

Aus der Klinik für Endokrinologie und Nephrologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Rolle des Endothelin-Konversion-Enzym-Gens in der  
genetischen Prädisposition der essentiellen Hypertonie

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Florian Reichenberger

aus Berlin

Gutachter/in:     1. Prof. Dr. med. E. Brand  
                          2. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. D. N. Müller  
                          3. Prof. Dr. H. Steinhauer

Datum der Promotion: 05.06.2011

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	3
Tabellenverzeichnis.....	3
Abkürzungsverzeichnis .....	4
1 Einleitung .....	5
1.1 Definition und klinische Bedeutung der arteriellen Hypertonie.....	5
1.2 Genetische Faktoren der Hypertonie .....	6
1.3 Endothelinsystem .....	7
1.3.1 Liganden und Rezeptoren .....	7
1.3.2 ECE, das Schlüsselenzym.....	7
1.4 Ziel der Arbeit.....	9
2 Material und Methoden .....	10
2.1 Material .....	10
2.1.1 Studienpopulation .....	10
2.1.2 Chemikalien .....	10
2.2 Methoden .....	11
2.2.1 Mutationsscreening.....	11
2.2.1.1 DNA-Extraktion .....	11
2.2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	11
2.2.1.3 Agarosegelelektrophorese .....	15
2.2.1.4 SSCP-Analyse .....	15
2.2.1.5 Sequenzierung.....	17
2.2.2 Genotypisierung von Normo- und Hypertonikern .....	18
2.2.2.1 Restriktionsenzymverdau.....	18
2.2.2.2 Hybridisierung mit allelspezifischen Oligonukleotiden (ASO) .....	18
2.2.3 Statistik .....	20
2.2.3.1 Haplotyp-Analysen .....	20
2.2.4 Funktionsanalysen.....	21
2.2.4.1 Promotor-Reportergenkonstrukte.....	21
2.2.4.2 Transfektion und Aktivitätsmessung .....	22
2.2.4.3 Proteinextraktion und EMSA .....	23
3 Ergebnisse.....	26
3.1 Charakterisierung der Studienpopulation .....	26
3.2 Identifizierte genetische Varianten und Häufigkeiten .....	27
3.3 Genotyp- und Haplotypverteilung.....	28

---

3.4	Geschlechtsspezifische Effekte auf den Blutdruck.....	29
3.5	Promotoraktivitäten nach Transfektion.....	30
3.6	Sequenzabhängige Bindung von Transkriptionsfaktoren.....	31
3.7	Sequenzabhängige Affinität des Transkriptionsfaktors E2F-2 .....	32
4	Diskussion .....	34
5	Zusammenfassung .....	39
6	Ausblicke der Doktorarbeit.....	41
6.1	Gen-Gen- und Gen-Umwelt-Interaktionen .....	41
6.2	Genomweite Assoziationsstudien (GWAS).....	42
6.2.1	Erfassung der genetischen Variation durch SNP-Chips .....	42
6.2.2	Beispiele für Ergebnisse von GWAS .....	43
7	Literaturverzeichnis.....	45
8	Anhang .....	60

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur des Promotors des ECE-1-Gens .....	8
Abbildung 2: Gelelektrophorese .....	15
Abbildung 3: SSCP-Analyse.....	16
Abbildung 4: Sequenzierung .....	17
Abbildung 5: Genotypisierung mittels allelspezifischer Oligonukleotide (ASO).....	19
Abbildung 6: Promotor-Reportergenkonstrukt.....	22
Abbildung 7: Electrophoretic Mobility Shift Essay (EMSA) und Supershift .....	24
Abbildung 8: ECE-1b-Gen mit identifizierten Varianten .....	27
Abbildung 9: Haplotyp-spezifische ECE-1b-Promotoraktivität .....	31
Abbildung 10: Protein-DNA-Interaktion .....	32
Abbildung 11: Unterschiedliche Bindung von E2F-2 an -338A und -338C.....	33
Abbildung 12: Dosis-Wirkungs-Kurve.....	35
Abbildung 13: Affymetrix GeneChip® Microarray.....	43

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation von Blutdruckwerten, ESC/ESH 2007 .....	6
Tabelle 2: Größen des Promotors, der Exons und der Introns des ECE-1b-Gens .....	9
Tabelle 3: Annealingtemperaturen der flankierenden Primerpaare für die..... identifizierten genetischen Varianten.....	12
Tabelle 4: PCR-Primerpaare (Promotor-Region, kodierende Region) .....	13
Tabelle 5: Oligonukleotid-Sonden der untersuchten genetischen Varianten .....	20
Tabelle 6: Definitionen der Genotypen und Haplotypen.....	21
Tabelle 7: Klinische Parameter der Studienpopulation .....	26
Tabelle 8: Häufigkeiten der identifizierten genetischen Varianten .....	28
Tabelle 9: Genotyp- und Haplotypverteilungen .....	29
Tabelle 10: Effekte beider Promotorvarianten auf den 24h-BD bei Frauen ohne Medikation	30
Tabelle 11: Effekte der Haplotypen auf den 24h-BD bei Frauen ohne Medikation .....	30

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ASO	allelspezifisches Oligonukleotid
ATP	Adenosintriphosphat
BD	Blutdruck
bp	Basenpaare
C	Cytosin
DBD	diastolischer Blutdruck
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DNA/DNS	<i>deoxyribonucleic acid</i> / Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsODN	<i>double-stranded oligodeoxynucleotides</i>
ECE	<i>endothelin-converting enzyme</i> Endothelin-Konversions-Enzym
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
ES	Endothelinsystem
ESC	<i>European Society of Cardiology</i>
ET	Endothelin
ESH	<i>European Society of Hypertension</i>
G	Guanin
JNC	<i>Joint National Committee</i>
kbp	Kilobasenpaare
MW	Mittelwert
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> Polymerase-Kettenreaktion
RLA	<i>relative luciferase activity</i>
SBD	systolischer Blutdruck
SD	Standardabweichung
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SSCP	<i>single-strand conformation polymorphism</i> Einzelstrang-Konformationspolymorphismus
T	Thymin
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
UV	ultraviolett

# 1 Einleitung

## 1.1 Definition und klinische Bedeutung der arteriellen Hypertonie

Neue Studien zeigen, dass in Deutschland 55% aller 35-64-Jährigen an arterieller Hypertonie leiden <sup>1</sup>. Die arterielle Hypertonie stellt einen wichtigen Risikofaktor für die Entstehung der Linksherzinsuffizienz, der koronaren Herzkrankheit, des Apoplexes, der Niereninsuffizienz, der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit und der hypertensiven Retinopathie dar. Als Todesursache steht bei allen Hypertonikern die Linksherzinsuffizienz und die koronare Herzkrankheit an erster Stelle, gefolgt vom Apoplex <sup>2</sup>.

Man unterscheidet zwischen der primären oder essentiellen Hypertonie (>90% aller Hypertonien) und den sekundären Hypertonie-Formen (<10%). Bei der essentiellen Hypertonie sind die Ursachen weitgehend unbekannt, während sie bei den sekundären Hypertonie-Formen bekannt sind und auf renalen, endokrinen und neurogenen Grundleiden beruhen und somit meist kausal behandelbar sind. Eine essentielle Hypertonie darf erst angenommen werden, wenn eine sekundäre Form ausgeschlossen ist <sup>2,3</sup>.

Die essentielle Hypertonie ist ein komplexes Krankheitsbild, welches sowohl von Umweltfaktoren als auch von genetischen Faktoren geprägt wird <sup>2,4</sup>. Als Umweltfaktoren spielen die Ernährung (hoher Kochsalz-Konsum, Übergewicht, starker Alkoholkonsum), endokrine Faktoren (männliches Geschlecht, Schwangerschaft, Klimakterium), Stress, Bewegungsmangel und zunehmendes Alter eine begünstigende Rolle <sup>2,3</sup>.

Blutdruck ist ein quantitativer Phänotyp. Die Festlegung von Grenzwerten ab denen man von einer arteriellen Hypertonie sprechen kann ist willkürlich. Die Werte orientieren sich an klinischen und epidemiologischen Daten, die das Ansteigen kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität mit zunehmender Blutdruckhöhe reflektieren. Die aktuellen Blutdruckwerte zur Klassifizierung der arteriellen Hypertonie entstammen den Leitlinien der ESC/ESH von 2007 (Tabelle 1) <sup>5,6</sup>. Im neuesten JNC VII-Report aus den USA von 2003 wird der Blutdruckbereich 120-139 mmHg systolisch und 80-89 mmHg diastolisch als prähypertensiv definiert, bei dem bereits Lifestyle-Änderungen empfohlen werden <sup>7</sup>. Neuere Daten geben an, dass ca. 30% der US-Amerikaner von der Prähypertonie betroffen sind <sup>8</sup>. Dabei konnte in einer anderen Studie gezeigt werden, dass über 50% der Prähypertoniker innerhalb von 4 Jahren eine Hypertonie entwickeln <sup>9</sup>.

**Tabelle 1:** Klassifikation von Blutdruckwerten, ESC/ESH 2007

Klassifikation	Systolischer Blutdruck	Diastolischer Blutdruck
	(mmHg)	(mmHg)
Optimal	< 120	< 80
Normal	120 - 129	80 - 84
Hochnormal	130 - 139	85 - 89
Bluthochdruck:		
Stadium 1	140 - 159	90 - 99
Stadium 2	160 - 179	100 - 109
Stadium 3	≥ 180	≥ 110
Isolierte systol. Hypertonie	≥ 140	< 90

## 1.2 Genetische Faktoren der Hypertonie

Neben Umweltfaktoren spielen auch genetische Faktoren eine wichtige Rolle, wie in klinisch-epidemiologischen und tierexperimentellen Studien gezeigt wurde<sup>3,10</sup>.

In den letzten Jahren konnten einzelne seltene monogenetische Formen der Hypertonie identifiziert werden: der *Glucocorticoid-remediable aldosteronism* (GRA)<sup>11</sup>, das *apparent mineralocorticoid excess* (AME)-Syndrom<sup>12,13</sup> und das *Liddle*-Syndrom<sup>14,15</sup>. Alle diese drei Syndrome haben gemeinsam, dass sie über eine gesteigerte Salz- und Wasserretention zu einer salzsensitiven Hypertonie führen. Ein weiteres Gen konnte auf Chromosom 12 identifiziert werden, welches mit Brachydaktylie assoziiert ist und zu einer salzresistenten Hypertonie führt<sup>16</sup>.

Die essentielle Hypertonie hingegen ist eine polygene Erkrankung, d.h. sie ist nicht auf ein einzelnes Gen allein zurückzuführen<sup>17,18</sup>. Bisher konnten Polymorphismen in zahlreichen Genen identifiziert werden, die über eine Beeinflussung des über die Niere geregelten Salz-Wasser-Haushaltes zu einer Blutdruckerhöhung oder -senkung führen<sup>2</sup>. Diese Polymorphismen führen zu einer Modifizierung ihrer Genprodukte (z.B. Enzyme, Rezeptoren, Liganden etc.) und darüber zur essentiellen Hypertonie<sup>18,19</sup>.

Solche Gene, welche die Blutdruckregulierung beeinflussen bezeichnet man auch als Kandidatengene. Die Identifizierung solcher Gene als Marker könnte die frühzeitige Erstellung individueller genetischer Risikoprofile für die essentielle Hypertonie ermöglichen. Folgend soll nun der Hintergrund des in dieser Arbeit untersuchten Kandidatengens, dem Endothelin-Konversions-Enzym-Gens (*ECE*), dargestellt werden.



### 1.3 Endothelinsystem

Wie bereits erwähnt, wird das heterogene und komplexe Krankheitsbild der essentiellen Hypertonie sowohl von Umweltfaktoren als auch von genetischen Determinanten geprägt. Das Endothelinsystem hat einen Einfluss auf die Blutdruckregulation<sup>20</sup>, was im Folgenden erläutert wird.

#### 1.3.1 Liganden und Rezeptoren

Das Endothelinsystem (ES) besteht aus seinen drei Liganden, dem Endothelin-1, Endothelin-2, Endothelin-3 (ET-1, ET-2, ET-3)<sup>21,22,23</sup> und den zwei Endothelin-Rezeptoren (ET<sub>A</sub>, ET<sub>B</sub>)<sup>24,25</sup>. Diese beiden Rezeptoren weisen eine unterschiedliche Affinität zu ihren Liganden auf. Während der ET<sub>B</sub>-Rezeptor eine gleich starke Affinität für das ET-1, ET-2 und ET-3 hat<sup>26,27</sup>, ist die Affinität des ET<sub>A</sub>-Rezeptors für die drei Endotheline unterschiedlich, und zwar schwächer werdend vom ET-1 über das ET-2 zum ET-3. Hierbei bindet der Rezeptor das ET-1 ungefähr 100 mal stärker als das ET-3<sup>26,27</sup>.

Endotheline sind vasoaktive Peptide, die aus 21 Aminosäuren bestehen und außer in Endothelzellen in vielen anderen Geweben exprimiert werden<sup>21</sup>. Jedes der Endotheline wird von einem anderen Gen kodiert<sup>23</sup>. Die Synthese der Endotheline beginnt beim Vorläufermolekül Prepro-ET. Durch eine furin-ähnliche Endopeptidase entsteht das Pro-ET (Big-ET). In einem letzten Schritt wird das Pro-ET durch proteolytische Spaltung durch das Endothelin-Konversions-Enzym (ECE) in die vasoaktive Form überführt<sup>28</sup>.

ET-1 ist ein starker Vasokonstriktor<sup>21,29</sup> mit mitogenen Eigenschaften auf vaskuläre glatte Muskelzellen<sup>30,31</sup>, kardiale Myozyten<sup>32</sup> und renale Mesangialzellen<sup>33</sup>. Es hat positiv inotrope und chronotrope Eigenschaften<sup>34,35</sup> und beeinflusst das zentrale und periphere sympathische Nervensystem<sup>20</sup>. Des Weiteren wirkt ET-1 auf den renalen Plasmafluß und konsekutiv die glomeruläre Filtrationsrate sowie direkt auf die Natriumausscheidung und somit auf die Regulation des Salz-Wasser-Haushaltes<sup>20,36,37</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass ET-1 eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung des vaskulären Tonus spielt<sup>38,39,40</sup>. Somit ist ET-1 ein wichtiger Mediator in der Pathogenese der arteriellen Hypertonie und ihrer Komplikationen<sup>20</sup>. Verschiedene Studien belegen seine Bedeutung für die Pathogenese der essentiellen Hypertonie<sup>41,42,43,44,45</sup>.

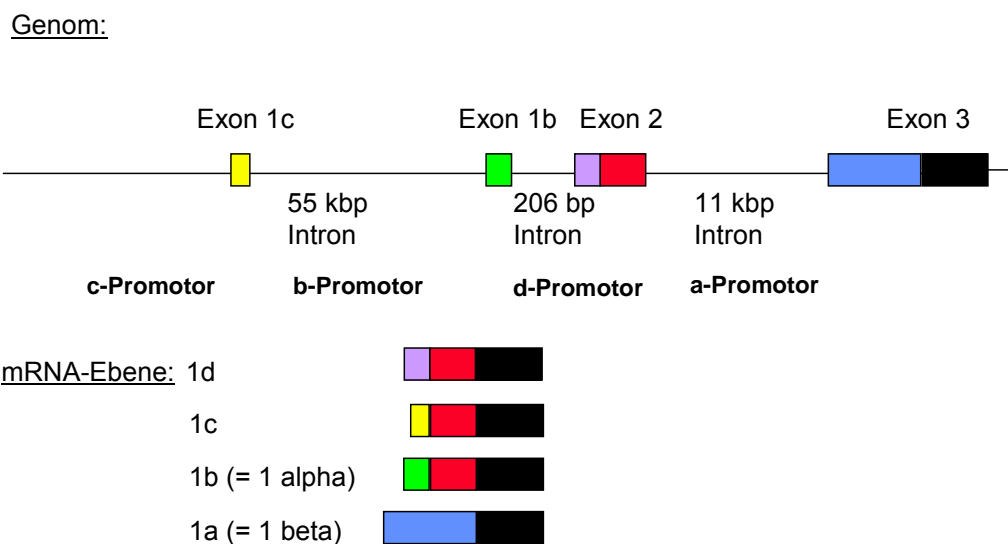
#### 1.3.2 ECE, das Schlüsselenzym

Das ECE ist eine membrangebundene Metalloprotease<sup>46</sup> und stellt das Schlüsselenzym in der Biosynthese der Endotheline dar. Es existieren zwei Isoformen: das ECE-1<sup>47</sup>, welches innerhalb des kardiovaskulären Systems die wichtigste Rolle spielt, es wird dort vorwiegend in den Endothelzellen der Gefäße exprimiert<sup>48</sup>, und das ECE-2<sup>49</sup>, welches hauptsächlich in

neuralem Gewebe exprimiert wird. Eine ebenfalls hohe Expression des ECE-1 findet man in den Testis, dem Ovar, der Nebenniere und in wechselnd starker Ausprägung in den glatten Gefäßmuskelzellen. Geringere Expressionslevel zeigen sich auch in zahlreichen anderen menschlichen Geweben <sup>48</sup>.

ECE-1 spielt eine essentielle Rolle in der Entwicklung von Wirbeltieren, wie Studien an ECE-1-*knock-out*-Mäusen gezeigt haben. Sie zeigten ein angeborenes Fehlen epidermaler Melanozyten und enterischer Neurone des distalen Darmes, sowie kraniofaziale und kardiovaskuläre Abnormitäten <sup>50</sup>. Des Weiteren spielt ECE-1 eine Rolle bei kardiovaskulären Erkrankungen beim Menschen, wie der Atherosklerose <sup>51</sup> und ischämischer Kardiomyopathie <sup>52</sup>.

Vom ECE-1 existieren 4 bekannte Isoformen (ECE-1a, ECE-1b, ECE-1c, ECE-1d), die alle vom selben Gen kodiert werden und sich nur in der 5'-Region unterscheiden <sup>53,54,55,56</sup>. Die verschiedenen Isoformen entstehen durch die Existenz alternativer Promotoren (Abbildung 1) <sup>56,57,58,59</sup>. Das Gen liegt auf Chromosom 1 <sup>60</sup>, erstreckt sich über mehr als 120 kbp und besteht aus 20 Exons <sup>55,56,58</sup>.



**Abbildung 1:** Struktur des Promotors des ECE-1-Gens

Die ECE-1b-Isoform (ursprünglich auch 1 alpha genannt <sup>61</sup>) wird hauptsächlich im Endothel exprimiert und besteht aus 19 Exons (Abbildung 1, Tabelle 2) <sup>55,56,57</sup>. Über eine Änderung des normalen Expressionslevels oder pathophysiologische Hochregulierung durch Bindung von Transkriptionsfaktoren an cis-Elemente (Expressions-steuernde Elemente im Promotor) könnte es zu einer veränderten Endothelinsynthese in den Gefäßen und somit zu einer veränderten Blutdruckregulation kommen.

Somit ist anzunehmen, dass genetische Varianten im Promotor des ECE-1b-Gens, besonders die, die in Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren liegen (so genannte *consensus-sites*), mit verschiedenen Blutdruckphänotypen wie Blutdruckwerten assoziiert sein könnten. Die 24-Stunden-Blutdruckmessung gibt hier bessere Aussagen als die einzelne Blutdruckmessung<sup>62</sup>. Hinweise, dass das ECE-1-Gen polymorph ist, geben bereits Arbeiten von Valdenaire *et al.*<sup>59</sup>.

**Tabelle 2:** Größen des Promotors, der Exons und der Introns des ECE-1b-Gens

	bp		bp
5'Region	1734		
Exon 1b	59	Intron 1	206
Exon 2	87	Intron 2	11000
Exon 3	142	Intron 3	6200
Exon 4	213	Intron 4	>6000
Exon 5	122	Intron 5	1400
Exon 6	147	Intron 6	1200
Exon 7	66	Intron 7	1500
Exon 8	192	Intron 8	>6000
Exon 9	143	Intron 9	2000
Exon 10	115	Intron 10	6900
Exon 11	111	Intron 11	1200
Exon 12	99	Intron 12	800
Exon 13	78	Intron 13	2300
Exon 14	104	Intron 14	>6000
Exon 15	111	Intron 15	700
Exon 16	68	Intron 16	1400
Exon 17	191	Intron 17	3800
Exon 18	96	Intron 18	1500
Exon 19	639		

#### 1.4 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, den Promotor und die gesamte kodierende Region des ECE-1b-Gens auf genetische Varianten zu untersuchen. Anschließend sollen mögliche Assoziationen mit Blutdruckphänotypen in einer kaukasischen Population ( $n=704$ ) (*in vivo*) sowie mittels *in vitro*-Funktionsanalysen eine mögliche Funktionalität der identifizierten genetischen Varianten untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Studienpopulation

Die Rekrutierung von behandelten ( $n=377$ ) und unbehandelten ( $n=327$ ) Hypertonikern ( $n=704$ , 354 Frauen, 350 Männer) kaukasischer Herkunft erfolgte in der poliklinischen Hypertoniesprechstunde des Universitätsklinikums Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin. Der Ruheblutdruck wurde bei jedem Termin von geschultem Personal gemessen. Als Bluthochdruck wurden systolische Blutdruckwerte  $\geq 140$  mmHg und/oder diastolische Blutdruckwerte  $\geq 90$  mmHg bei mindestens zwei verschiedenen Sitzungen gewertet. Zusätzlich wurden bei allen Patienten ambulante 24-Stunden-Blutdruckmessungen (90207, SpaceLabs Medical Inc.) durchgeführt. Patienten mit sogenanntem „Weißkittelbluthochdruck“, d.h. Patienten die zwar erhöhte Blutdruckwerte bei der Einzelmessung in der Klinik, aber Tagesdurchschnittswerte in der 24-Stunden-Blutdruckmessung unter 135/85 mmHg aufwiesen, wurden von der Studie ausgeschlossen. Sekundäre Formen der Hypertonie wurden ausgeschlossen und hypertensive Endorganschäden durch klinische Standardmethoden festgestellt. Das erste Auftreten erhöhter Blutdruckwerte wurde anamnestisch und durch direkten Kontakt mit den Hausärzten ermittelt. Patienten, die noch nie Medikamente erhalten hatten oder mindestens 4 Wochen zuvor ihre antihypertensive Medikation abgesetzt hatten, wurden als unbehandelt eingestuft. Nach Feststellen einer arteriellen Hypertonie wurde den Patienten Blut zur DNA-Extraktion entnommen.

Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin genehmigt. Alle Patienten leisteten ein schriftliches Einverständnis bezüglich geplanter genetischer Untersuchungen.

#### 2.1.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien werden bei der Beschreibung der einzelnen Methoden erwähnt, eine Liste mit den Firmenangaben befindet sich im Anhang.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Mutationsscreening

Für das Mutationsscreening wurde die genomische DNA von 95 nach klinischen Parametern ausgewählten Hypertonikern verwendet. Die Auswahl richtete sich dabei nach der Schwere des Hochdruckes. Das Screening erfolgte durch die *single-strand conformation polymorphism* (SSCP)-Analyse, die genaue Lokalisation der genetischen Variante anschließend durch die Sequenzierung der DNA-Probe. Es wurde ein systematisches Screening einer 5575 bp großen Region des ECE-1b-Gens durchgeführt. Darin enthalten waren Exon 1b bis 19, Intron 2, Teile des Introns 3, die Exon/Intron-Grenzen und 1734 bp der 5'-Region.

#### 2.2.1.1 DNA-Extraktion

Als erster Schritt erfolgte die Herstellung von *Buffy Coats*, einer Leukozyten-angereicherten Fraktion aus Vollblut. Dazu wurden durch Zugabe von 30 ml Erythrozyten-Lysis-Puffer (150 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10mM  $\text{KHCO}_3$ , 1 mM EDTA, pH 7,4) zu 10 ml EDTA-Venenblut die roten Blutkörperchen lysiert. Das Gemisch wurde dafür 20 Minuten auf Eis gestellt und anschließend 5 Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das verbliebene Pellet in 10 ml PBS-Puffer gelöst. Nach einer weiteren 5-minütigen Zentrifugation bei 1800 U/min wurde der Überstand wieder abgesaugt. Dieser Waschvorgang wurde noch ein zweites Mal mit 1 ml PBS-Puffer durchgeführt. Jetzt wurde das Pellet in 1 ml Glycerollösung (50 mM Zitronensäure, 20 mM  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ , 40% Glycerol) resuspendiert. 200  $\mu\text{l}$  dieser Suspension wurden für die weitere Aufbereitung entnommen und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Der Rest wurde zur längeren Lagerung bei  $-70^\circ\text{C}$  eingefroren.

Die DNA-Extraktion und -Aufreinigung aus den 200  $\mu\text{l}$  flüssigen *Buffy Coats* erfolgte mittels Quiagen-Säulen (QIAamp blood kit). Dabei wird die DNA zunächst in einem Puffer gelöst und anschließend durch Zentrifugation an die Silicamembran der Spinsäulen gebunden. Durch mehrere Waschungen werden Verunreinigungen entfernt. Zum Abschluss wird die gereinigte DNA mit 200  $\mu\text{l}$  mitgeliefertem Puffer eluiert. Durch Messung der Absorption in einem Spektrometer (Perkin Elmer UV/VIS, Lambda 2, Connecticut, USA) wurden die DNA-Konzentrationen der einzelnen Proben bestimmt.

#### 2.2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um für folgende Untersuchungen eine genügend hohe DNA-Konzentration zu haben, bedient man sich der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die PCR ist eine *in vitro*-Technik, mit der man gezielt DNA-Abschnitte vervielfältigen kann<sup>63</sup>. Für den Reaktionsstart werden Oli-

gonukleotidprimer benötigt, die den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt flankieren. Diese Primer sind komplementär zu den Enden der DNA-Matrize. Durch Hitzedenaturierung bei 94°C wird die DNA in Einzelstränge aufgetrennt, an die sich nach Abkühlen auf eine spezifische errechnete Temperatur die Primer anlagern (Annealing) (Tabelle 3). Eine thermostabile DNA-Polymerase verlängert in Gegenwart von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) bei einem Temperaturoptimum von 72°C den neuen DNA-Strang (Extension). Die im Anschluss dieser Synthese vorliegenden Doppelstränge müssen nun erneut denaturiert werden. Damit beginnt ein neuer Zyklus, der immer aus den drei Teilschritten Denaturierung, Annealing und Extension besteht. Da die neusynthetisierten Stränge in den bis zu 40 mal wiederholt werdenden Vermehrungsrunden ebenfalls als Matrize dienen, findet eine exponentielle Vervielfachung des ausgewählten Fragmentes statt.

Mit Hilfe des Oligonukleotid-Analyse-Programms OLIGO® (Version 5.0, National Biosciences Inc., Plymouth, GB) wurden anhand der bekannten DNA-Sequenz des ECE-1b-Gens<sup>59</sup> 29 überlappende Primerpaare (Eurogentec, Köln, Deutschland) entwickelt (Tabelle 4). Um optimale Reaktionsbedingungen für jedes Primerpaar zu erhalten, wurden die Reaktionsansätze bei unterschiedlichen Temperaturen getestet. Alle PCR-Amplifikationen wurden mit 100 ng DNA in einem Reaktionsvolumen von 20 µl durchgeführt. Die Konzentrationen der Reaktionslösungen richteten sich nach den Angaben des Herstellers der DNA-Polymerase (Thermoprime Plus DNA Polymerase). Der Ansatz bestand aus jeweils 10 pmol des Upper- und Lowerprimers, 2 nmol dNTPs, 0,3 U Polymerase, dem mitgelieferten Reaktions-Puffer sowie der mitgelieferten MgCl<sub>2</sub>-Lösung. Die Amplifikationen wurden mittels MJ Research PTC-100 Peltier Thermal Cycler durchgeführt und begannen mit einer 5-minütigen Denaturierung. Anschließend wurde folgender Reaktionszyklus 35 mal durchlaufen: 1 min bei 94°C, 1 min bei spezifischer „Annealingtemperatur“ des Primerpaars (Tabelle 3), 1 min bei 72°C. Die Reaktion endete mit einer 10-minütigen Extension bei 72°C.

**Tabelle 3:** Annealingtemperaturen der flankierenden Primerpaare für die identifizierten genetischen Varianten

Genetische Variante	T-839G	C-338A	C+223T (L75F)	C+2030T (A677V)	C+295T
Annealingtemperatur	62 °C	60 °C	60 °C	62 °C	61 °C

**Tabelle 4:** PCR-Primerpaare (Promotor-Region, kodierende Region)

Primer		Amplifikat- Größe	Lokalisation/ (Position im Promotor)	Tm (°C)
Pro1U	GATCTTGTTGTGTCGTCCAC	280 bp	(von -1734 bis -1455)	60
Pro1L	CACCTGTAATCCCAGCACTT			60
Pro2U	CCCAGGCTGGCCTAGAATTA	218 bp	(von -1525 bis -1308)	62
Pro2L	GAGGCTGAGGCAGAAGAATC			62
Pro3U	GCACAATCTCAGCTCACTGC	222 bp	(von -1371 bis -1150)	62
Pro3L	GCCTGTAATCCCAACACTTT			58
Pro4U	CTGACCTCAAGTGATCTACC	276 bp	(von -1203 bis -928)	60
Pro4L	AAAGTGCATTTCTGCTCATT			54
Pro5U	CTCGACCCATTGCCCTCACT	272 bp	(von -1045 bis -774)	64
Pro5L	GCTCTCTCGGATATGAGGTGTTT			70
Pro6U	GGGGTTCTTGGTTGGGACAG	246 bp	(von -593 bis -838)	64
Pro6L	CCCCCGTGCTCAAAGGTCTC			66
Pro7U	TCCCCTTGGTGGCTTCTGAC	252 bp	(von -672 bis -421)	60
Pro7L	AAAAGGTGGGGTAAAAGGTAG			64
Pro8U	ATTCAGGAACTCTGGCTTAAAGG	212 bp	(von -501 bis -390)	66
Pro8L	CGGGTCCCCAGTGGCAGATA			66
Pro9U	GGGGGAACCTGTCTTGATTGCTC	196 bp	(von -368 bis -173)	72
Pro9L	CCCCTCCCTTGCCCGGAGTC			70
1U	CCTGCTAGGGGCTTCAGTTT	577 bp	(ab -229), Exon 1+2, Intron 1	62
1L	GCCTACCTGCAGGCCGTT			60
2U	CCTGCAAGTCCAAACATCCT	294 bp	Teil Intron 2	60
2L	GCTTCCCTTGGAGGAAGG			58
3U	ACCAGACCACCCTGAGAC	298 bp	Teil Intron 2, Exon 3	62
3L	ATGCAACACGAAGGCACC			56
4U	GGCCGCTCTAGAACTAGTGG	251 bp	Exon 4	64
4L	CTCCATGCTGGATGCTTACC			62
5U	TGCAAACCTCCACTGTCTGTTG	160 bp	Exon 5	51
5L	GAGGCACTCACCTCTCAAT			62
6U	CTCTCCCTCCCCACAGCTC	184 bp	Exon 6	64
6L	TGCAGGTTCAAGCTAGCTCAC			52

Nukleotidangabe der Primer in 5'3'-Richtung; Positionsangabe innerhalb des Promotors ab Startcodon rückwärts gezählt; bp, Basenpaare; Tm, Schmelztemperatur

**Tabelle 4 (Fortsetzung):** PCR-Primerpaare (kodierende Region)

Primer		Amplifikat- Größe	Lokalisation	T <sub>m</sub> (°C)
7U	TTCATGCCTGCTTCTCTTG	109 bp	Exon 7	60
7L	AGGGGAGAGGCACGCTTAC			62
8U	GTTTGGGGTATGGGCCCTG	224 bp	Exon 8	62
8L	CGACCGGTCAGCTCAAGTTA			62
9U	CTGTCCTTTTCCCTTGCAGA	178 bp	Exon 9	60
9L	ACTGGGGGTCCTCTTACCAT			62
10U	CTCCTCTCCCTGCAGCCT	146 bp	Exon 10	60
10L	GCAGTAGCAGGCTCACCTTC			64
11U	CCCCCTGACTTGTGTTTTCC	151 bp	Exon 11	62
11L	CACGGGGAAGGCACTTACTA			62
12U	GATGTGTATCTCCTCAGGCCA	130 bp	Exon 12	51
12L	CTGGCCAGCCTGACCTTT			58
13U	TCCTCTGTCTGTCTGTCCA	114 bp	Exon 13	62
13L	CAGCAGCTACTCACGTCATT			60
14U	TGCAGTTCAGACCTCTACT	107 bp	Exon 14	60
14L	GGGGAACTGATCTCTGTTG			62
15U	CATGTGTGTTGCTTGCAGGT	143 bp	Exon 15	60
15L	CAGAGGCAGCCTACTTGGGT			64
16U	GTCTTTACCCTCCAGGGCCTTA	108 bp	Exon 16	55
16L	CATCGTGCCAGCTGGAAT			60
17U	ATGACAAGGACGGGAACCTC	194 bp	Exon 17	56
17L	GCGGGCTCTCACCCGATAGG			60
18U	TTTGGTTTTCTCTCCTCCCA	143 bp	Exon 18	58
18L	TGGCATGTTTTTCCTAATGGA			52
19U	CTCCCTGTTGCCCTTCAA	350 bp	Exon 19	58
19L	AACACCATGGGCTCGGTT			56
20U	CTCACACTGGCGGGTTTT	335 bp	Exon 20	56
20L	AACATAATAAATATACCAATTCTTTCC			49

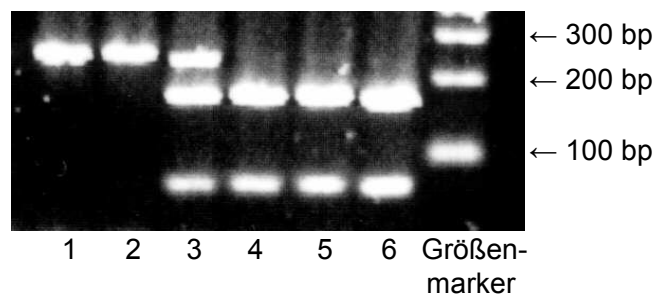
Nukleotidangabe der Primer in 5'3'-Richtung; bp, Basenpaare; T<sub>m</sub>, Schmelztemperatur



### 2.2.1.3 Agarosegelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient dem Nachweis und dem Auftrennen von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe. Die negativ geladene DNA wandert im angelegten elektrischen Feld zum positiven Pol. Dabei ist die Diskriminierung hinsichtlich der Fragmentgröße von der Agarosekonzentration abhängig. Diese wird nach unten durch die mechanische Stabilität und nach oben durch den elektrischen Widerstand des Gels begrenzt.

Je nach gewünschter Gelkonzentration (1-3%) wurde die entsprechende Menge Agarose (Seakem ME Agarose) in 1 x TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA), welcher auch als Laufpuffer diente, durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Für das Herstellen von 5 x TBE-Puffer wurden 54,5 g Tris-Base, 27,8 g Borsäure und 1,86 g EDTA *ad* 1 l H<sub>2</sub>O mittels eines Magnetrührers gelöst. Um 1 x TBE-Puffer zu erhalten wurde der 5 x Puffer dementsprechend verdünnt (Puffer:H<sub>2</sub>O, 1:4). 3-5 µl PCR-Produkt wurde mit entsprechender Menge 2 x Ladepuffer (10 x Puffer: 50% Glycerol in H<sub>2</sub>O, 0,1% Bromphenolblau) vermischt und auf das Gel aufgetragen. Zum Sichtbarmachen der Banden diente Ethidiumbromid, welches mit der DNA interkaliert und unter einem UV-Transilluminator fluoresziert. Als Größenvergleich wurde eine 100-bp-Leiter (0,1 µg/1 µl) (Rapidozym, Luckenwalde, Deutschland) mit aufgetragen. Zur Dokumentation wurden mit einer Gel-Dokumentationsanlage (Biometra, Göttingen, Deutschland) Fotos angefertigt.



**Abbildung 2:** Gelelektrophorese

PCR-Proben nach Restriktionsenzymverdau (1-6) mit unterschiedlichen Fragmentlängen (251 bp, 176 bp, 75 bp); homozygoter Wildtyp (1,2), heterozygot Mutierter (3), homozygot Mutierter (4-6)

### 2.2.1.4 SSCP-Analyse

Die SSCP ist eine gelelektrophoretische Methode, um einen Hinweis auf das Vorliegen genetischer Varianten zu erhalten<sup>64</sup>. Sie beruht auf dem Prinzip, dass sich DNA-Einzelstränge abhängig von der Basensequenz räumlich anordnen (Konformation). Bei abweichenden Basensequenzen führt diese unterschiedliche Molekülstruktur zu anderen Laufeigenschaften im Gel und wird durch eine differierende Migration der Banden auf dem Gel sichtbar.

Die PCR-Amplifikate hatten eine Länge zwischen 107 und 577 bp. Es wurden 1 mm dicke und 11 x 12 cm große 10%ige nichtdenaturierende Polyacrylamid-Gele verwendet (Acrylamid:Bisacrylamid, 49:1). Für das Ansetzen von 500 ml Gel-Stocklösung wurde 122,5 ml 40%iges Acrylamid (Acryl-40-Solution), 50 ml 2%iges Bisacrylamid (Bis-2-Solution), 50 ml 5 x TBE, 277 ml *aqua bidest.* und 500 µl TEMED (Tetramethylethylendiamin) benötigt. Zum Gießen von 4 Gelen wurde 60 ml Gel-Stocklösung mit 1200 µl 10%iger Ammoniumpersulfat-Lösung, welches als Katalysator für die Polymerisierung dient, versetzt. Nach dem zügigen Gießen und dem Einsetzen von 24-zähligen Kämmen polymerisierte das Gel 30 min bei Raumtemperatur. Vor dem Auftragen des DNA-Fragmentes wurden 10 µl PCR-Produkt mit 10 µl 2 x Ladepuffer gemischt und für 5 min bei 96°C denaturiert. Der Ladepuffer wurde als 30 x Stocklösung angesetzt und vor Gebrauch durch Verdünnen mit Formamid (1:15) auf die gewünschte Konzentration gebracht. Für die Stocklösung wurden 100 mg Bromphenolblau und 100 mg Xylencyanol in 10 ml Formamid gelöst und mit 200 µl 0,5 M EDTA versetzt. Die Gelkammern (Biometra, Göttingen, Deutschland) wurden mit 0,5 x TBE-Laufpuffer gefüllt und die Geltaschen mit 7 µl PCR-Produkt-Puffer-Gemisch beladen. Mit jedem DNA-Fragment wurde je eine Elektrophorese bei Raumtemperatur/60 V Spannung und bei 4°C/70 V Spannung durchgeführt und zwischen 14 und 24 Stunden laufen gelassen. Nach Entfernen der Glasplatten wurden die Gele mit Silber gefärbt.

Bei der Silberfärbung werden die Gele zunächst in 10%igem Ethanol für mindestens 5 min fixiert. Nach einer zweiminütigen Ansäuerung mit 1%iger Salpetersäure erfolgt die Färbung mit 0,2%iger Silbernitratlösung (200 ml für 4 Gele) für 20-30 min. Anschließend werden durch eine dreimalige Waschung mit *aqua dest.* Silberreste gewaschen, um die Gele dann mit 3%iger Natriumcarbonat-Lösung, das mit Formaldehyd versetzt wird (600 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lsg. + 300 µl Formaldehyd), zu entwickeln. Dazu wird zweimal je 200 ml der Lösung auf die Gele gegossen und zügig wieder abgegossen. Bei einem dritten Mal erfolgt innerhalb von ungefähr 5 min die vollständige Entwicklung der Gele. In einem letzten Schritt werden die Gele in 10%iger Essigsäure für 10 min fixiert und zur Lagerung in Folie verpackt.



**Abbildung 3:** SSCP-Analyse

Von den 10 dargestellten PCR-Proben zeigt Probe 7 eine Migrationsvariante

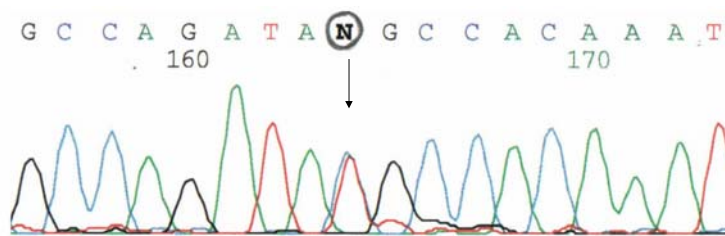
### 2.2.1.5 Sequenzierung

Zur genauen Lokalisation der Mutation wurde das DNA-Fragment, welches ein Migrationsunterschied aufwies, sequenziert. Dafür wurde das zu sequenzierende Fragment erneut amplifiziert und aufgereinigt (QUIAquick PCR Purification Kit, Quiagen, Deutschland). Bei einem untersuchten Fragment war aufgrund von unspezifischen Schmierbanden die Isolierung der gesuchten Bande aus dem Agarosegel notwendig (QUIAquick Gel Extraction Kit, Quiagen, Deutschland).

Die Sequenzierung der Amplikons erfolgte durch die Didesoxy- beziehungsweise Sangermethode<sup>65</sup>. Dabei verlängert eine DNA-Polymerase die Primer entlang der einsträngigen Matrize mit den vier dNTP-Molekülen. Der Einbau von Didesoxynukleosidtriphosphat (ddNTP), einem dNTP-Analogon, führt zu einem zufälligen Abbruch der Sequenzreaktion. Die ddNTPs sind für die vier Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, somit weist jede Kette eine Farbstoffmarkierung an ihrem Ende auf. Die unterschiedlich langen DNA-Ketten werden auf einem hochauflösenden denaturierenden Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Der das Gel abtastende Laser im Sequenzierer (ABI Prism 377, Perkin Elmer, USA) kann die Farbstoffmarkierungen erfassen und somit die Basenabfolge feststellen.

Für die Sequenzreaktion wurde die sogenannte zyklische Sequenzierung angewendet. Dabei wird lediglich ein Oligonukleotidprimer benutzt. Dies führt zu einer linearen Amplifikation. Mit dieser Methode erhält man über längere Bereiche gut lesbare zuverlässige Sequenzen. Außerdem kann man das Substrat so stark verdünnen, dass die Konzentration an Inhibitoren in der Sequenzierungsreaktion nur noch gering ist.

Die Sequenzreaktion wurde mit ABI PRISM BigDye Terminatoren (Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt. Im Thermocycler wurden 25 Zyklen durchlaufen (15 Sekunden 96°C, 15 Sekunden 45°C, 4 Minuten 60°C), nachdem 2 Minuten bei 95°C denaturiert wurde.



**Abbildung 4:** Sequenzierung

Lokalisation einer genetischen Variante (heterozygoter Status, TC an Position 164)

## 2.2.2 Genotypisierung von Normo- und Hypertonikern

Nach Identifizierung einer genetischen Variante wurde diese auf die Häufigkeit des Auftretens in der Studienpopulation untersucht. Dazu dienten zwei Methoden, der Restriktionsenzymverdau (Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus) und die Hybridisierung mit allelspezifischen Oligonukleotiden.

### 2.2.2.1 Restriktionsenzymverdau

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die spezifische DNA-Sequenzen aus 4-8 Nukleotiden erkennen und an diesen Stellen schneiden. Somit entstehen abhängig von der Sequenz unterschiedlich lange Fragmente, die elektrophoretisch auf einem Agarosegel aufgetrennt werden (Abbildung 2).

Die Überprüfung, ob ein Restriktionsenzym an der gewünschten Stelle einen Ansatzpunkt hat und die Auswahl des entsprechenden Enzyms erfolgte mit dem Computerprogramm OLIGO (Version 5.0, National Biosciences Inc., Plymouth, GB). Zunächst wurden die zu genotypisierenden DNA-Proben mittels PCR in einem 20 µl-Ansatz amplifiziert. Anschließend wurden 10 µl dieses Produktes mit einem spezifischen Restriktionsenzym inkubiert und auf ein Agarosegel aufgetragen. Die Enzym- und Pufferkonzentrationen sowie die Inkubationstemperatur und -dauer richteten sich dabei nach den Herstellerangaben (New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland).

Für den ECE-1b T-839G Polymorphismus wurde das Enzym *Ava*I benutzt. Der komplette Verdau des PCR-Produktes (272 bp für den -839TT Genotypen) erzeugte Banden von 203 bp (-839TG Genotyp) und 69 bp (-839GG Genotyp) Länge.

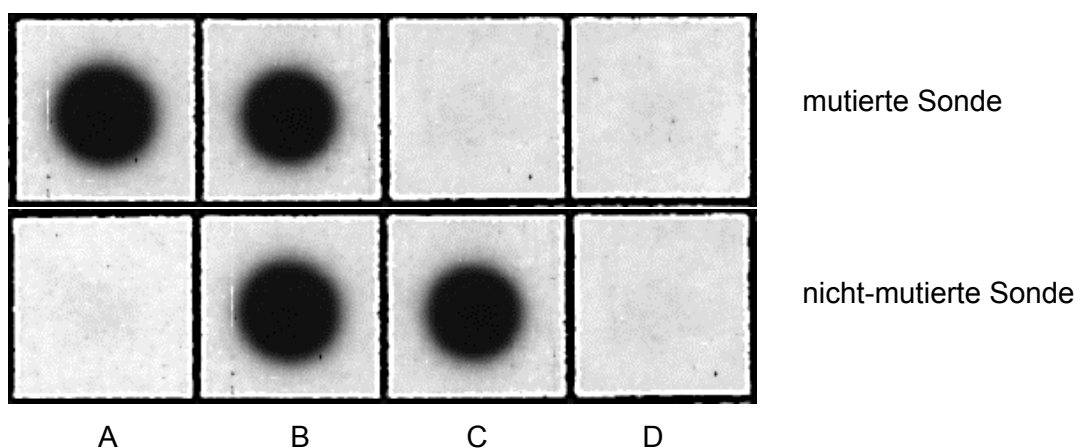
### 2.2.2.2 Hybridisierung mit allelspezifischen Oligonukleotiden (ASO)

Eine andere Methode für die Genotypisierung von Kollektiven ist die Hybridisierung mit allelspezifischen Oligonukleotiden (ASO) von mittels Dot-Blot-Methode auf einer Nylonmembran fixierten PCR-Produkten<sup>66</sup>. Das Prinzip basiert darauf, dass ein Oligonukleotid, welches komplementär zu einem der Allele ist, unter bestimmten Bedingungen nur an dieses eine Allel hybridisiert. Die gleiche Spezifität gilt für die andere Allelvariante.

Beim Dot-Blot wurden jeweils 20 µl Amplifikat mit 130 µl Denaturationslösung vermischt und die Proben über ein im Dot-Blot-Gerät hergestelltes Vakuum auf Nylonmembranen (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK) gesogen, die zuvor für mindestens 1 min in Denaturationslösung gelegt wurden. Dabei passten auf jede der 7,5 x 12 cm großen Membranen 96 Proben. Die Denaturationslösung setzte sich aus 100 ml 30%iger Natronlauge, 600 ml 5 molarer Natriumchloridlösung und 1300 ml *aqua dest.* zusammen. Zur Neutrali-

sierung wurden die Membranen nach dem Dotten 5 min in 2 x SSC gelegt. Nachdem sie über Nacht getrocknet waren, wurde die DNA mit Hilfe eines UV-Crosslinkers (UV-Stratalinker 2400, Stratagene, La Jolla, California, USA) kovalent an die Membranen gebunden.

Vor der Hybridisierung erfolgt die radioaktive Markierung der 17 bp großen Oligonukleotide. Durch eine T4-Polynukleotidkinase wird [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP an das 5'-Ende der DNA gebunden. Dafür wurden 1  $\mu$ l Oligonukleotid-Sonde (Tabelle 5) (25  $\mu$ M) (Eurogentec, Köln, Deutschland), 5  $\mu$ l 10 x Kinasepuffer, 3  $\mu$ l T4-Polynukleotidkinase, 5  $\mu$ l [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP und 36  $\mu$ l *aqua dest.* zusammenpipettiert und 45 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Es folgte eine 10-minütige Inaktivierung der Kinase bei 65°C. Die radioaktiven Sonden wurden mit 300 ml Hybridisierungslösung aus 500 ml 20%igem Natriumdodecylsulfat (SDS), 250 ml Polyethylenglykol (280 g/l) (PEG) und 250 ml *aqua dest.* vermischt und die Membranen darin eingelegt. Bei der errechneten Temperatur ( $T_m$ -5°C) erfolgte die Hybridisierung für 2-6 Stunden im Schüttelwasserbad. Es folgte ein Waschvorgang, bei dem die Membranen zweimal für 5 min bei Raumtemperatur in 1 x SSC und anschließend für 3 min in 0,5 x SSC bei  $T_m$ -5°C unter Schütteln im Wasserbad gewaschen wurden. Nach dem Verpacken in Folie, um eine Austrocknung zu verhindern, wurden die Membranen in eine Röntgenkassette mit einem Film (Kodak BioMax MR Film, Eastman Kodak Company, Rochester, New York, USA) gelegt und je nach Signalstärke 1-24 Stunden bei -80°C exponiert. Vor der Hybridisierung mit der zweiten Sonde und zur Lagerung wurden die Membranen dehybridisiert. Dies erfolgte in 1 l H<sub>2</sub>O, dem 5 ml 20%iges SDS und 5 ml 20%iges SSC zugefügt wurden. In dieser Dehybridisierungslösung wurden die Membranen 1 Stunde bei 85°C leicht geschüttelt. Es folgte eine Kontrollexposition mit einem Film, bevor mit der zweiten Sonde hybridisiert wurde.



**Abbildung 5:** Genotypisierung mittels allelspezifischer Oligonukleotide (ASO)

A, homozygot mutierter Träger; B, heterozygot mutierter Träger; C, homozygot nicht-mutierter Träger (Wildtyp); D, Wasserkontrolle.

**Tabelle 5:** Oligonukleotid-Sonden der untersuchten genetischen Varianten

Position	Sonde 1 (Tm)	Sonde 2 (Tm)
C-338A	CTGGGCCA <u>C</u> ATCGAGGG (58°C)	CTGGGCCA <u>A</u> ATCGAGGG (56°C)
C+223T (L75F)	TGGTGGTA <u>C</u> TTCTGGCG (54°C)	TGGTGGTA <u>I</u> TTCTGGCG (52°C)
C+2030T (A677V)	TCTCAAGG <u>C</u> GGCCTATC (54°C)	TCTCAAGG <u>I</u> GGCCTATC (52°C)
C+295T	GCCAGATA <u>C</u> GCCACAAA (52°C)	GCCAGATA <u>I</u> GCCACAAA (50°C)

Sequenzabfolge in 5´3´-Richtung

### 2.2.3 Statistik

Die statistischen Analysen wurden mit dem Computerprogramm SPSS durchgeführt (Version 10.0, SPSS Inc., Chicago, USA).

Alle Daten wurden als Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD) angegeben. Das Kopp-  
lungs-Ungleichgewicht zwischen zwei genetischen Varianten wurde mit Hilfe des LINKDOS-  
Programmes berechnet<sup>67</sup>. Das Hardy-Weinberg-Äquilibrium wurde mittels „likelihood-ratio-  
based G-Test“<sup>68</sup> oder für die seltenen genetischen Varianten mittels  $\chi^2$ -Test untersucht. Der  
nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test wurde zur Ermittlung von Unterschieden der Blut-  
druckmittelwerte zwischen einzelnen Genvarianten, Genotyp- oder Haplotypgruppen ange-  
wendet. Der Mann-Whitney U-Test wurde zum Vergleich zweier verschiedener Gruppen ge-  
nutzt. Kategorische Daten wurden mit Kontingenztafeln mittels  $\chi^2$ -Test getestet. Bei einem  
 $P < 0.05$  wurden die Ergebnisse als statistisch signifikant angesehen.

#### 2.2.3.1 Haplotyp-Analysen

Zunächst wurden die Haplotypen aus den fünf neu identifizierten Varianten gebildet. Für die  
weiter durchgeführten Haplotyp-Analysen wurden aber nur die Varianten mit einer Häufigkeit  
über 1% in unserer Population verwendet. Folgend ergaben sich die weiter untersuchten  
Haplotypen nur aus zwei der fünf Varianten, in der Reihenfolge T-839G / C-338A. Für die  
Definition des Genotyp gilt: „1“ kodiert für den homozygoten Zustand des häufigen Allels (Re-  
ferenzsequenz), „2“ kodiert für den heterozygoten Zustand und „3“ für den homozygot mu-  
tierten Zustand (seltenes Allel). Für die Definition des Haplotyp gilt: „1“ kodiert für die Refe-  
renzsequenz und „2“ für die mutierte Sequenz. Ein Genotyp ist dabei immer einem Haploty-

penpaar zugeordnet (Tabelle 6). Diese Zuordnung ist eindeutig, nur für einen der neun Genotypen („22“) ist theoretisch ein zweites Haplotypenpaar möglich (11/22 bzw. 12/21), wobei definitionsgemäß nur das Paar 11/22 existiert<sup>69</sup>.

**Tabelle 6:** Definitionen der Genotypen und Haplotypen

<b>Polymorphismus (T-839G / C-338A)</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Haplotyp</b>
TT / CC	11	11 x 11
TT / CA	12	11 x 12
TT / AA	13	12 x 12
TG / CC	21	11 x 21
TG / CA	22	11 x 22
TG / AA	23	12 x 22
GG / CC	31	21 x 21
GG / CA	32	21 x 22
GG / AA	33	22 x 22

## 2.2.4 Funktionsanalysen

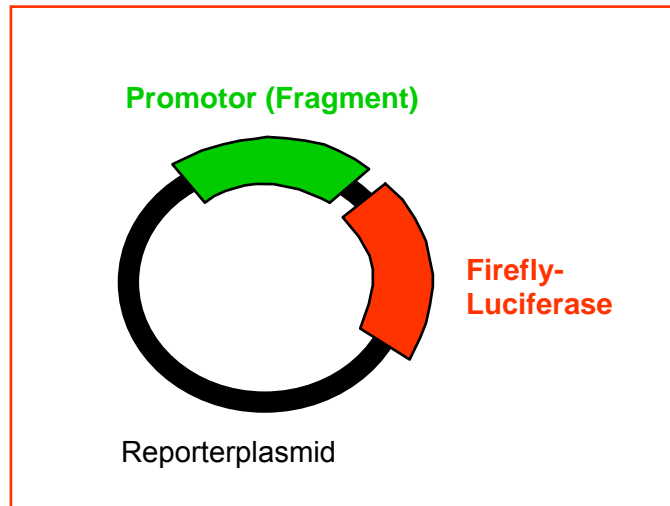
Um die mögliche Funktionalität der identifizierten Polymorphismen zu testen sind bestimmte *in vitro*-Versuche nötig. Es wurden die beiden im Promotor liegenden Polymorphismen auf ihre funktionelle Bedeutung im Sinne von eventuell geänderten Genexpressionen hin weiter untersucht.

### 2.2.4.1 Promotor-Reportergenkonstrukte

Um die Aktivitäten des Promotors (mutiert und nicht mutiert) zu messen stellt man sogenannte Reportergenkonstrukte her, d.h. man setzt den zu untersuchenden Promotor vor ein nachgeschaltetes Gen, dessen Aktivität, je nach Aktivität des vorgeschalteten Promotors variiert und gemessen wird. Als Reportergen wurde die Firefly-Luciferase benutzt (Abbildung 6).

Auf der bekannten Sequenz des ECE-1b-Promotors [GI 4972242, GI 20537487] basierend wurden genomische PCRs durchgeführt (Primer 1 (*sense*): 5'-TGCCACCAGGCCAGCTG-3', Primer 2 (*antisense*): 5'-GCTGTGCCCCAGACGCCT-3'). Als DNA-Vorlage diente jeweils eine der vier verschiedenen Allelkombinationen aus den beiden identifizierten Promotorvarianten: (1) C(-338), T(-839) (Wildtyp); (2) A(-338), T(-839); (3) C(-338), G(-839); (4) A(-338),

G(-839). Die entstandenen PCR-Produkte lagen komplett in der regulierenden 5'-Region des Gens (bis direkt vor das Startcodon reichend) und hatten eine Länge von 1282 bp. Es folgte die Subklonierung anhand des Firmenprotokolls in den Luciferase Reporter Vector pGL3basic (Promega, Madison, USA) mit anschließender Überprüfung der Sequenz des eingesetzten DNA-Fragmentes durch Sequenzierung.



**Abbildung 6:** Promotor-Reportergenkonstrukt

#### 2.2.4.2 Transfektion und Aktivitätsmessung

Nach Herstellung der Reportergenkonstrukte erfolgt die Übertragung, die sogenannte Transfektion, in die gewünschte Zielzelle. Die von uns benutzte humane Endothelzelllinie EA.hy926 (ein großzügiges Geschenk von Dr. C.-J. Edgell <sup>70</sup>) wurde in Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium kultiviert. Zugesezt wurden 10% FCS, 1 mM Sodumpyrovat, nicht-essentielle Aminosäuren (1 x), HAT-Zusatz (1 x), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (jeweils von Biochrom, Berlin, Deutschland).

Die verschiedenen Konstrukte und als Vergleich der Basisvektor (ohne eingefügtes Konstrukt) wurden in die EA.hy926-Zellen unter Zugabe von je 1.5 µl Fugene-6-Transfektionsreagenz und 0,25 µg Firefly-Reporterplasmid in 12-Lochplatten transfiziert. Zur Standardisierung wurde ebenfalls 0,17 µg pRL-null Vector, welcher Renilla-Luciferase kodiert, kotransfiziert. Unter Zugabe von Passive Lysis Buffer wurden die Zellen 48 Stunden nach Transfektion geerntet. Mit Hilfe des Dual-Luciferase Reporter Assay Systems (Promega Corporation, Madison, USA) wurden nun die Aktivitäten der Firefly-Luciferase und der Renilla-Luciferase gemessen (Lumat LB 9501, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland).



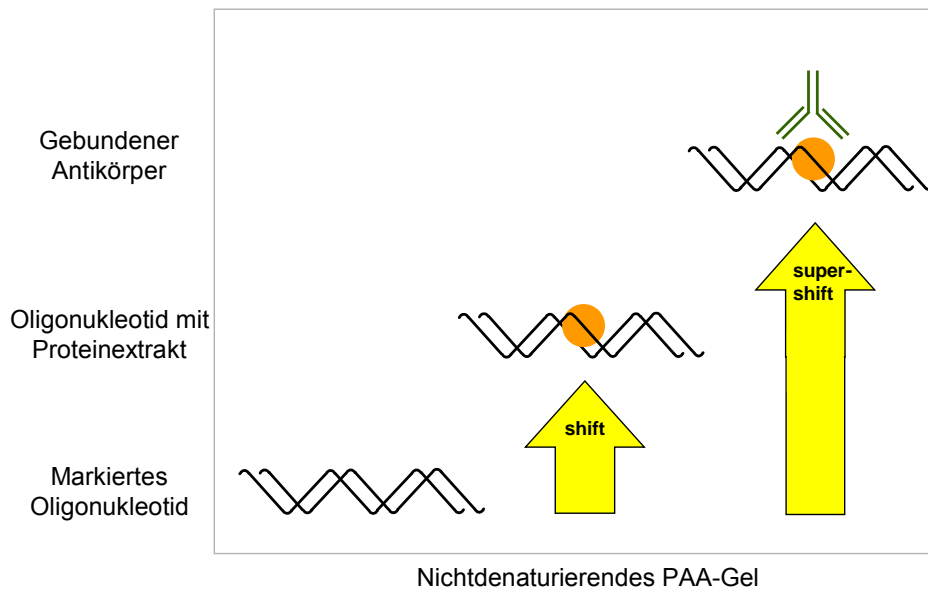
Die anschließend berechnete sogenannte RLA (*relative luciferase activity*) ist folgendermaßen definiert :

$$RLA = \frac{\text{firefly-luciferase(Konstrukt)} / \text{renilla-luciferase(pRL-nullvector)}}{\text{firefly-luciferase(pGL3basic)} / \text{renilla-luciferase(pRL-nullvector)}}$$

Nach der Durchführung von fünf voneinander unabhängigen Transfektions-Experimenten (jeweils  $n=4$ ) erfolgte die Berechnung des Mittelwertes der RLA aus den jeweils ermittelten Werten. Die Werte wurden in Relation zum Promotorkonstrukt in der nicht mutierten Form gesetzt, welcher als 100% definiert wurde. Die folgende statistische Untersuchung bezüglich der Aktivitätsunterschiede erfolgte durch den zweiseitigen t-Test. Bei einem  $P<0.05$  wurden die Ergebnisse als statistisch signifikant angesehen.

#### 2.2.4.3 Proteinextraktion und EMSA

Mit Hilfe der Datenbank TRANSFAC (Version 3.5, Gesellschaft für biotechnologische Forschung, Braunschweig, Deutschland, [www.motif.genome.ad.jp](http://www.motif.genome.ad.jp)) wurden die Promotorsequenzen auf potentielle cis-Elemente, d.h. Sequenzen, die durch Bindung von Proteinen regulatorisch auf die Expression wirken, hin untersucht. Um nun potentielle Protein-DNA-Interaktionen zu ermitteln, wurden nach Proteinextraktion aus den Zellen EMSAs (*electrophoretic mobility shift assays*) durchgeführt, in denen die untersuchten DNA-Fragmente durch unterschiedliche Proteinbindung verschiedene Laufweiten in dem auftrennenden Polyacrylamidgel zeigen. Bei einer Proteinbindung entstehen sogenannte *shifted bands*. Um die bindenden Proteine anschließend weiter zu differenzieren, werden erneut EMSAs mit Zugabe von Antikörpern durchgeführt. Bei Antikörperbindung entstehen nun sogenannte *super shifted bands* (Abbildung 7).



**Abbildung 7:** Electrophoretic Mobility Shift Essay (EMSA) und Supershift

#### 2.2.4.3.1 Proteinextraktion

Die Proteinextraktion erfolgte nach dem von Schreiber *et al.*<sup>71</sup> beschriebenen Protokoll. Es wurden folgende Modifikationen vorgenommen: Die Zellen wurden in PBS geerntet und in hypotonem Puffer suspendiert (10 mM HEPES-KOH (pH 7,9), 10 mM KCl, 1 mM DTT, 0,1 mM EGTA, 1 x Complete). Nach Zugabe von 37,5 µl/ml IGEPAL CA-630 (10%ig) und Durchmischung auf dem Vortexer erfolgte die 10-minütige Zentrifugation bei 10 000 U/min und 4°C. Es erfolgte die Gewinnung der cytoplasmatischen Proteine. Die nukleäre Fraktion wurde in hypertonem Puffer resuspendiert (20 mM HEPES-KOH (pH 7,9), 400 mM NaCl, 1mM EGTA, 1 mM DTT, 1 x Complete, 25% Glycerol) und 90 min. bei 4°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Nach folgender Zentrifugation für 30 min bei 13000 U/min und 4°C erfolgte die Gewinnung der nukleären Proteine und die Messung der Proteinkonzentration (DC Protein Assay, Bio-Rad, München, Deutschland).

#### 2.2.4.3.2 EMSA

Es wurden doppelsträngige Oligodesoxynukleotide (dsODN, *double-stranded oligodeoxynucleotides*) für die identifizierte Promotorvariante C-338A durch Wiederanlagerung des komplementären Einzelstranges synthetisiert (-338A: 5'-GCTCTGGGCCAAATCGAGGGCA CCT-3', -338C: 5'-GCTCTGGGCCACATCGAGGGCACCT-3'). Anschließend folgte die radioaktive Markierung, dafür wurde 1 pmol dsODN mit 2,5 µl [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP (10 µCi/µl) und 1,25 µl T4-Polynukleotidkinase (10 U/µl) in einem Gesamtvolumen von 25 µl eine Stunde bei

37°C inkubiert. Nach der Aufreinigung (Microspin G-25 Säulen, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) erfolgte über Nacht die Bindungsreaktion zwischen dsODN und den extrahierten Proteinen bei 4°C (12 µg Protein, 60000 cpm dsODN, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 300 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5% Glycerol und 2 µg Poly[d(I-C)] in einem Gesamtvolumen von 25 µl). In Wettbewerbs-Experimenten wurden ansteigende Mengen unmarkiertem dsODN zugesetzt (1 oder 50 pmol pro Bindungsreaktion). Zur Durchführung der Super-shift-Analysen wurden die Proteine vorher noch mit den entsprechenden Antikörpern bei Raumtemperatur eine Stunde lang inkubiert. Folgende Antikörper wurden benutzt: E2F-1 (sc-193X), E2F-2 (sc-633X), E2F-3 (sc-878X) und GATA-2 (sc-267X) (jeweils von Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland). Die elektrophoretische Auftrennung der Produkte erfolgte in einem 4%igem Polyacrylamidgel bei 10 mA, gepuffert in 1 x Tris-Glycin. Nach der Auftrennung erfolgte die Exposition mit Isotopenmessplatten (Fujifilm BAS-MP 2040S, Raytest Isotopenmessgeräte, Straubenhardt, Deutschland) und das Ablesen der Signale durch ein entsprechendes Lesegerät (Fujifilm BAS-1500, Raytest Isotopenmessgeräte, Straubenhardt, Deutschland). Die Auswertung der quantitativen Signalstärke wurde mit dem Computerprogramm TINA 2.09 g (Raytest Isotopenmessgeräte) durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung der Studienpopulation

Die klinischen Parameter der untersuchten Studienpopulation sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Enthalten sind die Mittelwerte mit Standardabweichung für das Alter, den Body Mass Index (BMI), Angabe der Erstmanifestation des Hypertonus, systolische und diastolische Blutdruckwerte und die Blutdruckwerte der 24-Stunden-Blutdruckmessungen aufgeschlüsselt in Tages- (6:00-22:00 Uhr) und Nachtmittelwerte (22:00-6:00 Uhr).

**Tabelle 7:** Klinische Parameter der Studienpopulation

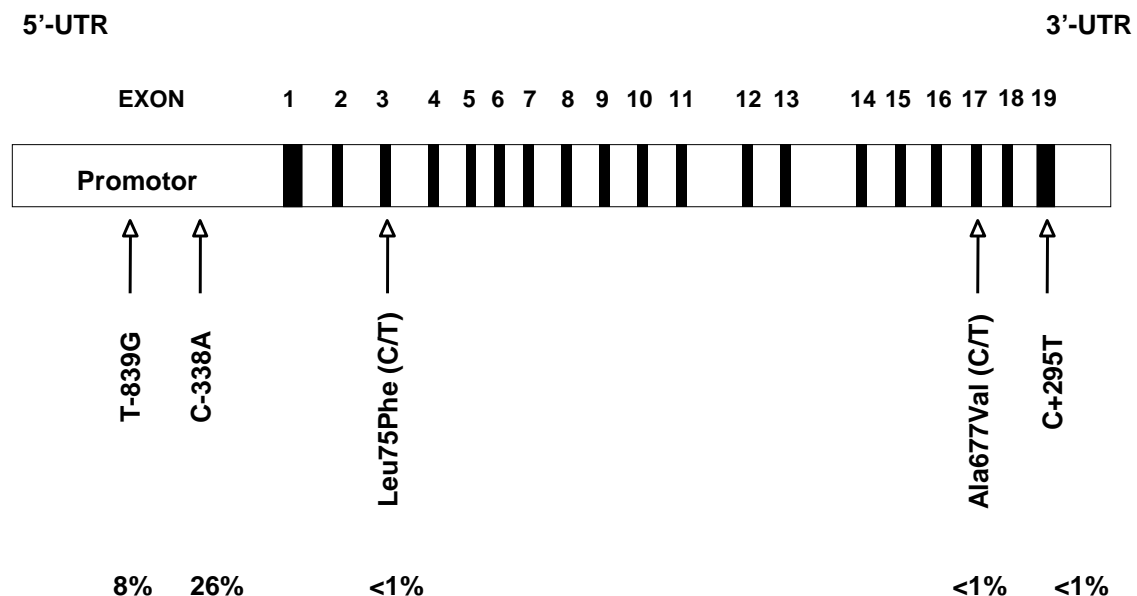
	<i>n</i>	Alter (Jahre)	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	Erstmani- festation (Jahre)	SBD (mmHg)	DBD (mmHg)	Tagesmittel- werte BD (mmHg)	Nachtmittel- werte BD (mmHg)
<b>Gesamt-</b>								
<b>kollektiv</b>	704							
HT*	327	51.4 ±14.7	26.5 ±4.2	43.0 ±14.5	164.8 ±25.9	102.4 ±15.8	150/94 ±16/12	135/81 ±19/13
HT**	377	55.3 ±11.9	28.0 ±4.8	43.9 ±13.3	168.3 ±27.4	102.3 ±16.8	151/92 ±17/12	138/80 ±21/13
<b>Männer</b>	350							
HT*	171	50.7 ±14.9	27.5 ±4.1	42.5 ±14.6	165.3 ±26.3	102.4 ±15.8	152/95 ±17/13	137/82 ±18/13
HT**	179	54.1 ±11.6	28.2 ±3.8	42.6 ±13.9	169.9 ±26.0	104.7 ±16.5	154/96 ±18/12	140/83 ±21/13
<b>Frauen</b>	354							
HT*	156	52.2 ±14.5	25.4 ±4.1	43.5 ±14.5	164.2 ±25.4	102.2 ±15.8	148/92 ±16/12	133/79 ±21/14
HT**	198	56.4 ±12.1	27.8 ±5.6	45.1 ±12.8	166.7 ±28.6	100.1 ±16.8	148/89 ±17/12	136/78 ±20/12

BMI, body mass index; SBD und DBD, systolischer und diastolischer Blutdruck; alle Werte ± Standardabweichung. HT, Hypertoniker; \*ohne antihypertensive Medikation; \*\*mit antihypertensiver Medikation

### 3.2 Identifizierte genetische Varianten und Häufigkeiten

Beim Mutationsscreening konnten fünf doppelallelige ECE-1b-Varianten identifiziert werden (Abbildung 8). Zwei lagen in der 5'-Region (Promotor): T-839G und C-338A (rückwärts ab dem Startcodon gezählt). Die weiteren 3 Varianten lagen in verschiedenen Exons: L75F C/T (Exon 3), A677V C/T (Exon 17) und C+295T (Exon 19). Die Varianten in Exon 3 und 17 führten jeweils zu einem Aminosäureaustausch und wurden nach den ausgetauschten Aminosäuren und der Position im entstehenden Protein benannt: L75F, Leucin wird an Position 75 durch Phenylalanin ersetzt; A677V, Alanin wird an Position 677 durch Valin ersetzt. Die Variante im Exon 19 lag im nicht mehr translatierten Bereich (Positionsangabe gezählt ab der ersten Base nach Translationsende). Die Allelhäufigkeiten sind in Tabelle 8 angegeben, die drei in Exons gelegenen Varianten waren so selten (<1%), dass in den folgenden Analysen nur die beiden im Promotor liegenden Varianten untersucht wurden.

Alle fünf genetischen Varianten zeigten keine signifikanten Abweichungen vom erwarteten Hardy-Weinberg-Äquilibrium. Im Kopplungsungleichgewicht lagen jedoch nur die beiden Promotorvarianten (T-839G und C-338A) mit einem  $P < 0.0001$  und einem Korrelationskoeffizienten  $r = 0.49$ .



**Abbildung 8:** ECE-1b-Gen mit identifizierten Varianten

In der unteren Zeile sind die Allelhäufigkeiten des mutierten Allels angegeben.

**Tabelle 8:** Häufigkeiten der identifizierten genetischen Varianten

Genetische Variante	Hypertoniker			Frequenz des mutierten Allels
	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	
<b>T-839G</b>	TT 590 (84.0%)	TG 105 (15.0%)	GG 7 (1.0%)	0.08
<b>C-338A</b>	CC 357 (51.3%)	CA 291 (41.8%)	AA 48 (6.9%)	0.26
<b>L75F</b>	CC 693 (99.9%)	CT 1 (0.1%)	TT 0	0.0005
<b>A677V</b>	CC 699 (99.7%)	CT 2 (0.3%)	TT 0	0.0015
<b>C+295T</b>	CC 670 (99.6%)	CT 3 (0.4%)	TT 0	0.002

### 3.3 Genotyp- und Haplotypverteilung

Aus den beiden Promotorvarianten ließen sich neun verschiedene Genotyp bzw. Haplotyp-paare konstruieren (aus vier sich ergebenden Haplotypen). Drei davon waren sehr selten (<1%). Die Verteilung der übrigen sechs Genotyp/Haplotyp-paare (drei Haplotypen) ist in Tabelle 9 aufgeführt. Der Genotyp in der an beiden Positionen homozygot nicht mutierten Form war erwartungsgemäß mit 51% am häufigsten (an beiden Positionen nicht mutierter Haplotyp 72%).

**Tabelle 9:** Genotyp- und Haplotypverteilungen

Genotypen	Haplotypenpaare		Hypertoniker <i>n</i> (%)	Haplotypen	Hypertoniker <i>n</i> (%)
	Haplotyp I	Haplotyp II			
11	11	11	334 (51.1%)	11	939 (71.9%)
12	12	11	194 (29.7%)	12	258 (19.8%)
22	22	11	77 (11.8%)	22	109 (8.3%)
13	12	12	23 (3.5%)		
23	22	12	18 (2.8%)		
33	22	22	7 (1.1%)		

Genotypen und Haplotypen mit einer Frequenz >1%; Kodierung der Genotypen: 1=homozygot für die Referenzsequenz, 2=heterozygot, 3=homozygot mutiert; Kodierung der Haplotypen: 1=identisch mit Referenzsequenz, 2=abweichend von Referenzsequenz; Reihenfolge der Geno- und Haplotypen: T-839G, C-338A

### 3.4 Geschlechtsspezifische Effekte auf den Blutdruck

In der einzelnen Betrachtung beider identifizierten Promotorpolymorphismen waren beide Varianten statistisch signifikant mit 24-Stunden-Blutdruckwerten bei nicht antihypertensiv behandelten Frauen assoziiert. Dabei gingen die beiden mutierten Allele -839G und -338A jeweils mit erhöhten systolischen und diastolischen 24-Stunden-Blutdruckwerten (sowohl Tages- als auch Nachtmittelwerte) in nicht antihypertensiv behandelten Frauen einher. Die jeweiligen Blutdruckwerte und die *P*-Werte (alle <0.05) sind im einzelnen in Tabelle 10 aufgeführt.

In den weiterhin durchgeführten Haplotyp-Analysen zeigte sich ebenfalls ein statistisch signifikanter Zusammenhang zu den 24-Stunden-Blutdruckwerten bei den nicht antihypertensiv behandelten Frauen. Der Unterschied zwischen dem an beiden Positionen nicht mutierten („11“) und dem an beiden Positionen mutierten Haplotyp („22“) war statistisch signifikant und der mutierte Haplotyp ging mit erhöhten systolischen und diastolischen 24-Stunden-Blutdruckwerten (sowohl Tages- als auch Nachtmittelwerte) einher (Blutdruck- und *P*-Werte in Tabelle 11). Der Haplotyp in nur an Position -338 mutierten Form („12“) nahm dabei bezüglich der Blutdruckwerte eine Zwischenstellung ein. Der vierte mögliche Haplotyp „21“ (nur an Position -839 mutiert) war in der Population der nicht antihypertensiv behandelten Frauen nicht vertreten.

In der gesamten Studienpopulation ließ sich weder bei den Genotypen noch bei den Haplotypen ein Zusammenhang mit Endorganschäden zeigen.

**Tabelle 10:** Effekte beider Promotorvarianten auf den 24h-BD bei Frauen ohne Medikation

Varianten/ Genotypen	n	SBD	P	DBD	P	SBD	P	DBD	P
		Tag* (mmHg)		Tag* (mmHg)		Nacht* (mmHg)		Nacht* (mmHg)	
<b>T-839G**</b>									
-839TT	81	145.7±15.1	0.012	90.5±11.2	0.022	131.1±19.6	0.021	77.9±13.7	0.067
-839TG	20	157.0±17.4		97.5±12.0		143.4±22.5		83.7±13.2	
<b>C-338A</b>									
-338CC	51	144.5±13.4	0.049	89.6±10.4	0.028	128.7±15.7	0.017	76.3±11.4	0.035
-338CA / -338AA	50	151.4±18.0		94.2±12.5		138.4±23.9		81.8±15.5	

\* 24-Stunden-Blutdruckwerte: Tagesmessung 6:00-22:00 Uhr, Nachtmessung 22:00-6:00 Uhr, Werte ± Standardabweichung, \*\* in der Population existierten keine homozygot Mutierten für Position -839 (GG)

**Tabelle 11:** Effekte der Haplotypen auf den 24h-BD bei Frauen ohne Medikation

Haplotypen	n	SBD	P*	DBD	P*	SBD	P*	DBD	P*
		Tag** (mmHg)		Tag** (mmHg)		Nacht** (mmHg)		Nacht** (mmHg)	
11	51	144.5±13.4	0.008	89.6±10.4	0.009	128.7±15.7	0.008	76.3±11.4	0.022
12	30	147.7±17.7		92.0±12.5		135.1±24.6		80.5±17.0	
22	20	157.0±17.4		97.5±12.0		143.4±22.5		83.7±13.2	

\* P-Werte: Unterschiede zwischen Haplotyp 11 und 22

\*\* 24-Stunden-Blutdruckwerte: Tagesmessung 6:00-22:00 Uhr, Nachtmessung 22:00-6:00 Uhr, Werte ± Standardabweichung.

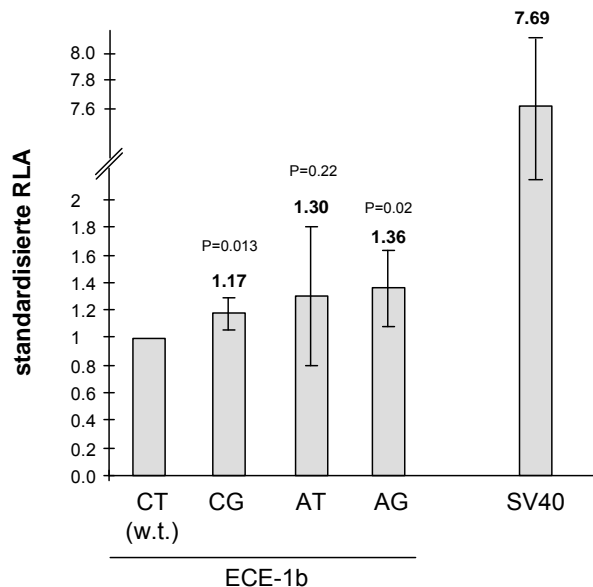
Kodierung der Haplotypen: 1=identisch mit Referenzsequenz, 2=abweichend von Referenzsequenz; Reihenfolge der Haplotypen: T-839G, C-338A

### 3.5 Promotoraktivitäten nach Transfektion

Zur Untersuchung der funktionellen Signifikanz der beiden neu identifizierten Polymorphismen im ECE-1b-Promotor wurden die vier unterschiedlichen Haplotypen in das Luciferase-Reporterplasmid subkloniert, dann in die Endothelzelllinie EA.hy926 transfiziert und schließlich die Promotoraktivitäten gemessen. Verglichen mit dem Wildtyp-Konstrukt (-338C/-839T), zeigten die Konstrukte mit dem -338A-Allel (-338A/-839T und -338A/-839G) eine erhöhte Promotoraktivität (130 und 136%, siehe Abbildung 9). Beim -338A/-839G-Haplotypen war die Erhöhung der Aktivität statistisch signifikant ( $P=0.02$ ), beim -338A/-839T-Haplotypen war die gemessene Erhöhung der Aktivität aufgrund einer hohen Standardabweichung nicht signifi-



kant. Eine geringe Erhöhung in der Promotoraktivität verglichen mit dem Wildtyp konnte ebenfalls im -338C/-839G-Konstrukt gemessen werden (117%, siehe Abbildung 9).



**Abbildung 9:** Haplotyp-spezifische ECE-1b-Promotoraktivität

Positionen (CT, CG, AT, AG) in der Reihenfolge C-338A, T-839G; w.t.: Wildtyp; RLA: relative Luciferaseaktivität, die Aktivität des Wildtyps wurde als standardisierter Bezugspunkt auf 100% gesetzt; SV40: als Vergleichsstandard dienender Promotor im pGL3-Vektor; die RLA-Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus fünf unabhängigen Experimenten (jeweils  $n=4$ ); die *P*-Werte sind jeweils auf den Wildtypen bezogen.

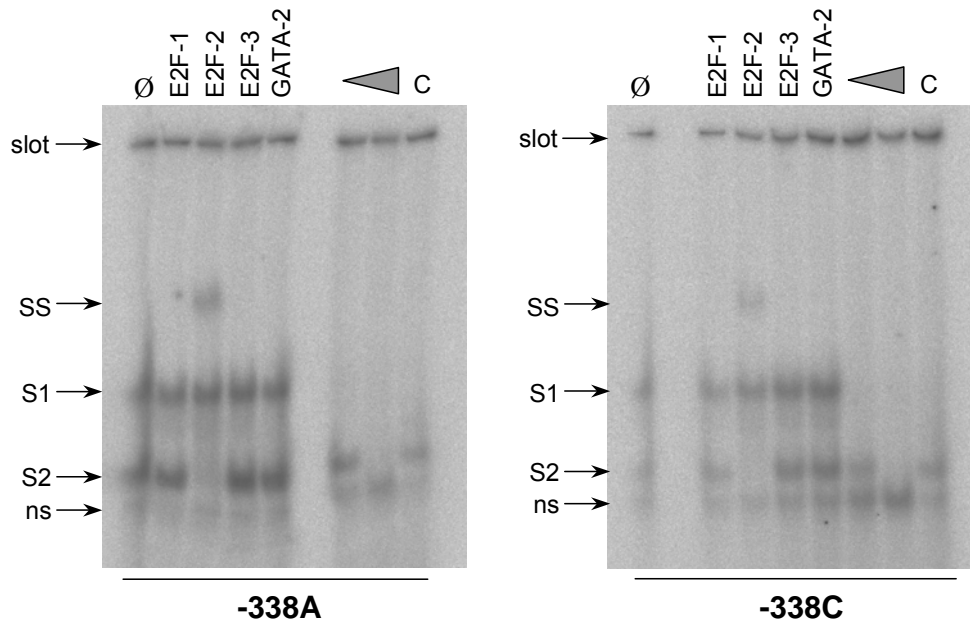
### 3.6 Sequenzabhängige Bindung von Transkriptionsfaktoren

Nachdem mit Hilfe der Computerdatenbank die Promotorsequenzen auf potentielle Proteinbindungsstellen untersucht wurden, konnten für das -338A-Allel Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren aus der E2F-Familie identifiziert werden. Das -338C-Allel weist hingegen eine Bindungsstelle für GATA-Proteine auf <sup>72</sup>.

In den durchgeführten EMSAs mit den spezifischen Oligonukleotiden (ODNs) -338A und -338C unter ansteigender Menge an zugesetzten unmarkierten ODNs und nukleären Proteinen konnten zwei spezifische Banden (S1 und S2) identifiziert werden (Abbildung 10). Eine dritte weniger intensive Bande, welche bei Zusatz unterschiedlicher Mengen an unmarkierten ODNs (Kompetitor) im Gegensatz zu Bande S1 und 2 unverändert blieb, wurde als unspezifisch gewertet.

Zur Identifizierung der bindenden Transkriptionsfaktoren wurden die Super-shift-Experimente unter Zusatz von Antikörpern spezifisch für E2F-1, E2F-2, E2F-3 und GATA-2 durchgeführt. Die Zugabe von spezifischen Antikörpern gegen E2F-2 erzeugte eine *super-shifted-band* (SS). Einhergehend kam es zum Verschwinden von Bande S2, welches impliziert, dass in

dieser Bande (und nicht in Bande S1) die durch den Antikörper gebundenen Proteine (E2F-2) enthalten waren. Der für E2F-2 spezifische *super-shift* war unter Zugabe beider benutzten ODNs (-338A und -338C) nachweisbar. Die anderen zugesetzten Antikörper konnten keine *super-shifted-bands* erzeugen (Abbildung 10).



**Abbildung 10:** Protein-DNA-Interaktion

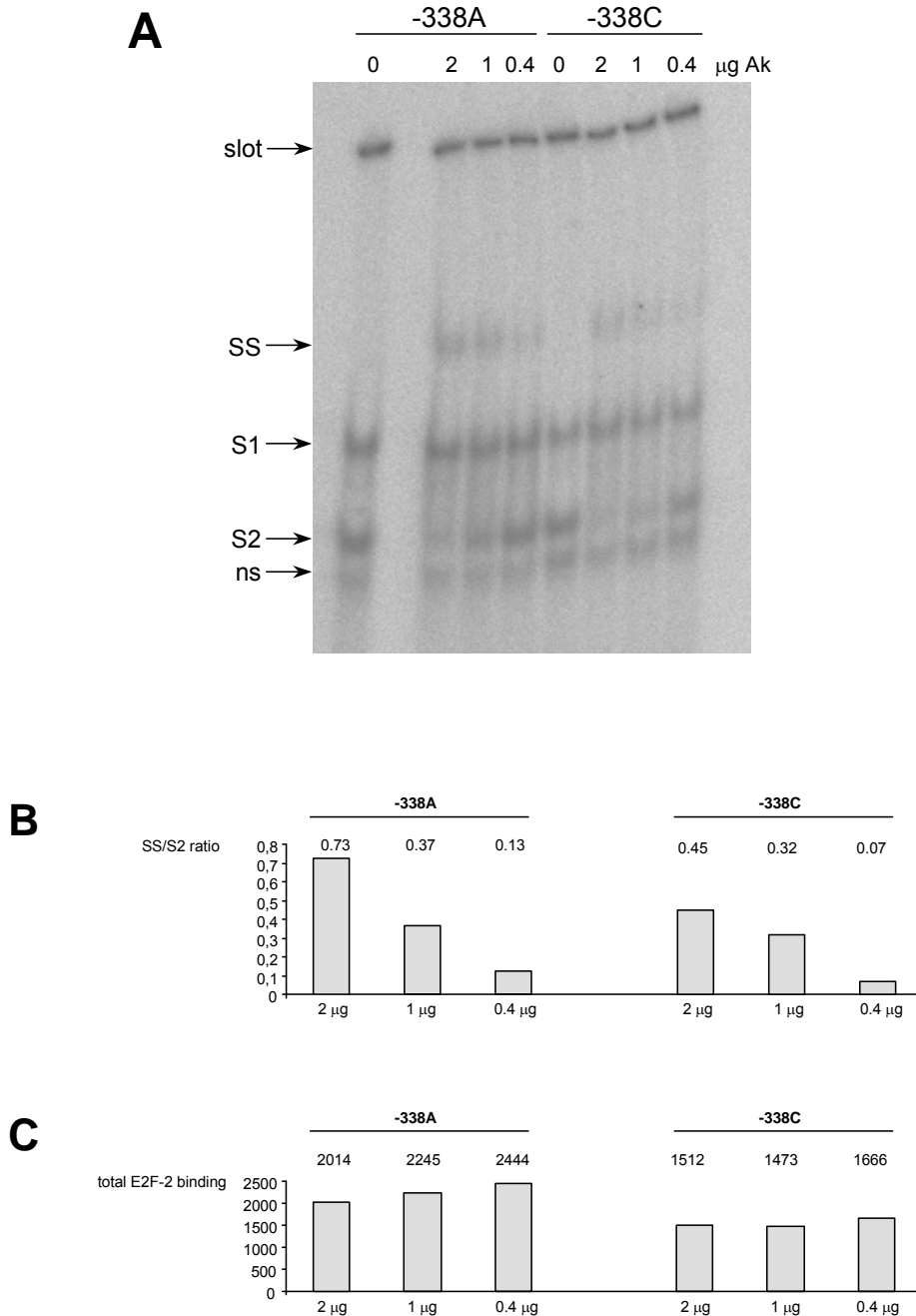
Dargestellt sind die Interaktionen von zytosolischen (C) und nukleären (übrige Reihen) Proteinen aus EA.hy926-Zellen mit polymorphen Sequenzen (C-338A) des ECE-1b-Promotors; Ø: ohne Antikörper; E2F-1, 2, 3 und GATA-2: entsprechend zugesetzte Antikörper; mit einem Dreieck gekennzeichnete Reihen: Konkurrenzexperimente mit ansteigender Menge an zugesetzten unmarkierten ODNs; ns: unspezifische Bande; S1, S2: spezifische Banden („band shifts“); SS: „super-shifted band shift“.

### 3.7 Sequenzabhängige Affinität des Transkriptionsfaktors E2F-2

Da die spezifischen *band-shifts* für das -338A ODN intensiver als für das -338C ODN waren (Abbildung 10), wurden zusätzliche EMSAs durchgeführt, in denen ansteigende Konzentrationen des anti-E2F-2-Antikörpers in der Bindungsreaktion zugesetzt wurden, um die Affinität von E2F-2 zum -338A- und -338C-Allel zu analysieren. Wie erwartet ging eine geringere Antikörperkonzentration mit einer geringeren Intensität der *super-shifted-band* (SS) und im Gegenzug mit einer erhöhten Intensität der S2-Bande einher (Abbildung 11A). Unabhängig von den benutzten Antikörperkonzentrationen waren die Banden (SS und S2) für das -338A ODN intensiver.

Quantitative Analysen der Bandenintensitäten (ausgedrückt in *density units*, Intensitätseinheiten) zeigten, dass das Verhältnis von SS zu S2, welches, unabhängig von den auf das Gel aufgetragenen Mengen, die E2F-2-Affinität widerspiegelt, für das -338A ODN bei allen Antikörperkonzentrationen höher als für das -338C ODN war (Abbildung 11B). Zusätzlich wurden die jeweiligen Intensitäten von S2 und SS addiert, um somit die vollständigen E2F-2-

Bindungen zu erhalten. Es zeigte sich eine höhere Gesamtintensität beim -338A ODN, was ebenfalls eine erhöhte E2F-2-Bindungsaffinität des -338A-Promotorallels widerspiegelt (Abbildung 11C).



**Abbildung 11:** Unterschiedliche Bindung von E2F-2 an -338A und -338C

**A:** Beschriftung wie Abbildung 10; Ak: Menge an zugesetztem Antikörper (E2F-2) **B:** Quantitative Analyse der Signale aus A **C:** Quantitative Analyse der Signale für die komplette E2F-2-Bindung (Summation der beiden Signale SS und S2).

## 4 Diskussion

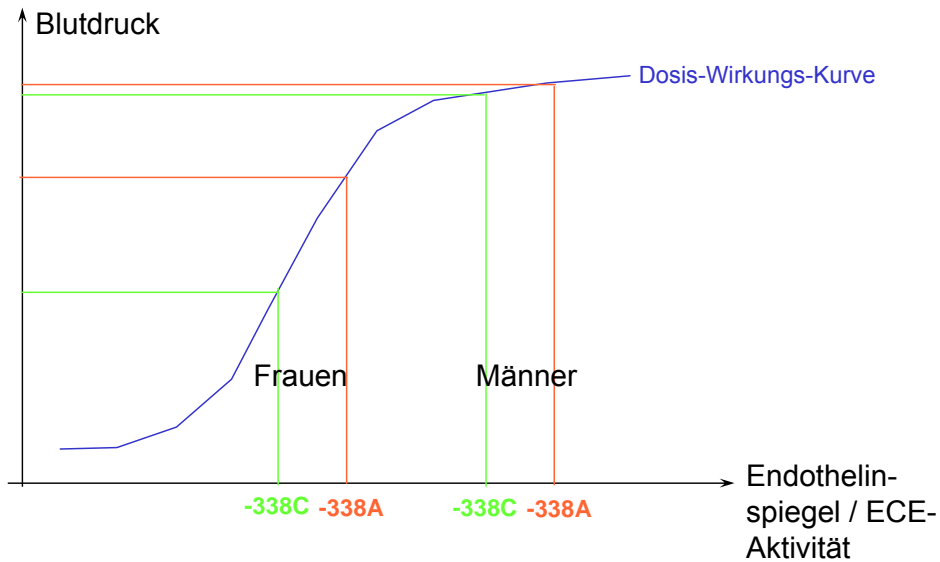
In den durchgeführten Untersuchungen zeigte sich, dass der neu identifizierte -839G/-338A-ECE-1b-Promotor-Haplotyp signifikant mit höherem systolischen und diastolischen 24-Stunden-Blutdruck sowohl tagsüber als auch nachts bei unbehandelten hypertensiven Frauen einhergeht. Dabei waren die Mittelwerte der 24-Stunden-Blutdruckwerte am höchsten bei Frauen, welche den Haplotypen mit den beiden seltenen ECE-1b-Promotor-Allelen trugen und am niedrigsten bei denen, die die beiden häufigen Allele trugen. Der Haplotyp mit dem seltenen Allel an Position -338 in Kombination mit dem häufigen Allel an Position -839 nahm dabei eine Zwischenstellung bezüglich der Blutdruckwerte ein, was zur Annahme eines synergistischen (kodominanten) Effektes bezüglich einer Blutdruckerhöhung der beiden seltenen Allele führt.

Die exonischen Varianten L75F, A677V und C+295T wurden nicht in die Haplotyp-Analysen mit einbezogen, da ihre seltenen Allele mit einer zu geringen Frequenz auftraten (<1%). Es konnte gezeigt werden, dass seltene genetische Varianten häufiger als nicht-synonyme Varianten (Aminosäureänderung), als synonyme Varianten (keine Aminosäureänderung) auftreten<sup>73</sup> und bezüglich der Proteineigenschaften eher funktionell sind<sup>74</sup>. In dieser Arbeit gingen diesbezüglich die beiden seltenen exonischen Varianten in Exon 3 (L75F) und Exon 17 (A677V) mit einem Aminosäureaustausch einher. Der einzige männliche Patient in dieser Studie, welcher die ECE-1b L75F-Variante aufwies, hatte eine frühe Erstmanifestation seiner arteriellen Hypertonie in einem Alter von 12 Jahren und eine positive Familienanamnese, in welcher der Vater ebenfalls eine frühe Erstmanifestation seines arteriellen Hypertonus aufwies. Die eventuelle funktionelle Rolle dieser Missense-Variante könnte in weiteren Studien untersucht werden.

Der beschriebene geschlechtsspezifische Genotypeneffekt, der sich in unseren Analysen gezeigt hat, bleibt spekulativ. Eine mögliche geschlechtsspezifische Modulation des Endothelinsystems bezüglich der arteriellen Hypertonie wurde bereits in einem Rattenmodell dargestellt<sup>75</sup> und kürzlich durchgeführte Untersuchungen zeigten eine Inhibierung der ET-1-Synthese durch Östradiol<sup>76,77</sup>. Der geschlechtsspezifische blutdruckbeeinflussende Effekt nur bei Frauen des C-338A Polymorphismus konnte durch Funalot *et al.* in der EVA-Studie bestätigt werden<sup>78</sup>.

Wenn man eine Dosis-Wirkungs-Kurve zwischen dem Endothelinspiegel und dem Blutdruck annimmt, gestützt durch die Feststellung, dass Endothelin zur Aufrechterhaltung des Gefäßtonus beiträgt<sup>38,39,40</sup>, und weiterhin berücksichtigt, dass Frauen niedrigere ET-1-Spiegel aufweisen<sup>79</sup>, könnte man annehmen, dass die ECE-1b-Promotor-Varianten und damit die ECE-

Expression einen größeren Einfluss auf den Blutdruckphänotypen bei Frauen haben, da die Endothelinspiegel bei Frauen an einem steileren Teil der Dosis-Wirkungs-Kurve liegen könnten (Abbildung 12).



**Abbildung 12:** Dosis-Wirkungs-Kurve

Hypothetische Dosis-Wirkungs-Kurve zwischen Endothelinspiegel/ECE-Aktivität und Blutdruckhöhe in Abhängigkeit von geschlechtsspezifischen ECE 1b C-338A-Effekten

Bezüglich ET-1-Plasmaspiegel ist bekannt, dass ca. 80% des ET-1 an der abluminalen Seite des Gefäßes sezerniert wird<sup>80,81</sup>. Da ET-1 von den Endothelzellen in Richtung der Gefäßwand sezerniert wird und dort vorwiegend an den darunter liegenden glatten Muskelzellen wirkt, müsste die Konzentration dort um ein Vielfaches höher sein als im Plasma<sup>80,81</sup>. Somit wirkt Endothelin mehr als ein autokrines/parokrines System als ein systemisches Peptid. Aus diesem Grund könnte die Beurteilung des ET-1-Plasmaspiegels nicht der günstigste Parameter sein<sup>82</sup>.

Unter der Annahme, dass ECE-1-Promotor-Polymorphismen bezüglich modifizierter Endothelinspiegel auch im Endothel der Niere funktionell sind, könnte dies den Blutfluß in der Nierenrinde über  $ET_A$ -Rezeptoren und in Folge die Natriumreabsorption beeinflussen<sup>36,37</sup>. Weiterhin spielt der  $ET_B$ -Rezeptor eine wichtige Rolle im renalen Natriumhaushalt durch hemmende Effekte auf den epithelialen Natriumkanal (ENaC)<sup>83,84</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass die  $ET_B$ -Rezeptorexpression im Nierenmark durch salzarme Diät hochreguliert wurde<sup>85</sup>. Somit könnte der ECE-1b-Polymorphismus den Blutdruck ebenfalls über nicht gefäßabhängige sondern renale Mechanismen beeinflussen.

Im Rahmen des geschlechtsspezifischen Effektes der identifizierten Polymorphismen könnte es eine Interaktion zwischen Endothelinen und Geschlechtshormonen in Bezug auf den

Salzhaushalt geben. In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu erwähnen, dass ECE-1 in den endothelialen und steroidproduzierenden Zellen des Corpus luteum exprimiert wird und dass das Expressionslevel abhängig von der Phase des Menstruationszyklus ist<sup>86</sup>. Es wurde jedoch gezeigt, dass die Natriumretention in der lutealen Phase des normalen Ovulationszyklus nicht erhöht ist<sup>87,88</sup>. Interessant bezüglich möglicher Hormoninteraktionen ist auch die Feststellung, dass die Endothelinkonzentrationen im Plasma bei Frauen mit Präeklampsie höher sind und dass präeklampisches Serum die Expression von ECE in kultivierten Endothelzellen erhöht<sup>89,90,91</sup>.

Bezüglich genetischer Unterschiede konnte bei hypertensiven Afroamerikanern eine höhere ECE-1-Aktivität als bei weißen hypertensiven Patienten gemessen werden, was eine genetische Variabilität im Endothelinsystem annehmen lässt<sup>92</sup>, welche mit einer unterschiedlichen Schwere einer essentiellen Hypertonie einhergehen könnte.

Betrachtet man eine komplexe genetische Erkrankung wie die essentielle Hypertonie, so ergibt sich ebenfalls eine komplexe Genotyp-Phänotyp-Beziehung. Wenn man in einer Population nur einzelne Genpolymorphismen untersucht, könnte dies die existierende Genotyp-Phänotyp-Beziehung verschleiern, wenn Paare der untersuchten Polymorphismen ein starkes Kopplungsungleichgewicht zueinander aufweisen und entgegengesetzte Effekte auf den untersuchten Phänotypen besitzen<sup>74</sup>. In Bezug auf die Kausalität ist es wichtig, die Allele zu identifizieren, welche für unterschiedliche Genotyp-Phänotyp-Beziehungen verantwortlich sind, indem man *in vitro*-Modelle benutzt.

In den in dieser Arbeit durchgeführten Promotoruntersuchungen wurden kultivierte menschliche Endothelzellen benutzt. Zum einen, weil das Gefäßendothel die Hauptlokalisierung der ECE-1-Expression beim Menschen *in vivo* darstellt<sup>48</sup> und zum anderen, weil das von Endothelzellen hergestellte ET-1 vasokonstriktorisch über ET<sub>A</sub>- (und ET<sub>B</sub>-)Rezeptoren an den darunter liegenden glatten Muskelzellen wirkt<sup>20</sup>. In den Funktionsanalysen der beiden untersuchten Promotorpolymorphismen (C-338A und T-839G) zeigte sich für beide seltenen Allele (-338A und -839G) eine veränderte Funktionalität gemessen an der erhöhten RLA als Ausdruck der erhöhten Promotoraktivität. Dieser Effekt war für die -338A-Variante ausgeprägter, weswegen die C-338A-Variante für weitere Untersuchungen ausgewählt wurde. Eine statistische Signifikanz des Anstieges in der Promotoraktivität konnte jedoch bezüglich der -338A-Variante nur für das Konstrukt -338A/-839G erreicht werden, da die Standardabweichung für das -338A/-839T-Konstrukt bei jedoch scheinbar deutlicher erhöhter Aktivität zu hoch war.

In den weiterführenden EMSA-Experimenten zur Untersuchung von Protein- (Transkriptionsfaktoren) DNA-Interaktionen mit der C-338A-Variante konnte ein polymorphes cis-Element, d.h. ein regulatorisch wirkender Promotorabschnitt, im ECE-1b-Promotor identifiziert werden, welches die Fähigkeit zur Bindung des Transkriptionsfaktors E2F-2 aufweist. Weiterführend konnte gezeigt werden, dass das -338A-Allel, welches mit höheren Blutdruck-Phänotypen

bei Frauen einhergeht eine höhere Affinität zu E2F-2 verglichen mit dem Wildtyp -338C hat. Die Fähigkeit des -338C ODN zur Bindung von E2F-2 war unerwartet, zumal Computeranalysen mittels des Programmes TRANSFAC<sup>72</sup> zum Suchen nach potentiellen cis-Elementen für die -338C-Variante eine Consensus-Sequenz für GATA, jedoch nicht für E2F-Proteine identifiziert hatten. Man kann daraus folgern, dass Consensus-Elemente mit nur geringer Bindungsaffinität wie die -338C-Variante in Datenbanken wie TRANSFAC unterrepräsentiert sein könnten, was als Schlussfolgerung nach sich ziehen würde, dass Voraussagen über potentielle Transkriptorenfaktorbindungen in geeigneten Experimenten überprüft werden sollten.

Weiterhin wäre es möglich, dass der Polymorphismus an Stelle -338 in anderen Zellen den Typ des Transkriptionsfaktors, welcher an den Promotor bindet, ändert (E2F-2 vs. GATA-2) im Gegensatz zu der quantitativen Änderung in Form der Bindungsaffinität eines Transkriptionsfaktors, welches in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten mit der endothelialen Zelllinie EA.hy926 gezeigt wurde. Bezüglich einer zellspezifischen Expression sei erwähnt, dass GATA-1 bis GATA-3 hauptsächlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert werden, wobei GATA-4 bis GATA-6 besonders im Herz exprimiert werden<sup>93,94</sup>. Zusätzlich wurde GATA-2 aus aortalen Endothelzellen isoliert und der ET-1-Genpromotor bietet eine nichterythrozytische GATA-2-Bindungsstelle<sup>95</sup>. Dennoch war es uns nicht möglich, GATA-2 in den verwendeten Endothelzellen EA.hy926 in Westernblot-Analysen nachzuweisen (Daten nicht dargestellt). Dies erklärt auch den fehlenden Supershift in den Gelshiftuntersuchungen. Die spezifische Bande S1 in den EMSA-Experimenten ist möglicherweise durch andere GATA-Proteine als GATA-2 oder durch sogenannte DPs (differentiation regulated transcription factor (DRTF) proteins), welche essentielle Bindungspartner der E2F-Familie sind, hervorgerufen<sup>96</sup>.

Die Familie der E2F-Transkriptionsfaktoren umfasst 6 Mitglieder (E2F-1 – E2F-6) und spielt eine entscheidende Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus. Gene, die durch E2F-Proteine reguliert werden sind z.B. Zellzyklusregulatoren (z.B. Cyclin E und Cdc2) und Enzyme für die Nukleotidbiosynthese (z.B. Dihydrofolatreduktase)<sup>96</sup>. Der Effekt der E2F-Proteine, mit Ausnahme von E2F-6, wird über Bindung mit drei verschiedenen sogenannten Pocket-Proteinen gesteuert (Retinoblastomprotein, p107 und p130). E2F-1 – E2F-3 gehören zu den aktivierenden E2Fs, während E2F-4 – E2F-6 zu den supprimierenden E2Fs gehören<sup>96</sup>. In Bezug auf die Pathophysiologie ist E2F-1 das erste Gen, welches sowohl die Kriterien eines Onkogens als auch die eines Tumorsuppressorgens erfüllt<sup>97,98,99</sup>. Eine E2F-1-basierte Gentherapie wurde in Tiermodellen beim Glioblastoma multiforme angewendet<sup>100,101</sup>.

Das Wissen über spezifische Funktionen der E2F-Proteine in Endothelzellen ist begrenzt, es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Überexpression an E2F-1 proliferierende menschliche Endothelzellen vor der Tumornekrosefaktor-alpha-induzierten Apoptose bewahren

kann<sup>102</sup>. Die Proliferation endothelialer glatter Muskelzellen konnte in experimentell hervorgerufenen Gefäßverletzung durch E2F-decoy (Inaktivierung) supprimiert werden, was eine besondere Rolle für E2F-Transkriptionsfaktoren in der Regulation des Zellzyklus in Endothelzellen der Gefäße annehmen lässt<sup>103</sup>. In der PREVENT-Studie führte ein E2F-decoy zu einer Abnahme der Okklusionsrate von Venenbypässen nach 12 Monaten<sup>104</sup>.

Ein Zusammenhang zwischen den Transkriptionsfaktoren E2F und der arteriellen Hypertonie wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben. In Bezug auf die arterielle Hypertonie und veränderte Zellzyklen wurde beschrieben, dass Angiotensin II die DNA-Synthese und die Expression von in den Zellzyklus involvierten Proteinen wie Cyclin D1 und cdk4 in glatten Gefäßmuskelzellen von hypertensiven Ratten erhöht<sup>105,106</sup>. Weiterhin zeigten kultivierte glatte Gefäßmuskelzellen von spontan hypertensiven Ratten eine Progression im Zellzyklus im Vergleich zu Zellen normotensiver Kontrollen<sup>107,108</sup>. Es könnte möglicherweise also auch durch vaskuläre Umbauvorgänge zu einem erhöhten Blutdruck durch den -338A-Polymorphismus kommen.

Es sollte in Bezug auf zukünftige Studien erwähnt werden, dass abgesehen von der Expression von ECE-1 in Endothelzellen und glatten Muskelzellen<sup>48,56,57</sup>, auch eine Expression in der Nebenniere, Testis und Ovar beim Menschen<sup>48</sup> und in diversen Kernen des zentralen Nervensystems bei Ratten nachgewiesen wurde<sup>109</sup>. Die potentielle Rolle der beschriebenen Polymorphismen in diesen Geweben könnte ebenfalls zur Beeinflussung des individuellen Blutdruckes führen oder einen Einfluß auf andere Krankheiten haben<sup>110</sup>.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass der identifizierte ECE-1b C-338A Promotorpolymorphismus auf die Pathogenese des erhöhten Blutdruckes beim Menschen einen Einfluss hat und eine unterschiedliche allelabhängige Bindungsaffinität des Transkriptionsfaktors E2F-2 an den ECE-1b-Promotor vorliegt.



## 5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, den Promotor und die gesamte kodierende Region des ECE-1b-Gens als potentiell Kandidatengen der Blutdruckregulation auf genetische Polymorphismen und anschließend mögliche Assoziationen mit Blutdruckphänotypen zu untersuchen. In Funktionsanalysen sollte eine mögliche Funktionalität der identifizierten Polymorphismen untersucht werden.

Es wurden 704 Hypertoniker kaukasischen Ursprungs rekrutiert. Für das systematische Mutationsscreening des ECE-1-Gens mittels SSCP-Analyse wurde die genomische DNA von 95 ausgewählten Hypertonikern verwendet. Die genaue Lokalisation der genetischen Variante erfolgte anschließend durch die Sequenzierung der DNA-Probe.

Es konnten fünf doppelallelige ECE-1b Varianten identifiziert werden. Zwei lagen in der 5'-Region (Promotor): T-839G und C-338A. Die weiteren 3 Varianten lagen in verschiedenen Exons: L75F C/T (Exon 3), A677V C/T (Exon 17) und C+295T (Exon 19). Die Varianten in Exon 3 und 17 führten jeweils zu einem Aminosäureaustausch. Die Variante im Exon 19 lag im nicht mehr translatierten Bereich.

Die identifizierten genetischen Varianten wurden auf die Häufigkeit des Auftretens in der Studienpopulation untersucht. Dazu dienten zwei Methoden, der Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus und die Hybridisierung mit allelspezifischen Oligonukleotiden.

Die drei in Exons gelegenen Varianten waren so selten (<1%), dass in den folgenden Analysen nur die beiden im Promotor liegenden Varianten untersucht wurden. In der einzelnen Betrachtung beider identifizierten Promotorpolymorphismen waren beide Varianten statistisch signifikant mit 24-Stunden-Blutdruckwerten bei nicht antihypertensiv behandelten Frauen assoziiert, wobei die beiden mutierten Allele -839G und -338A jeweils mit erhöhten systolischen und diastolischen Blutdruckmittelwerten einhergingen. In den Haplotyp-Analysen zeigte sich ebenfalls ein statistisch signifikanter Zusammenhang zu den 24-Stunden-Blutdruckwerten bei den nicht behandelten Frauen, wobei der mutierte Haplotyp mit erhöhten systolischen und diastolischen Blutdruckmittelwerten assoziiert war.

In den nachfolgenden Transfektions-Experimenten in Endothelzellen zeigten die Konstrukte mit dem -338A-Allel (-338A/-839T und -338A/-839G) verglichen mit dem Wildtyp-Konstrukt (-338C/-839T) eine erhöhte Promotoraktivität (130% und 136%), wobei beim -338A/-839G-Haplotypen die Erhöhung der Aktivität statistisch signifikant war ( $P=0.02$ ).

Mit Hilfe der TRANSFAC-Datenbank konnten für das -338A-Allel Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren aus der E2F-Familie identifiziert werden. Das -338C-Allel wies hingegen eine Bindungsstelle für GATA-Proteine auf.

In den durchgeführten EMSAs mit den spezifischen Oligonukleotiden (ODNs) -338A und -338C und Zugabe von spezifischen Antikörpern konnte die Bindung von Transkriptionsfaktor E2F-2 für beide genannten Promotorsequenzen gezeigt werden. Zusätzliche Experimente mit quantitativer Auswertung der Bandenintensitäten zeigten eine erhöhte E2F-2-Bindungsaffinität des -338A-Promotorallels.

Zusammenfassend konnte in den Untersuchungen ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den beiden neu identifizierten Polymorphismen im Promotorbereich des ECE-1b-Gens und einem erhöhten arteriellen Blutdruck gezeigt werden. Unterstützt wird diese Feststellung durch die Ergebnisse der Funktionsanalysen, in denen der identifizierte ECE-1b C-338A Promotorpolymorphismus eine unterschiedliche allelabhängige Bindungsaffinität des Transkriptionsfaktors E2F-2 an den ECE-1b-Promotor aufwies und zu einer erhöhten Promotoraktivität führte. Es konnte aufgrund dieser Ergebnisse die angenommene Bedeutung des ECE-1b-Gens als Kandidatengen in der Genese der essentiellen Hypertonie bestätigt werden.

## 6 Ausblicke der Doktorarbeit

### 6.1 Gen-Gen- und Gen-Umwelt-Interaktionen

Bei genetisch komplexen Krankheiten, wie der arteriellen Hypertonie, ist zu erwarten, dass die Wahrscheinlichkeit für das Entstehen der Krankheit oder ihre Ausprägung von vielen Gen-Gen- und Gen-Umwelt-Interaktionen beeinflusst wird <sup>111</sup>.

In zukünftigen Studien sollte das Phänomen der Epistase berücksichtigt werden, das die Suppression oder Potenzierung eines Geneffekts durch weitere genetische Faktoren umfasst. So konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die Angiotensin-Konversions-Enzym (ACE) DD-Homozygotie im Vergleich zu den anderen ACE-Genotypen mit einem Anstieg der Hypertonie-Inzidenz assoziiert war, welche von 31% (P=0.005) bei Einzelgen-Analysen auf 59% (P=0.004) bei gleichzeitigen Trägern des alpha-Adducin (alpha-ADD) 460Trp-Allels und auf 122% (P=0.0007) bei Aldosteron-Synthase (CYP11B2) -344CC-tragenden Individuen anstieg. Individuen mit gleichzeitigem Vorliegen des alpha-ADD 460Trp-Allels und CYP11B2 -344CC-Genotyps bei ACE DD-Homozygotie hatten eine 252% (P=0.001) höhere Hypertonie-Inzidenz im Vergleich zu den jeweiligen Nicht-Trägern <sup>112</sup>.

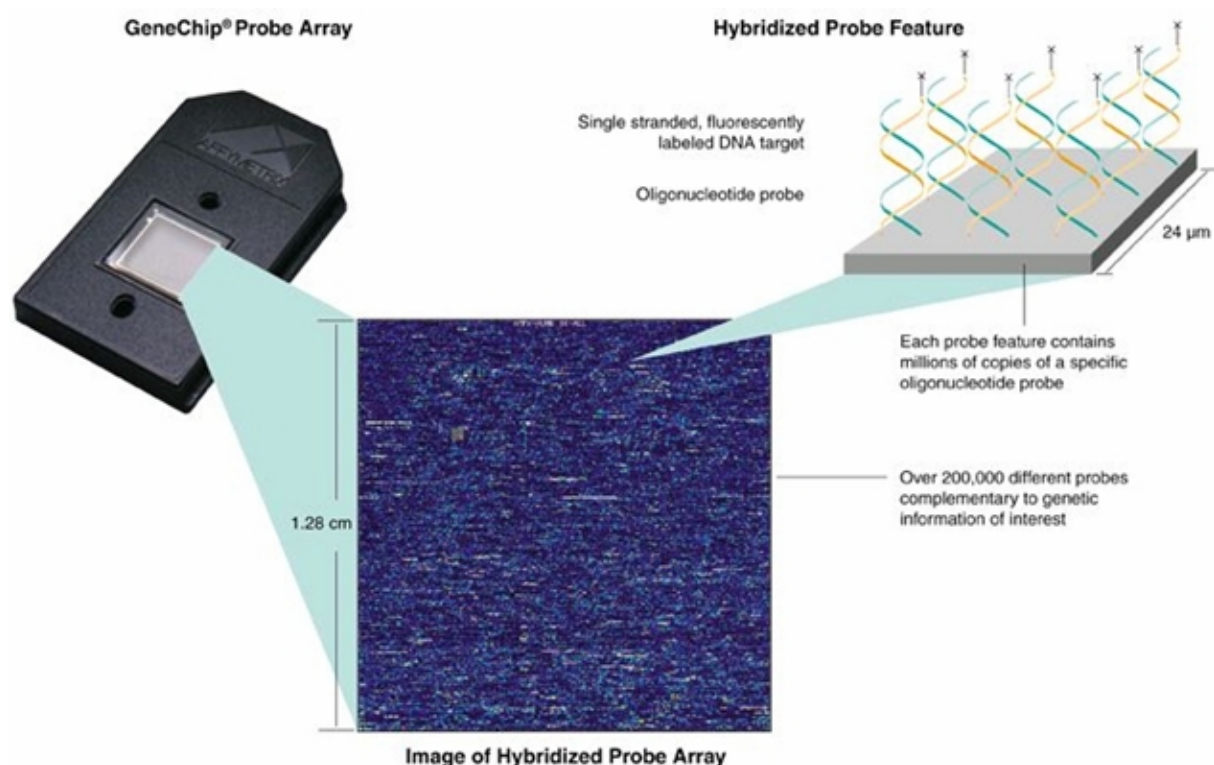
Wir konnten ebenfalls zeigen, dass die Berücksichtigung des „*ecogenetic context*“ als Gen-Umwelt-Interaktion von besonderer Bedeutung ist. So ist z.B. der Effekt genetischer Varianten des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) vor dem Hintergrund der Salzaufnahme bzw. -exkretion zu analysieren. Wir konnten in einer komplementären Populations- und Familien-basierten Assoziationsstudie bei 221 Kernfamilien (384 Eltern, 431 Nachkommen) zeigen, dass bei geringerem Salzkonsum (Salzexkretion <240 mmol/d) männliche Träger des 1675G-Allels des Angiotensin II Typ 2-Rezeptors (AT2) im Vergleich zu 1675A-Allel-Trägern einen signifikant kleineren linksventrikulären Massen-Index (LVMI = linksventrikuläre Masse/Körperoberfläche) aufwiesen <sup>113</sup>. Die AT2-Genotyp-Salz-Interaktion war bei Frauen schwächer ausgeprägt, was möglicherweise auf einen heterozygoten Status (X-chromosomale Lage des AT2-Gens) oder die Beeinflussung der AT2-Expression durch Östrogene zurückzuführen ist <sup>114</sup>. Im Tierexperiment konnte außerdem gezeigt werden, dass Salzkonsum die AT2-Rezeptor-Expression beeinflusst <sup>115</sup>.

## 6.2 Genomweite Assoziationsstudien (GWAS)

Genetische Assoziationsstudien fokussierten bisher auf Kandidatengene, die, wie auch in dieser Arbeit, entsprechend ihrer biologischen Funktion ausgewählt wurden<sup>116</sup>. Durch die Verfügbarkeit genomweiter SNP-Panels und die Entwicklung der SNP-Chip-Hochdurchsatz-technologie können heute extrem viele über das gesamte Genom verteilte SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) zeitgleich bestimmt werden. Dies macht die Analyse genetisch komplexer Krankheiten wie der arteriellen Hypertonie in genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) möglich, ohne dabei auf einer biologischen Hypothese zu beruhen. Die GWAS haben ein großes Potential, neue Ursachen und Mechanismen von Erkrankungen zu entdecken<sup>117,118</sup>.

### 6.2.1 Erfassung der genetischen Variation durch SNP-Chips

Mehr als 10 Millionen validierte SNPs sind inzwischen im menschlichen Genom bekannt (*dbSNP*, [www.ncbi.nlm.nih.gov/snp](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp)). Trotzdem ist es aufgrund von experimentellen und ökonomischen Restriktionen zurzeit noch nötig, sie auf eine möglichst informative und trotzdem noch praktikable Untermenge zu reduzieren. Daher wurden sogenannte SNP-Chips entwickelt. Sie bestehen aus winzigen Mengen allelspezifischer Sonden, die zum Beispiel auf einer kleinen Quarzfläche aufgebracht werden. Für Hunderttausende bis eine Millionen verschiedener Sonden benötigt man Träger von weniger als 2 cm<sup>2</sup> Größe, um die Sonden räumlich sicher voneinander unterscheidbar unterzubringen. Das Detektionsprinzip basiert auf einer allelspezifischen Hybridisierung. Dazu werden alle Genabschnitte der zu untersuchenden DNA-Probe, die einen SNP enthalten, zunächst mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Anschließend werden die PCR-Produkte an die Oberfläche eines SNP-Chips hybridisiert. Für jeden SNP sind zur Identifikation der beiden Allele zwei entsprechende Sonden vorhanden. Bindet das PCR-Produkt nur an eine der beiden DNA-Sonden, so liegt der entsprechende Genotyp in homozygoter Form vor. Sind dagegen Bindungen an beide Sonden zu beobachten, liegt der untersuchte Polymorphismus heterozygot vor. Die in der Hybridisierungsreaktion eingesetzten Fragmente werden mit Fluoreszenzmarkierungen versehen, sodass die Signale mit Hochleistungsscannern automatisch ausgelesen werden können. (Abbildung 13).



**Abbildung 13:** Affymetrix GeneChip® Microarray

### 6.2.2 Beispiele für Ergebnisse von GWAS

Die GWA-Strategie hat bereits neue Regionen identifiziert, die zu koronarer Herzerkrankung führen. So zeigte sich kürzlich die Assoziation einer chromosomalen Region (9p21) mit dem Risiko einer KHK in unterschiedlichen europäischen Populationen<sup>119,120</sup>.

Durch den UK Wellcome Trust wurde eine GWAS für die genetische Prädisposition unterschiedlicher Erkrankungen durchgeführt. Dabei wurden über 500.000 SNPs auf einem Affymetrix-Genchip bei ca. 2000 Individuen für jede der 7 untersuchten Krankheiten und ca. 3000 Kontrollen untersucht. Es konnten 24 Regionen mit Beziehungen zu folgenden Krankheiten entdeckt werden: eine für die bipolare Störung, eine für die koronare Herzkrankheit, neun für den Morbus Crohn, drei für die Rheumatoide Arthritis, sieben für den Diabetes mellitus Typ 1 und drei für den Diabetes mellitus Typ 2. Für die Hypertonie konnten nur „moderate“ Assoziationen ( $P=1 \times 10^{-5} - 5 \times 10^{-7}$ ) für folgenden chromosomalen Regionen gefunden werden: 1q43, 8q24, 10q11, 12p12, 12q23, 13q21 und 15q26<sup>121</sup>.

Newton-Cheh et al. konnten im Rahmen einer GWAS acht genetische Loci identifizieren, die eine Hypertonie-Assoziation zeigten. Sie untersuchten 2.5 Millionen SNPs auf eine Assoziation mit systolischem und diastolischem BD bei 34.433 Individuen europäischer Abstammung des „Global BPgen consortium“ und führten anschließend weitere Genotypisierungen ( $n \leq 71.225$  europäischer Abstammung,  $n \leq 12.889$  indischer/asiatischer Abstammung) und *in sili-*

co-Vergleiche (*CHARGE consortium*, n=29.136) durch. Sie identifizierten Assoziationen zwischen systolischem bzw. diastolischem Blutdruck und häufigen Varianten in acht Regionen in der Nähe des CYP17A1-, CYP1A2-, FGF5-, SH2B3-, c10orf107-, MTHFR-, ZNF652- und PLCD3-Gens. Die identifizierten Assoziationen zwischen häufigen Varianten und Blutdruck bzw. Hypertonie ermöglichen einen mechanistischen Einblick in die Blutdruck-Regulation und könnten auf neue Targets für Interventionen hindeuten, die für die Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen von Bedeutung sind <sup>122</sup>.

Eine wesentliche Limitation der GWA-Studien, die große Studienkollektive einschließen, ist der Kostenfaktor und der Zeitaufwand. Die Durchführung von GWA-Studien mit gepoolten DNA-Proben bietet eine potentielle Lösung, diese Limitation zu umgehen <sup>123</sup>.

## 7 Literaturverzeichnis

---

<sup>1</sup> Wolf-Maier K, Cooper RS, Banegas JR, Giampaoli S, Hense HW, Joffres M, Kastarinen M, Poulter N, Primatesta P, Rodríguez-Artalejo F, Stegmayr B, Thamm M, Tuomilehto J, Vanuzzo D, Vescio F. Hypertension Prevalence and Blood Pressure Levels in 6 European Countries, Canada, and the United States. *JAMA*. 2003;289:2363-2369.

<sup>2</sup> Staessen JA, Wang J, Bianchi G, Birkenhäger WH. Essential Hypertension. *Lancet*. 2003;361:1629-1641.

<sup>3</sup> Carretero OA, Oparil S. Essential Hypertension. Part I: Definition and Etiology. *Circulation*. 2000;101:329-335.

<sup>4</sup> Ward R. Familial aggregation and genetic epidemiology of blood pressure. In Laragh JH and Brenner BM (eds). *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management*. Raven Press, New York, 1995; pp. 67-88.

<sup>5</sup> Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, Grassi G, Heagerty AM, Kjeldsen SE, Laurent S, Narkiewicz K, Ruilope L, Rynkiewicz A, Schmieder RE, Boudier HA, Zanchetti A, Vahanian A, Camm J, De Caterina R, Dean V, Dickstein K, Filippatos G, Funck-Brentano C, Hellemans I, Kristensen SD, McGregor K, Sechtem U, Silber S, Tendera M, Widimsky P, Zamorano JL, Erdine S, Kiowski W, Agabiti-Rosei E, Ambrosioni E, Lindholm LH, Viigimaa M, Adamopoulos S, Agabiti-Rosei E, Ambrosioni E, Bertomeu V, Clement D, Erdine S, Farsang C, Gaita D, Lip G, Mallion JM, Manolis AJ, Nilsson PM, O'Brien E, Ponikowski P, Redon J, Ruschitzka F, Tamargo J, van Zwieten P, Waeber B, Williams B; Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension; European Society of Cardiology. 2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens*. 2007;25(6):1105-87.

<sup>6</sup> Mancia G, Laurent S, Agabiti-Rosei E, Ambrosioni E, Burnier M, Caulfield MJ, Cifkova R, Clément D, Coca A, Dominiczak A, Erdine S, Fagard R, Farsang C, Grassi G, Haller H, Heagerty A, Kjeldsen SE, Kiowski W, Mallion JM, Manolis A, Narkiewicz K, Nilsson P, Olsen MH, Rahn KH, Redon J, Rodicio J, Ruilope L, Schmieder RE, Struijker-Boudier HA, Van Zwieten

---

PA, Viigimaa M, Zanchetti A. Reappraisal of European guidelines on hypertension management: a European Society of Hypertension Task Force document. *Blood Press.* 2009;18(6):308-47.

<sup>7</sup> Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension.* 2003;42:1206-1252.

<sup>8</sup> Wang Y, Wang QJ. The prevalence of prehypertension and hypertension among US adults according to the new joint national committee guidelines: New challenges of the old problem. *Arch Intern Med.* 2004;164:2126-2134.

<sup>9</sup> Schunkert H. Pharmacotherapy for prehypertension-mission accomplished? *N Engl J Med.* 2006;354(16):1742-4.

<sup>10</sup> Luft FC. Molecular genetics of human hypertension. *J Hypertens.* 1998;16:1871-1878.

<sup>11</sup> Lifton RP, Dluhy RG, Powers M, Rich GM, Cook S, Ulick S, Lalouel JM. A chimaeric 11beta-hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension. *Nature.* 1992;355:262-265.

<sup>12</sup> Mune T, Rogerson FM, Nikkilä H, Agarwal AK, White PC. Human hypertension caused by mutations in the kidney isozyme of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Nat Genet.* 1995;10:394-399.

<sup>13</sup> Ulick S, Levine LS, Gunczler P, Zanconato G, Ramirez LC, Rauh W, Rosler A, Bradlow HL, New MI. A syndrome of apparent mineralocorticoid excess associated with defects in the peripheral metabolism of cortisol. *J Clin Endocrinol Metab.* 1979;49:757-764.

<sup>14</sup> Shimkets RA, Warnock DG, Bositis CM, Nelson-Williams C, Hansson JH, Schambelan M, Gill JR Jr., Ulick S, Milora RV, Findling JW, Canessa CM, Rossier BC, Lifton RP. Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the beta subunit of the epithelial sodium channel. *Cell.* 1994;79:407-414.

<sup>15</sup> Hansson JH, Schild L, Lu Y, Wilson TA, Gautschi I, Shimkets R, Nelson-Williams C, Rossier BC, Lifton RP. A *de novo* missense mutation of the beta subunit of the epithelial sodium



---

channel causes hypertension and Liddle's syndrome, identifying a proline-rich segment critical for regulation of channel activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:11495-11499.

<sup>16</sup> Schuster H, Wienker TE, Bähring S, Bilginturan N, Toka HR, Neitzel H, Jeschke E, Toka O, Gilbert D, Lowe A, Ott J, Haller H, Luft FC. Severe autosomal dominant hypertension and brachydactyly in a unique Turkish kindred maps to human chromosome 12. *Nat Genet*. 1996;13:98-100.

<sup>17</sup> Lander ES, Schork NJ. Genetic dissection of complex traits. *Science*. 1994;265:2037-2048.

<sup>18</sup> Lifton RP. Molecular genetics of human blood pressure variation. *Science*. 1996;272:676-680.

<sup>19</sup> Lifton RP. Genetic determinants of human hypertension. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:8545-8551.

<sup>20</sup> Haynes WG, Webb DJ. Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease. *J Hypertens*. 1998;16:1081-1098.

<sup>21</sup> Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 1988;332:411-415.

<sup>22</sup> Yanagisawa M, Masaki T. Molecular biology and biochemistry of the endothelins. *Trends Pharmacol Sci*. 1989;10:374-378.

<sup>23</sup> Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; 86:2863-2867.

<sup>24</sup> Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and Expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature*. 1990;348:730-732.

- 
- <sup>25</sup> Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, Masaki T. Cloning of a cDNA encoding a nonisopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature*. 1990;348:732-735.
- <sup>26</sup> Sakamoto A, Yanagisawa M, Sakurai T, Takuwa Y, Yanagisawa H, Masaki T. Cloning and functional expression of human cDNA for the ET<sub>B</sub> endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;178:656-663.
- <sup>27</sup> Ogawa Y, Nakao K, Arai H, Nakagawa O, Hosoda K, Suga S, Nakanishi S, Imura H. Molecular cloning of a non-isopeptide-selective human endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;178:248-255.
- <sup>28</sup> Kimura S, Kasuya Y, Sawamura T, Shinmi O, Sugita Y, Yanagisawa M, Goto K, Masaki T. Structure-activity relationships of endothelin: importance of the C- terminal moiety. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988;156:1182-1186.
- <sup>29</sup> Seo B, Oemar BS, Siebenmann R, von Segesser L, Lüscher TF. Both ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors mediate contraction to endothelin-1 in human blood vessels. *Circulation*. 1994;89:1203-1208.
- <sup>30</sup> Alberts GF, Peifley KA, Johns A, Kleha JF, Winkles JA. Constitutive endothelin-1 overexpression promotes smooth muscle cell proliferation via an external autocrine loop. *J Biol Chem*. 1994;269:10112-10118.
- <sup>31</sup> Hirata Y, Takagi Y, Fukuda Y, Marumo F. Endothelin is a potent mitogen for rat vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 1989;78:225-228.
- <sup>32</sup> Ito H, Hirata Y, Hiroe M, Tsujino M, Adachi S, Takamoto T, Nitta M, Taniguchi K, Marumo F. Endothelin-1 induces hypertrophy with enhanced expression of muscle-specific genes in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res*. 1991;69:209-215.
- <sup>33</sup> Badr KF, Murray JJ, Breyer MD, Takahashi K, Inagami T, Harris RC. Mesangial cell, glomerular and renal vascular responses to endothelin in the rat kidney. Elucidation of signal transduction pathways. *J Clin Invest*. 1989;83:336-342.

- 
- <sup>34</sup> Ishikawa T, Yanagisawa M, Kimura S, Goto K, Masaki T. Positive chronotropic effects of endothelin, a novel endothelium-derived vasoconstrictor peptide. *Pflugers Arch.* 1988;413:108-110.
- <sup>35</sup> Ishikawa T, Yanagisawa M, Kimura S, Goto K, Masaki T. Positive inotropic action of novel vasoconstrictor peptide endothelin on guinea pig atria. *Am J Physiol.* 1988;255:H970-H973.
- <sup>36</sup> Lopez-Farre A, Montanes I, Millas I, Lopez-Novoa JM. Effect of endothelin on renal function in rats. *Eur J Pharmacol.* 1989;163:187-189.
- <sup>37</sup> Maguire JJ, Kuc RE, O'Reilly G, Davenport AP. Vasoconstrictor endothelin receptors characterized in human renal artery and vein in vitro. *Br J Pharmacol.* 1994;113:49-54.
- <sup>38</sup> Haynes WG, Webb DJ. Contribution of endogenous generation of endothelin-1 to basal vascular tone. *Lancet.* 1994;344:852-854.
- <sup>39</sup> Webb DJ. Endogenous endothelin generation maintains vascular tone in humans. *J Hum Hypertens.* 1995;9:459-463.
- <sup>40</sup> Haynes WG, Ferro CJ, O'Kane KPJ, Somerville D, Lomax CC, Webb DJ. Systemic endothelin receptor blockade decreases peripheral vascular resistance and blood pressure in humans. *Circulation.* 1996;93:1860-1870.
- <sup>41</sup> Schiffrin EL, Intengan HD, Thibault G, Touyz RM. Clinical significance of endothelin in cardiovascular disease. *Curr Opin Cardiol.* 1997;12:354-367.
- <sup>42</sup> Letizia C, Cerci S, De Toma G, D'Ambrosio C, De Ciocchis A, Coassin S, Scavo D. High plasma endothelin-1 levels in hypertensive patients with low-renin essential hypertension. *J Hum Hypertens.* 1997;11:447-451.
- <sup>43</sup> Cassone R, Moroni C, Parlapiano C, Bondanini F, Blefari T, Affricano C. Endothelin-1 plasma levels in essential hypertension: increased levels with coronary artery disease. *Am Heart J.* 1996;132:1048-1049.

- 
- <sup>44</sup> Ferri C, Bellini C, Desideri G, Mazzocchi C, De Sisti L, Santucci A. Elevated plasma and urinary endothelin-1 levels in human salt-sensitive hypertension. *Clin Sci (Lond.)*. 1997;93:35-41.
- <sup>45</sup> Kaasjager KA, Koomans HA, Rabelink TJ. Endothelin-1-induced vasopressor responses in essential hypertension. *Hypertension*. 1997;30:15-21.
- <sup>46</sup> Barnes K, Brown C, Turner AJ. Endothelin-converting enzyme: Ultrastructural localization and its recycling from the cell surface. *Hypertension*. 1998;31:3-9.
- <sup>47</sup> Xu D, Emoto N, Giaid A, Slaughter C, Kaw S, deWit D, Yanagisawa M. ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell*. 1994;78:473-485.
- <sup>48</sup> Korth P, Bohle RM, Corvol P, Pinet F. Cellular distribution of endothelin-converting enzyme-1 in human tissues. *J Histochem Cytochem*. 1999;47:447-461.
- <sup>49</sup> Emoto N, Yanagisawa M. Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J Biol Chem*. 1995;270:15262-15268.
- <sup>50</sup> Yanagisawa H, Yanagisawa M, Kapur RP, Richardson JA, Williams SC, Clouthier DE, de Witt D, Emoto N, Hammer RE. Dual genetic pathways of endothelin-mediated intercellular signaling revealed by targeted disruption of endothelin converting enzyme-1 gene. *Development*. 1998;125:825-836.
- <sup>51</sup> Ihling C, Szombathy T, Bohrmann B, Brockhaus M, Schaefer HE, Loeffler BM. Coexpression of endothelin-converting enzyme-1 and endothelin-1 in different stages of human atherosclerosis. *Circulation*. 2002;104:864-869.
- <sup>52</sup> Seneri GG, Cecioni I, Vanni S, Paniccchia R, Bandinelli B, Vetere A, Janming X, Bertolozzi I, Boddi M, Lisi GF, Sani G, Modesti PA. Selective upregulation of cardiac endothelin system in patients with ischemic but not idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circ Res*. 2000;86:377-385.

- 
- <sup>53</sup> Shimada K, Matsushita Y, Wakabayashi K, Takahashi M, Matsubara A, Iijima Y, Tanzawa K. Cloning and functional expression of human endothelin-converting enzyme cDNA. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;207:807-812.
- <sup>54</sup> Schmidt M, Kroger B, Jacob E, Seulberger H, Subkowski T, Otter R, Meyer T, Schmalzing G, Hillen H. Molecular characterization of human and bovine endothelin-converting enzyme (ECE-1). *FEBS Lett*. 1994;356:238-243.
- <sup>55</sup> Schweizer A, Valdenaire O, Nelböck P, Deuschle U, Dumas Milne Edwards JB, Stumpf JG, Loeffler BM. Human endothelin-converting enzyme (ECE-1): three isoforms with distinct subcellular localizations. *Biochem J*. 1997;328:871-877.
- <sup>56</sup> Valdenaire O, Lepailleur-Enouf D, Egidy G, Thouard A, Barret A, Vranckx R, Tougard C, Michel JB. A fourth isoform of endothelin-converting enzyme (ECE-1) is generated from an additional promotor. *Eur J Biochem*. 1999;264:341-349.
- <sup>57</sup> Orzechowski HD, Richter CM, Funke-Kaiser H, Kroger B, Schmidt M, Menzel S, Bohne-meier H, Paul M. Evidence of alternative promoters directing isoform-specific expression of human endothelin-converting enzyme-1 mRNA in cultured endothelial cells. *J Mol Med*. 1997;75:512-521.
- <sup>58</sup> Funke-Kaiser H, Bolbrinker J, Theis S, Lemmer J, Richter CM, Paul M, Orzechowski HD. Characterization of the c-specific promotor of the gene encoding human endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1). *FEBS Lett*. 2000;466:310-316.
- <sup>59</sup> Valdenaire O, Rohrbacher E, Mattei MG. Organization of the gene encoding the human endothelin-converting enzyme (ECE-1). *J Biol Chem*. 1995;270:29794-29798.
- <sup>60</sup> Albertin G, Rossi GP, Majone F, Tiso N, Mattara A, Danieli GA, Pessina AC, Palu G. Fine mapping of the human endothelin-converting enzyme gene by fluorescent *in situ* hybridisation and radiation hybrids. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;221:682-687.
- <sup>61</sup> Shimada K, Takahashi M, Ikeda M, Tanzawa K. Identification and characterization of two isoforms of an endothelin-converting enzyme-1. *FEBS Lett*. 1995;371:140-144.

- 
- <sup>62</sup> Verdecchia P, Clement D, Fagard R, Palatini P, Parati G. Blood pressure monitoring. Task force III: Target-organ damage, morbidity and mortality. *Blood Press Monit.* 1999;4:303-317.
- <sup>63</sup> Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51:263-273.
- <sup>64</sup> Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86:2766-2770.
- <sup>65</sup> Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977;74:5463-5467.
- <sup>66</sup> Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature.* 1986;324:163-166.
- <sup>67</sup> Garnier-Gere P, Dillmann C. A computer program for testing pairwise linkage disequilibria in subdivided populations. *J Hered.* 1992;83:239.
- <sup>68</sup> Lynch M, Walsh B. *Genetics and Analysis of Quantitative Traits.* Sinauer, Sunderland, 1998; pp. 60-61.
- <sup>69</sup> Rohde K, Fuerst R. Haplotyping and estimation of haplotype frequencies for closely linked biallelic multilocus genetic phenotypes including nuclear family information. *Hum Mutat.* 2001;17:289-295.
- <sup>70</sup> Edgell CJ, McDonald CC, Graham JB. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983;80:3734-3737.
- <sup>71</sup> Schreiber E, Matthias P, Müller MM, Schaffner W. Rapid detection of octamer binding proteins with „mini-extracts“, prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* 1989;17:6419.

- 
- <sup>72</sup> Heinemeyer T, Chen X, Karas H, Kel AE, Kel OV, Liebich I, Meinhardt T, Reuter I, Schacherer F, Wingender E. Expanding the TRANSFAC database towards an expert system of regulatory molecular mechanisms. *Nucl Acids Res.* 1999;27:318-322.
- <sup>73</sup> Tiret L, Poirier O, Nicaud V, Barbaux S, Herrmann SM, Perret C, Raoux S, Francomme C, Lebard G, Tregouet D, Cambien F. Heterogeneity of linkage disequilibrium in human genes has implications for association studies of common diseases. *Hum Mol Genet.* 2002;11:419-429.
- <sup>74</sup> Cambien F, Poirier O, Nicaud V, Herrmann SM, Mallet C, Ricard S, Behague I, Hallet V, Blanc H, Loukaci V, Thillet J, Evans A, Ruidavets JB, Arveiler D, Luc G, Tiret L. Sequence diversity in 36 candidate genes for cardiovascular disorders. *Am J Hum Genet.* 1999;65:183-191.
- <sup>75</sup> Radin MJ, Holycross BJ, Sharkey LC, Shiry L, McCune SA. Gender modulates activation of renin-angiotensin and endothelin system in hypertension and heart failure. *J Appl Physiol.* 2002;92:935-940.
- <sup>76</sup> Dubey RK, Jackson EK, Keller PJ, Imthurn B, Rosselli M. Estradiol metabolites inhibit endothelin synthesis by an estrogen receptor-independent mechanism. *Hypertension.* 2001;37:640-644.
- <sup>77</sup> Webb CM, Ghatei MA, McNeill JG, Collins P. 17beta-estradiol decreases endothelin-1 levels in the coronary circulation of postmenopausal woman with coronary artery disease. *Circulation.* 2000;102:1617-1622.
- <sup>78</sup> Funalot B, Courbon D, Brousseau T, Poirier O, Berr C, Cambien F, Amouyel P, Schwartz JC, Ducimetière P. Genes encoding endothelin-converting enzyme-1 and endothelin-1 interact to influence blood pressure in women: the EVA study. *J Hypertens.* 2004;22:675-676.
- <sup>79</sup> Polderman KH, Stehouwer CD, van Kamp GJ, Dekker GA, Verheugt FW, Gooren LJ. Influence of sex hormones on plasma endothelin levels. *Ann Intern Med.* 1993;118:429-432.
- <sup>80</sup> Wagner OF, Christ G, Wojta Johann, Vierhapper H, Parzer S, Nowotny PJ, Schneider B, Waldhäusl W, Binder BR. Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *J Biol Chem.* 1992;267:16066-16068.

- 
- <sup>81</sup> Benigni A, Remuzzi G. Endothelin antagonists. *Lancet*. 1999;353:133-138.
- <sup>82</sup> Pinto-Sietsma SJ, Paul M. A role for endothelin in the pathogenesis of hypertension: fact or fiction? *Kidney Int*. 1998;54:115-121.
- <sup>83</sup> Garipey CE, Ohuchi T, Williams SC, Richardson JA, Yanagisawa M. Salt-sensitive hypertension in endothelin-B receptor-deficient rats. *J Clin Invest*. 2000;105:925-933.
- <sup>84</sup> Gilmore ES, Stutts MJ, Milgram SL. SRC family kinases mediate epithelial Na<sup>+</sup> channel inhibition by endothelin. *J Biol Chem*. 2001;276:42610-42617.
- <sup>85</sup> Vanni S, Polidori G, Cecioni I, Serni S, Carini M, Modesti PA. ET(B) receptor in renal medulla is enhanced by local sodium during low salt intake. *Hypertension*. 2002;40:179-185.
- <sup>86</sup> Levy N, Gordin M, Mamluk R, Yanagisawa M, Smith MF, Hampton JH, Meidan R. Distinct cellular localization and regulation of endothelin-1 and endothelin-converting enzyme-1 expression in the bovine corpus luteum: implications for luteolysis. *Endocrinology*. 2001;142:5254-5260.
- <sup>87</sup> Lazurova I, Wagnerova H, Trejbal D, Olexa P, Ondic O, Petrovicova J, Kovacova A, Mitro P. A study of the renal sodium excretion during the normal menstrual cycle using method of passiv leg rising. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 1999;107:198-202.
- <sup>88</sup> Bisson DL, Dunster GD, O'Hare JP, Hampton D, Penney MD. Renal sodium retention does not occur during the luteal phase of the menstrual cycle in normal women. *Br J Obstet Gynaecol*. 1992;99:247-252.
- <sup>89</sup> Mastrogiannis DS, O'Brien WF, Krammer J, Benoit R. Potential role of endothelin-1 in normal and hypertensive pregnancies. *Am J Obstet Gynecol*. 1991;165:1711-1716.
- <sup>90</sup> Florijn KW, Derkx FH, Visser W, Hofman JA, Rosmalen FM, Wallenburg HC, Schalekamp MA. Plasma immunoreactive endothelin-1 in pregnant women with and without pre-eclampsia. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1991;17:446-448.



- 
- <sup>91</sup> Nishikawa S, Miyamoto A, Yamamoto H, Ohsika H, Kudo R. Preeclamptic serum enhances endothelin-converting enzyme expression in cultured endothelial cells. *Am J Hypertens.* 2001;14:77-83.
- <sup>92</sup> Grubbs AL, Anstadt MP, Ergul A. Saphenous vein endothelin system expression and activity in african american patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1122-1127.
- <sup>93</sup> Charron F, Nemer M. GATA transcription factors and cardiac development. *Semin Cell Dev Biol.* 1999;10:85-91.
- <sup>94</sup> Simon MC. Gotta have GATA. *Nat Genet.* 1995;11:9-11.
- <sup>95</sup> Lee ME, Temizer DH, Clifford Ja, Quertermous T. Cloning of the GATA-binding protein that regulates endothelin-1 gene expression in endothelial cells. *J Bio Chem.* 1991;266:16188-16192.
- <sup>96</sup> Trimarchi JM, Lees JA. Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3:11-20.
- <sup>97</sup> Field SJ, Tsai FY, Kuo F, Zubiaga AM, Kaelin WG Jr, Livingston DM, Orkin SH, Greenberg ME. E2F-1 functions in mice to promote apoptosis and suppress proliferation. *Cell.* 1996;85:549-561.
- <sup>98</sup> Yamasaki L, Jacks T, Bronson R, Goillot E, Harlow E, Dyson NJ. Tumor induction and tissue atrophy in mice lacking E2F-1. *Cell.* 1996;85:537-548.
- <sup>99</sup> Weinberg RA. E2F and cell proliferation: a world turned upside down. *Cell.* 1996;85:457-459.
- <sup>100</sup> Fueyo J, Gomez-Manzano C, Yung WK, Liu TJ, Alemany R, McDonnell TJ, Shi X, Rao JS, Levin VA, Kyritsis AP. Overexpression of E2F-1 in glioma triggers apoptosis and suppresses tumor growth in vitro and in vivo. *Nat Med.* 1998;4:685-690.
- <sup>101</sup> Parr MJ, Manome Y, Tanaka T, Wen P, Kufe DW, Kaelin WG Jr, Fine HA. Tumor-selective transgene expression in vivo mediated by an E2F-responsive adenoviral vector. *Nat Med.* 1997;3:1145-1149.

- 
- <sup>102</sup> Spyridopoulos I, Principe N, Krasinski KL, Xu S, Kearney M, Magner M, Isner JM, Losordo DW. Restoration of E2F expression rescues vascular endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis. *Circulation*. 1998;98:2883-2890.
- <sup>103</sup> Morishita R, Gibbons GH, Horiuchi M, Ellison KE, Nakama M, Zhang L, Kaneda Y, Ogi-hara T, Dzau VJ. A gene therapy strategy using a transcription factor decoy of the E2F binding site inhibits smooth muscle proliferation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:5855-5859.
- <sup>104</sup> Mann MJ, Whittemore AD, Donaldson MC, Belkin M, Conte MS, Polak JF, Orav EJ, Ehsan A, Dell'Acqua G, Dzau VJ. Ex-vivo gene therapy of human vascular bypass grafts with E2F decoy: the PREVENT single-centre, randomised, controlled trial. *Lancet*. 1999;354:1493-1498.
- <sup>105</sup> Diep QN, El Mabrouk M, Touyz RM, Schiffrin EL. Expression of cell cycle proteins in blood vessels of angiotensin II-infused rats: role of AT(1) receptors. *Hypertension*. 2001;37:604-608.
- <sup>106</sup> Diep QN, El Mabrouk M, Cohn JS, Endemann D, Amiri F, Viridis A, Neves MF, Schiffrin EL. Structure, endothelial function, cell growth, and inflammation in blood vessels of angiotensin II-infused rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Circulation*. 2002;105:2296-2302.
- <sup>107</sup> Hadrava V, Tremblay J, Sekaly RP, Hamet P. Accelerated entry of aortic smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats into the S phase of the cell cycle. *Biochem Cell Biol*. 1992;70:599-604.
- <sup>108</sup> Hamada M, Nishio I, Baba A, Fukuda K, Takeda J, Ura M, Hano T, Kuchii M, Masuyama Y. Enhanced DNA synthesis of cultured vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. Difference of response to growth factor, intracellular free calcium concentration and DNA synthesizing cell cycle. *Atherosclerosis*. 1990;81:191-198.
- <sup>109</sup> Sluck JM, Lin RC, Katolik LI, Jeng AY, Lehmann JC. Endothelin converting enzyme-1-, endothelin-1-, and endothelin-3-like immunoreactivity in the rat brain. *Neuroscience*. 1999;91:1483-1497.

- 
- <sup>110</sup> Eckman EA, Reed DK, Eckman CB. Degradation of the Alzheimer's amyloid beta peptide by endothelin-converting enzyme. *J Biol Chem*. 2001;276:24540-24548.
- <sup>111</sup> Shih PA, O'Connor DT. Hereditary determinants of human hypertension: strategies in the setting of genetic complexity. *Hypertension*. 2008;51:1456-1464.
- <sup>112</sup> Staessen JA, Wang JG, Brand E, Barlassina C, Birkenhäger WH, Herrmann SM, Fagard R, Tizzoni L, Bianchi G. Effects of three candidate genes on prevalence and incidence of hypertension in a Caucasian population. *J Hypertens*. 2001;19:1349-1358.
- <sup>113</sup> Kuznetsova T, Staessen JA, Thijs L, Kunath C, Olszanecka A, Ryabikov A, Tikhonoff V, Stolarz K, Bianchi G, Casiglia E, Fagard R, Brand-Herrmann SM, Kawecka-Jaszcz K, Malyutina S, Nikitin Y, Brand E. Left ventricular mass in relation to genetic variation in angiotensin II receptors, renin system genes, and sodium excretion. *Circulation*. 2004;110:2644-2650.
- <sup>114</sup> Armando I, Jezova M, Juorio AV, Terrón JA, Falcón-Neri A, Semino-Mora C, Imboden H, Saavedra JM. Estrogen upregulates renal angiotensin II AT2 receptors. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002;283:F934-F943.
- <sup>115</sup> Ozono R, Wang ZQ, Moore AF, Inagami T, Siragy HM, Carey RM. Expression of the subtype 2 angiotensin (AT2) receptor protein in rat kidney. *Hypertension*. 1997;30:1238-1246.
- <sup>116</sup> Arnett DK, Baird AE, Barkley RA, Basson CT, Boerwinkle E, Ganesh SK, Herrington DM, Hong Y, Jaquish C, McDermott DA, O'Donnell CJ. Relevance of Genetics and Genomics for Prevention and Treatment of Cardiovascular Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention, the Stroke Council, and the Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Group. *Circulation*. 2007;115:2878-2901.
- <sup>117</sup> Cambien F, Tiret L. Genetics of cardiovascular diseases: from single mutations to the whole genome. *Circulation*. 2007;116:1714-1724.
- <sup>118</sup> Hirschhorn JN, Daly MJ. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet*. 2005;6:95-108.

---

<sup>119</sup> McPherson R, Pertsemlidis A, Kavaslar N, Stewart A, Roberts R, Cox DR, Hinds DA, Pennacchio LA, Tybjaerg-Hansen A, Folsom AR, Boerwinkle E, Hobbs HH, Cohen JC. A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Science*. 2007;316:1488-1491.

<sup>120</sup> Helgadottir A, Thorleifsson G, Manolescu A, Gretarsdottir S, Blondal T, Jonasdottir A, Sigurdsson A, Baker A, Palsson A, Masson G, Gudbjartsson D, Magnusson KP, Andersen K, Levey AI, Backman VM, Matthiasdottir S, Jonsdottir T, Palsson S, Einarsdottir H, Gunnarsdottir S, Gylfason A, Vaccarino V, Hooper WC, Reilly MP, Granger CB, Austin H, Rader DJ, Shah SH, Quyyumi AA, Gulcher JR, Thorgeirsson G, Thorsteinsdottir U, Kong A, Stefansson K. A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. *Science*. 2007;316:1491-1493.

<sup>121</sup> The Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. 2007;447:661-678.

<sup>122</sup> Newton-Cheh C, Johnson T, Gateva V, Tobin MD, Bochud M, Coin L, Najjar SS, Zhao JH, Heath SC, Eyheramendy S, Papadakis K, Voight BF, Scott LJ, Zhang F, Farrall M, Tanaka T, Wallace C, Chambers JC, Khaw KT, Nilsson P, van der Harst P, Polidoro S, Grobbee DE, Onland-Moret NC, Bots ML, Wain LV, Elliott KS, Teumer A, Luan J, Lucas G, Kuusisto J, Burton PR, Hadley D, McArdle WL; Wellcome Trust Case Control Consortium, Brown M, Dominiczak A, Newhouse SJ, Samani NJ, Webster J, Zeggini E, Beckmann JS, Bergmann S, Lim N, Song K, Vollenweider P, Waeber G, Waterworth DM, Yuan X, Groop L, Orholm-Melander M, Allione A, Di Gregorio A, Guarrera S, Panico S, Ricceri F, Romanazzi V, Sacerdote C, Vineis P, Barroso I, Sandhu MS, Luben RN, Crawford GJ, Jousilahti P, Perola M, Boehnke M, Bonnycastle LL, Collins FS, Jackson AU, Mohlke KL, Stringham HM, Valle TT, Willer CJ, Bergman RN, Morken MA, Döring A, Gieger C, Illig T, Meitinger T, Org E, Pfeufer A, Wichmann HE, Kathiresan S, Marrugat J, O'Donnell CJ, Schwartz SM, Siscovick DS, Subirana I, Freimer NB, Hartikainen AL, McCarthy MI, O'Reilly PF, Peltonen L, Pouta A, de Jong PE, Snieder H, van Gilst WH, Clarke R, Goel A, Hamsten A, Peden JF, Seedorf U, Syvänen AC, Tognoni G, Lakatta EG, Sanna S, Scheet P, Schlessinger D, Scuteri A, Dörr M, Ernst F, Felix SB, Homuth G, Lorbeer R, Reffelmann T, Rettig R, Völker U, Galan P, Gut IG, Hercberg S, Lathrop GM, Zelenika D, Deloukas P, Soranzo N, Williams FM, Zhai G, Salomaa V, Laakso M, Elosua R, Forouhi NG, Völzke H, Uiterwaal CS, van der Schouw YT, Numans ME, Matullo G, Navis G, Berglund G, Bingham SA, Kooner JS, Connell JM, Bandinelli S, Ferrucci L, Watkins H, Spector TD, Tuomilehto J, Altshuler D, Strachan DP, Laan M, Me-

---

neton P, Wareham NJ, Uda M, Jarvelin MR, Mooser V, Melander O, Loos RJ, Elliott P, Abecasis GR, Caulfield M, Munroe PB. Genome-wide association study identifies eight loci associated with blood pressure. *Nat Genet.* 2009;41:666-676.]

<sup>123</sup> Sham P, Bader JS, Craig I, O'Donovan M, Owen M. DNA Pooling: a tool for large-scale association studies. *Nat Rev Genet.* 2002;3:862-871.

## **8 Anhang**

Chemikalien

Danksagung

Curriculum Vitae

Eigene Veröffentlichungen/Kongressbeiträge

Selbständigkeitserklärung

## Chemikalien

$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ )	Amersham, Little Chalfont, UK
Acryl-40-Solution	Amresco, Solon, Ohio, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Amresco, Solon, Ohio, USA
Bis-2-Solution	Amresco, Solon, Ohio, USA
Borsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg, Deutschland
Complete	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)	Rapidozym, Berlin, Deutschland
DTT	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland
EGTA	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland
Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure (100%)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol (absolut)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid (1%ige Lösung in Wasser)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Firefly-Reporterplasmid	PromegaCorporation, Madison, USA
Formaldehyd (37%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Formamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Fugene-6-Transfektionsreagenz	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland
Glycerol (99%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
HEPES-KOH	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland
IGEPAL CA-630	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
KCl	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland
$\text{KHCO}_3$	Merck, Darmstadt, Deutschland
$\text{Na}_2\text{PO}$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

---

Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natronlauge	Merck, Darmstadt, Deutschland
NH <sub>4</sub> Cl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Passive Lysis Buffer	PromegaCorporation, Madison, USA
PBS-Puffer (PBS-Dulbecco 1x)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Poly[d(I-C)]	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland
Polyethylenglykol (PEG) 8000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
pRL-null Vector	PromegaCorporation, Madison, USA
QIAamp blood kit	Quiagen, Hilden, Deutschland
Salpetersäure (65%)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Seakem ME Agarose	FMC BioProducts, Rockland, ME, USA
Silbernitrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Rapidozym, Berlin, Deutschland
SSC	GibcoBRL, Paisley, Scotland
T4-Polynukleotidkinase (10 U/μl)	Promega Corporation, Madison, USA
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Amresco, Solon, Ohio, USA
Thermoprime Plus DNA Polymerase (5 U/μl)	Advanced Biotechnologies, Epsom, GB
Tris-Base (Trishydroxymethylaminomethan)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris-Glycin	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland
Tris-HCl	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland
Xylencyanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Zitronensäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland



## Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Dr. Eva Brand für die Überlassung des Themas und die immer freundliche, zusprechende und ausdauernde Betreuung bei der Durchführung der Arbeit. Ich bedanke mich neben der Einarbeitung in die wissenschaftliche und laborspezifische Arbeitsweise insbesondere für ein stets offenes Ohr für wissenschaftliche Fragen und nicht zu vergessen auch für persönliche Momente.

Ein herzlicher Dank geht auch an Prof. Dr. Arya Sharma für die Aufnahme in seine damalige Forschungsgruppe am Universitätsklinikum Benjamin Franklin. Ein ebenso herzlicher Dank geht an Prof. Dr. Walter Zidek für das Fortführen der Forschungsgruppe.

Einen besonderen Dank möchte ich Dr. Jens Ringel aussprechen, der mich in der Anfangszeit in die Laborarbeit einwies.

Ganz besonders danke ich Frau Brigitte Egbers und Herrn Klaus Schlotter für die stete Bereitschaft bei der Unterstützung im technischen und laborspezifischen Bereich sowie für die aufmunternden privaten Gespräche.

Besonders bedanken möchte ich mich für die fruchtbare Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Martin Paul und seinen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe um Dr. Hans-Dieter Orzechowski. Ein spezieller Dank gilt dabei Dr. Heiko Funke-Kaiser für die kollegiale und bereichernde wissenschaftliche Zusammenarbeit.

Einen aufrichtigen Dank schulde ich der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Dr. Stefan-Martin Brand-Herrmann für die zur Verfügung gestellten Laborarbeitsplätzen und nicht zu vergessen für das damit verbundene Einweisen in spezifische molekulargenetische Techniken. Dabei möchte ich Dr. Jacqueline Schönfelder und Klaus Schmidt-Petersen speziell für die ein oder andere „Überstunde“ danken.

Für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der erhobenen Daten möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. Karla Köpke bedanken.

Speziell möchte ich mich bei meiner Frau Franziska Reichenberger für das Beiseitestehen während des Schreibens dieser Arbeit bedanken.

## **Curriculum Vitae**

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

## Eigene Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

### Eigene Veröffentlichungen

1. Funke-Kaiser H, Reichenberger F, Köpke K, Herrmann SM, Pfeifer J, Orzechowski HD, Zidek W, Paul M, Brand E. Differential binding of transcription factor E2F-2 to the endothelin-converting enzyme-1b promoter affects blood pressure regulation. *Hum Mol Genet.* 2003;12:423-433.
2. Brand-Herrmann SM, Köpke K, Reichenberger F, Schmidt-Petersen K, Reineke T, Paul M, Zidek W, Brand E. Angiotensinogen promoter haplotypes are associated with blood pressure in untreated hypertensives. *J Hypertens.* 2004;22:1289-1297.

### Kongressbeiträge

Reichenberger F, Ringel J, Brand E. Haplotype analysis of angiotensinogen polymorphisms in human essential hypertension. International Symposium on Cardiovascular Disorders, Genetic and Molecular Mechanisms. Positano 3-6 June 2000. *J Mol Med.* 2000;78:21.

Funke-Kaiser H, Reichenberger F, Köpke K, Herrmann SM, Pfeifer J, Orzechowski HD, Zidek W, Paul M, Brand E. Blood pressure is regulated by differential binding of transcription factor E2F-2 to the endothelin-converting enzyme-1b promoter. 27. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Liga zur Bekämpfung des Hochdrucks/Deutsche Hypertoniegesellschaft, Bonn 26.-29. November 2003.

Herrmann SM, Funke-Kaiser H, Reichenberger F, Köpke K, Schönfelder J, Orzechowski HD, Zidek W; Paul M, Brand E. Allel-dependent binding of transcription factor E2F-2 to the endothelin-converting enzyme-1b promoter affects blood pressure phenotypes. 45. Frühjahrstagung der deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz 09.-11. März 2004. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 2004.

Herrmann SM, Reichenberger F, Köpke K, Schmidt-Petersen K, Paul M, Zidek W, Brand E. Angiotensinogen promoter haplotypes are associated with blood pressure in untreated hypertensives. 70. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung, Mannheim 15.-17. April 2004.

Herrmann SM, Funke-Kaiser H, Reichenberger F, Köpke K, Pfeifer J, Orzechowski HD, Zidek W, Paul M, Brand E. Differential binding of transcription factor E2F-2 to the endothelin-converting enzyme-1b promoter affects blood pressure regulation. 70. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung, Mannheim 15.-17. April 2004.

Herrmann SM, Reichenberger F, Köpke K, Schmidt-Petersen K, Reineke T, Paul M, Zidek W, Brand E. Role of angiotensinogen promoter haplotypes for blood pressure regulation. Fourteenth European Meeting on Hypertension, European Society of Hypertension (ESH), Paris, France 13-17 June 2004. *J Hypertens.* 2004;22(2):76.

Brand-Herrmann SM, Funke-Kaiser H, Reichenberger F, Köpke K, Schönfelder J, Orzechowski HD, Zidek W, Paul M, Brand E. Allel-abhängige Bindung des Transkriptionsfaktors E2F-2 am Endothelin-Converting Enzyme-1b Promotor beeinflusst Blutdruck-Phänotypen. Kongress für Nephrologie, 35. Kongress der Gesellschaft für Nephrologie, 37. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für Klinische Nephrologie, 36. Jahresversammlung der Schweizerischen Gesellschaft für Nephrologie, Basel (Schweiz) 18.-21. September 2004.

Schmidt-Petersen K, Brand-Herrmann SM, Reichenberger F, Köpke K, Reineke T, Paul M, Zidek W, Brand E. Angiotensinogen (AGT) promoter haplotypes are associated with blood pressure in untreated hypertensives. Assoziation von Angiotensinogen (AGT)-Promotor-Haplotypen mit Blutdruck bei unbehandelten Hypertonikern. 28. wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Hochdruckliga, Hannover 24.-27. November 2004.

## **Selbständigkeitserklärung**

„Ich, Florian Reichenberger, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Rolle des Endothelin-Konversion-Enzym-Gens in der genetischen Prädisposition der essentiellen Hypertonie“ 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.“

Cottbus, 25.04.2010

Florian Reichenberger