natriuretic peptide as an indicator of left ventricular systolic function and long-term survival after acute myocardial infarction. Comparison with plasma atrial natriuretic peptide and N-terminal proatrial natriuretic peptide, *Circulation* 93 [11], Seite 1963-1969.
143. Tsutamoto, T.; Wada, A.; Maeda, K.; Hisanaga, T.; Maeda, Y.; Fukai, D.; Ohnishi, M.; Sugimoto, Y. und Kinoshita, M. (1997): Attenuation of compensation of endogenous cardiac natriuretic peptide system in chronic heart failure: prognostic role of plasma brain natriuretic peptide concentration in patients with chronic symptomatic left ventricular dysfunction, *Circulation* 96 [2], Seite 509-516.
144. Sabatine, M. S.; Morrow, D. A.; de Lemos, J. A.; Gibson, C. M.; Murphy, S. A.; Rifai, N.; McCabe, C.; Antman, E. M.; Cannon, C. P. und Braunwald, E. (2002): Multimarker approach to risk stratification in non-ST elevation acute coronary syndromes: simultaneous assessment of troponin I, C-reactive protein, and B-type natriuretic peptide, *Circulation* 105 [15], Seite 1760-1763.
145. Nishikimi, T.; Mori, Y.; Ishimura, K.; Tadokoro, K.; Yagi, H.; Yabe, A.; Horinaka, S. und Matsuoka, H. (2004): Association of plasma atrial natriuretic peptide, N-terminal proatrial natriuretic peptide, and brain natriuretic peptide levels with coronary artery stenosis in patients with normal left ventricular systolic function, *Am.J.Med.* 116 [8],

- Seite 517-523.
146. Malatino, L. S.; Leonardi, C.; Stancanelli, B.; Polizzi, G.; Grassi, R.; Tamburino, C. und Tamburino, G. (1992): Transient myocardial ischemia stimulates atrial natriuretic factor release, *Am.Heart J.* 123 [3], Seite 693-698.
 147. Tawarahara, K.; Kurata, C.; Wakabayashi, Y.; Takeuchi, K.; Shouda, S.; Mikami, T. und Matou, F. (1999): Usefulness of measurement of plasma atrial natriuretic peptide levels in exercise testing of patients with coronary heart disease, *Am.J.Cardiol.* 83 [5], Seite 782-785.
 148. Bates, E. R.; Shenker, Y. und Grekin, R. J. (1986): The relationship between plasma levels of immunoreactive atrial natriuretic hormone and hemodynamic function in man, *Circulation* 73 [6], Seite 1155-1161.
 149. Dietz, R.; Lang, R. E.; Purgaj, J.; Merkel, A.; Schomig, A. und Kubler, W. (1986): Relationships between haemodynamic parameters and concentrations of atrial natriuretic peptide in human plasma, *J.Hypertens.Suppl* 4 [6], Seite S512-S515.
 150. Langenickel, T.; Pagel, I.; Hohnel, K.; Dietz, R. und Willenbrock, R. (2000): Differential regulation of cardiac ANP and BNP mRNA in different stages of experimental heart failure, *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 278 [5], Seite H1500-H1506.
 151. Waldman, S. A.; Rapoport, R. M. und Murad, F. (1984): Atrial natriuretic factor selectively activates particulate guanylate cyclase and elevates cyclic GMP in rat tissues, *J.Biol.Chem.* 259 [23], Seite 14332-14334.
 152. Tsutamoto, T.; Kanamori, T.; Morigami, N.; Sugimoto, Y.; Yamaoka, O. und Kinoshita, M. (1993): Possibility of downregulation of atrial natriuretic peptide receptor coupled to guanylate cyclase in peripheral vascular beds of patients with chronic severe heart failure, *Circulation* 87 [1], Seite 70-75.
 153. Levin, E. R.; Frank, H. J.; Chaudhari, A.; Kirschenbaum, M. A.; Bandt, A. und Mills, S. (1989): Decreased atrial natriuretic factor receptors and impaired cGMP generation in glomeruli from the cardiomyopathic hamster, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 159 [2], Seite 807-814.
 154. Perrella, M. A.; Aarhus, L. L.; Heublein, D. M.; Lewicki, J. A. und Burnett, J. C., Jr. (1993): Biologic role of atrial natriuretic factor clearance receptor in congestive heart failure, *Am.J.Physiol* 265 [1 Pt 2], Seite H401-H408.
 155. Wang, T. J.; Larson, M. G.; Levy, D.; Benjamin, E. J.; Corey, D.; Leip, E. P. und Vasan, R. S. (2003): Heritability and genetic linkage of plasma natriuretic peptide levels, *Circulation* 108 [1], Seite 13-16.
 156. Xue, H.; Wang, S.; Wang, H.; Sun, K.; Song, X.; Zhang, W.; Fu, C.; Han, Y. und Hui, R.

- (2007): Atrial natriuretic peptide gene promoter polymorphism is associated with left ventricular hypertrophy in hypertension, *Clin.Sci.(Lond)*.
157. Lusis, A. J. (2000): Atherosclerosis, *Nature* 407 [6801], Seite 233-241.
158. Frazer, K. A.; Ballinger, D. G.; Cox, D. R.; Hinds, D. A.; Stuve, L. L.; Gibbs, R. A.; Belmont, J. W.; Boudreau, A.; Hardenbol, P.; Leal, S. M.; Pasternak, S. et al.(2007): A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs, *Nature* 449 [7164], Seite 851-861.
159. Omland, T.; Sabatine, M. S.; Jablonski, K. A.; Rice, M. M.; Hsia, J.; Wergeland, R.; Landaas, S.; Rouleau, J. L.; Domanski, M. J.; Hall, C.; Pfeffer, M. A. und Braunwald, E. (2007): Prognostic value of B-Type natriuretic peptides in patients with stable coronary artery disease: the PEACE Trial, *J.Am.Coll.Cardiol.* 50 [3], Seite 205-214.
160. Wolber, T.; Maeder, M.; Weilenmann, D.; Duru, F.; Bluzaitte, I.; Riesen, W.; Rickli, H. und Ammann, P. (2006): Integration of B-type natriuretic peptide levels with clinical data and exercise testing for predicting coronary artery disease, *Am.J.Cardiol.* 98 [6], Seite 764-767.
161. Silver, M. A.; Maisel, A.; Yancy, C. W.; McCullough, P. A.; Burnett, J. C., Jr.; Francis, G. S.; Mehra, M. R.; Peacock, W. F.; Fonarow, G.; Gibler, W. B.; Morrow, D. A. und Hollander, J. (2004): BNP Consensus Panel 2004: A clinical approach for the diagnostic, prognostic, screening, treatment monitoring, and therapeutic roles of natriuretic peptides in cardiovascular diseases, *Congest.Heart Fail.* 10 [5 Suppl 3], Seite 1-30.
162. Adnot, S.; Andrivet, P.; Chabrier, P. E.; Piquet, J.; Plas, P.; Braquet, P.; Roudot-Thoraval, F. und Brun-Buisson, C. (1989): Atrial natriuretic factor in chronic obstructive lung disease with pulmonary hypertension. Physiological correlates and response to peptide infusion, *J.Clin.Invest* 83 [3], Seite 986-993.
163. Hayashi, M.; Tsutamoto, T.; Wada, A.; Maeda, K.; Mabuchi, N.; Tsutsui, T.; Horie, H.; Ohnishi, M. und Kinoshita, M. (2001): Intravenous atrial natriuretic peptide prevents left ventricular remodeling in patients with first anterior acute myocardial infarction, *J.Am.Coll.Cardiol.* 37 [7], Seite 1820-1826.
164. Sangawa, K.; Nakanishi, K.; Ishino, K.; Inoue, M.; Kawada, M. und Sano, S. (2004): Atrial natriuretic peptide protects against ischemia-reperfusion injury in the isolated rat heart, *Ann.Thorac.Surg.* 77 [1], Seite 233-237.
165. Kitakaze, M.; Asakura, M.; Kim, J.; Shintani, Y.; Asanuma, H.; Hamasaki, T.; Seguchi, O.; Myoishi, M.; Minamino, T.; Ohara, T.; Nagai, Y.; Nanto, S.; Watanabe, K.; Fukuzawa, S.; Hirayama, A.; Nakamura, N.; Kimura, K.; Fujii, K.; Ishihara, M.; Saito, Y.; Tomoike, H. und Kitamura, S. (2007): Human atrial natriuretic peptide and nicorandil as adjuncts to reperfusion treatment for acute myocardial infarction (J-WIND): two randomised trials, *lancet* 370 [9597], Seite 1483-1493.

166. Sackner-Bernstein, J. D.; Kowalski, M.; Fox, M. und Aaronson, K. (2005): Short-term risk of death after treatment with nesiritide for decompensated heart failure: a pooled analysis of randomized controlled trials, *JAMA* 293 [15], Seite 1900-1905.
167. Kastrati, A.; Dirschinger, J. und Schomig, A. (2000): Genetic risk factors and restenosis after percutaneous coronary interventions, *Herz* 25 [1], Seite 34-46.
168. Gardemann, A.; Mages, P.; Katz, N.; Tillmanns, H. und Haberbosch, W. (1999): The p22 phox A640G gene polymorphism but not the C242T gene variation is associated with coronary heart disease in younger individuals, *Atherosclerosis* 145 [2], Seite 315-323.
169. Gardemann, A.; Stricker, J.; Humme, J.; Nguyen, Q. D.; Katz, N.; Philipp, M.; Tillmanns, H.; Hehrlein, F. W. und Haberbosch, W. (1999): Angiotensinogen T174M and M235T gene polymorphisms are associated with the extent of coronary atherosclerosis, *Atherosclerosis* 145 [2], Seite 309-314.

7 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1:</i> schematische Darstellung der ANP-Synthese.....	8
<i>Abbildung 2:</i> Lage der untersuchten Polymorphismen auf dem ANP-Gen.....	13
<i>Abbildung 3:</i> Sequenzausschnitt für den Polymorphismus G664A.....	23
<i>Abbildung 4:</i> Gelelektrophorese nach dem HpaII-Restriktionsverdau.....	25
<i>Abbildung 5:</i> Gelelektrophorese nach dem ScaI-Restriktionsverdau.....	26
<i>Abbildung 6:</i> Boxplot der Ejektionsfraktion in Fall- und Kontrollgruppe.....	30
<i>Abbildung 7:</i> Verteilung der Genotypen des Polymorphismus G664A.....	31
<i>Abbildung 8:</i> Verteilung der Genotypen des Polymorphismus C708T.....	33
<i>Abbildung 9:</i> Verteilung der Genotypen des Polymorphismus G1837A.....	34
<i>Abbildung 10:</i> Verteilung der Genotypen des Polymorphismus T2238C.....	36
<i>Abbildung 11:</i> Boxplot vom ANP-Spiegel in der Fall- und Kontrollgruppe.....	43
<i>Abbildung 12:</i> Boxplot des cGMP-Spiegel und der cGMP/ANP-Ratio.....	44
<i>Abbildung 13:</i> Boxplot vom ANP-Spiegel und der cGMP/ANP-Ratio bei Herzinsuffizienz.....	45

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der untersuchten Polymorphismen	14
Tabelle 2: Sequenzen der verwendeten Primer für die verschiedenen PCRs	21
Tabelle 3: Darstellung der verwendeten Reagenzien für die verschiedenen PCRs	22
Tabelle 4: Amplifikationsbedingungen der verschiedenen PCRs.....	22
Tabelle 5: Sequenzierreaktion für die Polymorphismen G664A/C708T	23
Tabelle 6: Fragmentlängen des HpaII-Verdau für die möglichen Genotypen.....	24
Tabelle 7: Fragmentlängen des ScaI-Verdau für die möglichen Genotypen.....	25
Tabelle 8: Zusammensetzung der Fall- und Kontrollgruppe	29
Tabelle 9: Genotypen und Allelfrequenzen des Polymorphismus G664A	32
Tabelle 10: A-dominanter Erbgang des Polymorphismus G664A	32
Tabelle 11: Genotypen und Allelfrequenzen des Polymorphismus C708T.....	33
Tabelle 12: T-dominanter Erbgang des Polymorphismus C708T.....	34
Tabelle 13: Genotypen und Allelfrequenzen des Polymorphismus G1837A	35
Tabelle 14: A-dominanter Erbgang des Polymorphismus G1837A	35
Tabelle 15: Genotypen und Allelfrequenzen des Polymorphismus G1837A	36
Tabelle 16: T-dominanter Erbgang des Polymorphismus T2238C.....	37
Tabelle 17: C-dominanter Erbgang des Polymorphismus T2238C	37
Tabelle 18: kodominanter Erbgang des Polymorphismus T2238C	38
Tabelle 19: Die Genotypen der verschiedenen Polymorphismen und deren Ejektionsfraktion	38
Tabelle 20: Die Genotypen der Polymorphismen und arterieller Hypertonus.....	39
Tabelle 21: Die Genotypen der Polymorphismen und deren ANP-Spiegel.....	40
Tabelle 22: Kopplungsgruppenanalyse.....	41
Tabelle 23: Häufigkeiten der Haplotypen in der Fall- und Kontrollgruppe.....	42

Tabelle 24: Häufigkeitsverteilung der Haplotypenpaare42

Tabelle 25: ANP-Spiegel und cGMP/ANP-Ratio bei Patienten mit Herzinsuffizienz44

9 Abkürzungsverzeichnis

ACE	angiotensin converting enzym
AmpliTaq	gentechnisch hergestellte Polymerase von <i>Thermus aquaticus</i>
ANP	atrial natriuretic peptide
AS	Aminosäure
AT II	Angiotensin II
BNP	brain natriuretic peptide
bp	base pair
BSA	Rinderserumalbumin
BstXI	bestimmtes Restriktionsenzym
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CNP	C-type natriuretic peptide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNP	dendroaspis natriuretic peptide
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	Ejektionsfraktion
ExoI	Exonuklease I
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
HDL	high density lipoproteins
HpaII	bestimmtes Restriktionsenzym
KHK	koronare Herzkrankheit

LD	linkage disequilibrium
LDL	low density lipoproteins
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NEP	neutrale Endopeptidase
NPR	natriuretischer Peptidrezeptor mit den Untertypen NPR- A, NPR- B, NPR- C
PCR	Polymerase-chain-reaction
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RIA	Radioimmunoassay
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
SAP	Shrimp-Alkaline-Phosphatase
ScaI	bestimmtes Restriktionsenzym
SD	Standardabweichung
SHR	stroke-resistant spontaneously hypertensive rats
SHRSP	stroke-prone spontaneously hypertensive rats
SNP	single nucleotid polymorphism
SSCP	single strand confirmation polymorphism
Taq	hitzestabile Polymerase von <i>Thermus aquaticus</i>

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. R. Willenbrock und insbesondere bei meinem Betreuer Dr. J. Monti für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie die wissenschaftliche und methodische Betreuung und den anhaltenden Zuspruch und Motivation bei der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit bedanken.

Mein weiterer Dank gilt den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Jeanette Mothes und Frau Rita Günzel für die Unterstützung bei den Radioimmunoassays und Hilfestellungen bei den molekularbiologischen Untersuchungen. Von großem Wert waren auch die hilfreichen Hände und Ideen der Studienschwester Heike Schenk bei organisatorischen Fragen der Patienteneinbestellung. Eine geduldige Hilfestellung bei der statistischen Auswertung erhielt ich von Herrn Dr. K. Rohde.

Mein ganz persönlicher Dank gilt meiner Familie, die mich während der gesamten Arbeit mit unendlicher Geduld, regem Interesse und großer Anteilnahme begleiteten.

Nicht zu vergessen sind die Freunde, die mir mit konstruktiver Kritik und Ideen jederzeit unterstützend zu Seite standen und somit ihren Anteil an dieser Arbeit beitrugen.

11 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

12 Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Pierre Materne, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: **„Untersuchung der Assoziation von ANP-Polymorphismen und KHK“** selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, 01.06.2008

Pierre Materne