

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Genetische Assoziation des Melatoninrezeptors mit der
kardialen Funktion bei Patienten mit arterieller Hypertonie

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christopher Teichmann

aus Berlin

Datum der Promotion: 14.02.2014

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1 ABSTRAKT..... | 4 |
| 2 EINLEITUNG..... | 10 |
| 2.1 Melatonin..... | 10 |
| 2.1.1 Geschichte, Biochemie und zirkadiane Rhythmik..... | 10 |
| 2.1.2 Funktionen von Melatonin..... | 12 |
| 2.1.3. Melatonin und kardiovaskuläres System..... | 13 |
| 2.2 Melatoninrezeptoren..... | 15 |
| 2.2.1 Struktur und Klassifikation..... | 15 |
| 2.2.2 Vorkommen..... | 16 |
| 2.2.3 Signaltransduktion..... | 17 |
| 2.2.4 Pharmakologie..... | 19 |
| 2.3 Melatoninrezeptoren und kardiovaskuläres System..... | 21 |
| 2.4 Melatoninrezeptoren und Diabetes mellitus Typ II..... | 22 |
| 2.5 Fragestellung..... | 23 |
| 3 MATERIAL UND METHODEN..... | 24 |
| 3.1 Studienpopulation..... | 24 |
| 3.2 Blutdruckmessung..... | 25 |
| 3.3 Echokardiographie..... | 25 |
| 3.4 Vorbereitende Maßnahmen zur Genotypisierung..... | 26 |
| 3.4.1 Konzentrationsmessung..... | 26 |
| 3.4.2 Ausplattieren der DNA..... | 28 |
| 3.5 Auswahl der verwendeten SNPs..... | 29 |
| 3.6 Genotypisierung..... | 29 |
| 3.6.1 Polymerase-Kettenreaktion..... | 29 |

| | |
|--|-----------|
| 3.6.2 Real-time PCR – Quantifizierung von DNA..... | 31 |
| 3.6.3 Genotypisierung von SNPs mittels Real-time PCR..... | 33 |
| 3.6.4 Praktische Durchführung der Genotypisierung mittels Real-time PCR..... | 34 |
| 3.7 Sequenzierung..... | 39 |
| 3.7.1 Didesoxymethode nach Sanger..... | 39 |
| 3.7.2 Praktische Durchführung einer Sequenzierung..... | 39 |
| 3.8 Statistische Analyse..... | 44 |
| 4 ERGEBNISSE..... | 45 |
| 4.1 Charakteristika der Studienkohorte..... | 45 |
| 4.1.1 Eigenschaften der Studienpopulation..... | 45 |
| 4.1.2 Echokardiographische Parameter in der Studienkohorte..... | 48 |
| 4.2 Genetische Analysen..... | 50 |
| 4.2.1 Haplotyp-Frequenzen..... | 50 |
| 4.2.2 Assoziationen der SNPs und Haplotypen mit der EF und dem LVMI..... | 51 |
| 4.2.3 Assoziationen der SNPs und Haplotypen mit Parametern der..... | 54 |
| 5 DISKUSSION..... | 56 |
| 6 LITERATURVERZEICHNIS..... | 64 |
| 7 LEBENSLAUF..... | 74 |
| 8 PUBLIKATIONSLISTE..... | 75 |
| 9 DANKSAGUNG..... | 76 |

1 Abstrakt (Deutsch)

Die Ausschüttung von Melatonin durch die Pinealozyten der Epiphyse unterliegt einer zirkadianen Rhythmik. So werden beim Menschen in der Nacht mit ca. 60 pg/ml ungefähr dreifach höhere Plasmaspiegel erreicht als bei Tag. Darüber hinaus wird Melatonin auch in peripheren Organen und Geweben wie dem Gefäßendothel gebildet und in das Blut abgegeben. Neben der Regulation der zirkadianen Rhythmik wirkt Melatonin auch als Radikalfänger zur Verminderung von oxidativem Stress. Der Blutdruck senkende Effekt von Melatonin konnte bereits 1978 in Tierversuchen an Ratten nachgewiesen werden, wobei eine Pinealektomie zu einer Hypertonie bei den Tieren führte, die unter Substitution mit Melatonin normalisiert wurde. Melatonin vermittelt seine Wirkungen durch direkte molekulare Interaktion und beim Menschen zusätzlich über die membranständigen Melatoninrezeptoren 1 (MT1) und 2 (MT2). Interessanterweise zeigten sich neuerdings in genetischen Studien wiederholt signifikante Assoziationen von Einzelnukleotidpolymorphismen (single nucleotide polymorphism, SNP) des MT2 Rezeptorgens *MTNR1B* mit klinischen Parametern beim Diabetes mellitus Typ II, wie z. B. den Plasmaglukosespiegeln. Vor diesem Hintergrund ergab sich, ergänzt durch die experimentellen Befunde, dass Melatonin in die Regulation von kardiovaskulären Funktionen eingreift, für die vorliegende Arbeit folgende Fragestellung: Sind die beim Diabetes als bedeutsam identifizierten SNPs von *MTNR1B* auch für weitere klinisch relevante Parameter des kardiovaskulären Systems von Bedeutung?

Hierbei sollte zunächst das Verhältnis von genetischen Varianten mit den Langzeitblutdruckwerten bestimmt werden. Da MT2 am menschlichen Herzen exprimiert ist, sollte zusätzlich untersucht werden, ob genetische Assoziationen des MT2-Rezeptors mit strukturellen und funktionellen Parametern des Herzens vorliegen.

In einer Studienpopulation von 605 an Bluthochdruck erkrankten Patienten (498 Männer, 107 Frauen, mittleres Alter $56,2 \pm 9,4$ Jahre) lagen geeignete Daten zu den demographischen und klinischen Parametern vor. Der Bluthochdruck wurde gemäß der europäischen Leitlinie behandelt. Die Patienten waren multizentrisch aus 15 verschiedenen Rehabilitationskliniken für kardiovaskuläre Erkrankungen rekrutiert

worden. Der mittlere systolische Blutdruck über 24h lag bei $126,1 \pm 14,6$ mmHg, der mittlere diastolische Blutdruck über 24h bei $76,4 \pm 9,5$ mmHg. Es zeigte sich in der Gesamtpopulation eine typische zirkadiane Rhythmik des Blutdrucks mit den höchsten Werten zwischen 6-10 Uhr vormittags (systolisch $128,6 \pm 16,1$ mmHg; diastolisch $79,4 \pm 10,6$ mmHg) und den niedrigsten Blutdruckwerten in der Nacht (systolisch $119,1 \pm 15,8$ mmHg; diastolisch $69,9 \pm 10,1$ mmHg). Mittels Echokardiographie ergab sich bei allen Patienten eine mittlere Ejektionsfraktion von $63,7 \pm 8,9\%$ und bei 38% der Patienten lag eine linksventrikuläre Hypertrophie vor.

Die Genotypen der SNPs rs10830962, rs4753426, rs12804291, rs10830963 und rs3781638 von *MTNR1B* wurden fluoreszenzbasiert mittels Real-time PCR und Sequenzierung bestimmt. Genetische Assoziationen wurden mittels multivariater Analyse unter Berücksichtigung von Kovariaten untersucht. Entsprechend der oben angegebenen Reihenfolge der SNPs ergaben sich nach statistischer Analyse zwei Haplotypen H1 (CTCCC) und H2 (GCCGA) mit entsprechenden Frequenzen von 0,402 und 0,277.

In der genetischen Analyse der einzelnen SNPs fanden sich bezüglich der mittleren Langzeitblutdruckwerte keine signifikanten Assoziationen. In der Analyse der Haplotypen wiesen Träger des Haplotyps H1 im Vergleich zu Nicht-Trägern dieses Haplotyps einen signifikant erhöhten mittleren systolischen 24h-Blutdruck auf (Blutdruckdifferenz: 2,5 mmHg, $p=0,023$). Dieser Effekt war nachts (22 bis 6 Uhr) mit einer Differenz von 2,8 mmHg noch leicht ausgeprägter ($p=0,019$).

In der genetischen Analyse der einzelnen SNPs und der Haplotypen H1 und H2 bezüglich des strukturellen kardialen Parameters LVMI ergaben sich keine signifikanten Assoziationen. In der genetischen Analyse der einzelnen SNPs bezüglich des funktionellen kardialen Parameters EF zeigten sich signifikante Resultate bezüglich der SNPs rs4753426 ($p=0,033$), rs12804291 ($p=0,021$) und rs3781638 ($p=0,011$) im kodominanten Modell. Bei der Analyse von Allelträgern im Vergleich zu Nicht-Trägern waren Träger des T-Allels bei rs4753426 und rs12804291 mit einer niedrigeren EF von 1,9% (95% CI: 0,3 bis 3,5%; $p=0,02$) bzw. 2,5% (95% CI: 0,8 bis 4,3%; $p=0,006$) und A-Allel Träger von rs3781638 mit einer niedrigeren EF von 1,8% (95% CI: -3,6 bis -0,1%; $p=0,038$) assoziiert. In der Analyse der Haplotypen zeigten Träger des Haplotyps H2 gegenüber den Nicht-Trägern dieses Haplotyps eine um 1,8% (95% CI: 0,45 bis 3,14%)

signifikant höhere mittlere Ejektionsfraktion ($p=0,009$).

Die Assoziationen, die in dieser Arbeit gefunden wurden, deuten darauf hin, dass Wirkungen des Melatonins auf das kardiovaskuläre System durch genetische Varianten im Gen des MT2-Rezeptors moduliert werden könnten. Dies könnte Auswirkungen sowohl auf den Diabetes wie auch auf die hypertensive Endorganschädigung haben. Insofern resultiert aus dieser Arbeit die interessante Fragestellung, ob die genetischen Variationen des *MTNR1B* eine physiologische Bedeutung haben für das metabolische Syndrom, welches unter anderem sowohl Diabetes als auch Bluthochdruck umfasst.

Abstract (English)

Title: Genetic association of the melatonin receptor with cardiac function in patients with arterial hypertension

submitted by Christopher Teichmann from Berlin

The production of melatonin in the pineal gland follows a circadian rhythm. In humans the plasma level is three times higher during the night (about 60 pg/ml) than during the day. Apart from the pineal gland melatonin is also produced in peripheral organs and tissues such as vascular endothelium. Melatonin enters into circulation from those organs and tissues. In addition to its function as synchronizer of the circadian rhythm melatonin is also a free radical scavenger that reduces oxidative stress. Furthermore, it has a lowering effect on blood pressure, which was first demonstrated in experiments done in rats in 1978. In that experiment a pinealectomy caused hypertension, which could be normalized by substituting melatonin artificially. The effect of melatonin is mediated by direct molecular interaction and in humans additionally by membrane-bound melatonin receptors 1 and 2 (MT1 and MT2). The results of different recent genetic studies exposed significant associations of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the MT2 receptor gene *MTNR1B* with clinical parameters of diabetes mellitus type 2, for example the plasma glucose level.

Against this background, and in addition to the experimental findings of melatonin playing a role at cardiovascular function this work focuses on the following question:

Are the SNPs of *MTNR1B* that were identified as relevant for diabetes also connected to other clinical parameters of the cardiovascular system?

First we determined if an association between genetic variants and long-term blood pressure exists. As MT2 is expressed in the human heart we investigated if there are

genetic associations of the MT2-receptor with structural and functional parameters of the heart. On the basis of our study population of 605 patients with hypertension (498 men, 107 women, median age 56.2 +/- 9.4 years) we could use already existing appropriate data concerning the demographic and clinical parameters. Hypertension was treated according to the European guideline. Patients had been recruited in a multicenter design in 15 different rehabilitation centers for cardiovascular diseases. Median systolic blood pressure was 126.1 +/- 14.6 mmHg in 24 hours, median diastolic blood pressure was 76.4 +/- 9.5 mmHg in 24 hours. In the overall population we found a typical circadian rhythm of blood pressure with the highest values between 6 and 10 o'clock in the morning (systolic 128.6 +/- 16.1 mmHg, diastolic 79.4 +/- 10.6 mmHg) and the lowest values during the night (systolic 119.1 +/- 15.8 mmHg, diastolic 69.9 +/- 10.1 mmHg). By echocardiographic measurements we found a median ejection fraction (EF) of 63.7% +/- 8.9% and a left ventricular hypertrophy (LVH) in 38% of the patients.

We determined genotypes of the SNPs rs10830962, rs4753426, rs12804291, rs10830963 and rs3781638 of *MTNR1B* with a fluorescent based real-time PCR method and sequencing. Genetic associations were investigated with multivariate analysis that takes the covariates into account. Corresponding to the order of the SNPs above after statistical analysis we found two haplotypes H1 (CTCCC) and H2 (GCCGA) with frequencies of 0,402 and 0,277 respectively.

The genetic analysis of particular SNPs revealed no significant associations with mean long-term blood pressure. In the analysis of haplotypes we detected that patients carrying haplotype H1 have a significantly higher median systolic 24h-blood pressure compared to patients not carrying this haplotype (difference: 2.5 mmHg, $p=0.023$). Furthermore, we detected that this effect is even more pronounced during the night (22h – 6h) with a difference of 2.8 mmHg ($p=0.019$).

In the genetic analysis of particular SNPs and the haplotypes H1 and H2 we found no significant associations with the structural cardiac parameter LVMI. Our genetic analysis of particular SNPs concerning the functional cardiac parameter EF exposed significant results with SNPs rs4753426 ($p=0.033$), rs12804291 ($p=0.021$) and rs3781638

($p=0.011$) in the codominant model.

Our comparison of allele carriers and non-carriers exposed a significantly lower EF in carriers of the T-allele in rs4753426 and rs12804291. The difference in EF was 1.9% (95% CI: 0.3 to 3.5%; $p=0.02$) and 2.5% (95% CI: 0.8 to 4.3%; $p=0.006$) respectively. Carriers of the A-allele in rs3781638 have a lower EF of 1.8% (95% CI: -3.6 to -0.1%; $p=0.038$).

Our analysis of haplotypes revealed a significantly higher medium EF of 1.8% (95% CI: 0.45 to 3.14%; $p=0.009$) in carriers of haplotype H2 compared to non-carriers.

The associations we found in this work indicate that effects of melatonin on the cardiovascular system could be modulated by genetic variants in the gene of the MT2-receptor. This could affect diabetes as well as hypertensive endorgan damage.

The findings of this work lead to the interesting question, if the genetic variants of *MTNR1B* bear a physiological sense for the metabolic syndrome which includes either diabetes and hypertension.

2 Einleitung

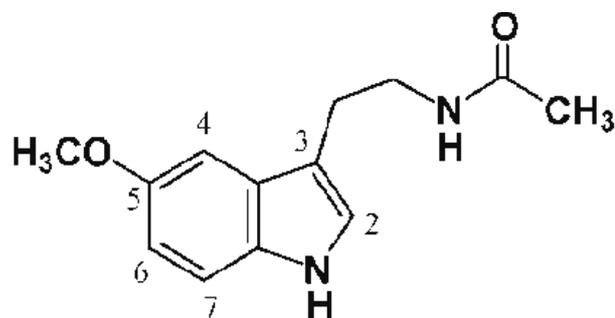
2.1 Melatonin

2.1.1 Geschichte, Biochemie und zirkadiane Rhythmik

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamin) ist ein Hormon, welches vorwiegend in der Epiphyse (=Zirbeldrüse, Corpus pineale) des Zwischenhirns und in der Retina vorkommt (1,2). Hierbei wird Melatonin in der Epiphyse von Pinealozyten, in der Retina von Photorezeptorzellen exprimiert (3,4). Daneben wurde Melatonin auch aus weiteren Geweben isoliert (5).

Ein erstes umfassendes Werk über die Zirbeldrüse entstand 1954 von Kitay und Altschule (6). Dieses wurde zum Ausgangspunkt für weitere Forschungen (7).

Erstmals wurde Melatonin 1958 von der Arbeitsgruppe um Aaron B. Lerner an der Yale University in den USA aus bovinen Zirbeldrüsen isoliert (5,8,9). Zur Synthese von Melatonin, dessen Strukturformel Abb. 1 zeigt, wird die Aminosäure Tryptophan in die Pinealozyten aufgenommen. Enzymkatalysiert entsteht über verschiedene Zwischenprodukte Melatonin (Abb. 2) (4,10). Die beiden maßgeblich an der Umsetzung von Serotonin zu Melatonin beteiligten Enzyme Arylalkylamin-5-Acetyltransferase und Hydroxyindol-O-Methyltransferase wurden erstmals 1961 von Axelrod und Mitarbeitern beschrieben (11).



Melatonin

Abb.1 Chemische Strukturformel des Melatonins (12)

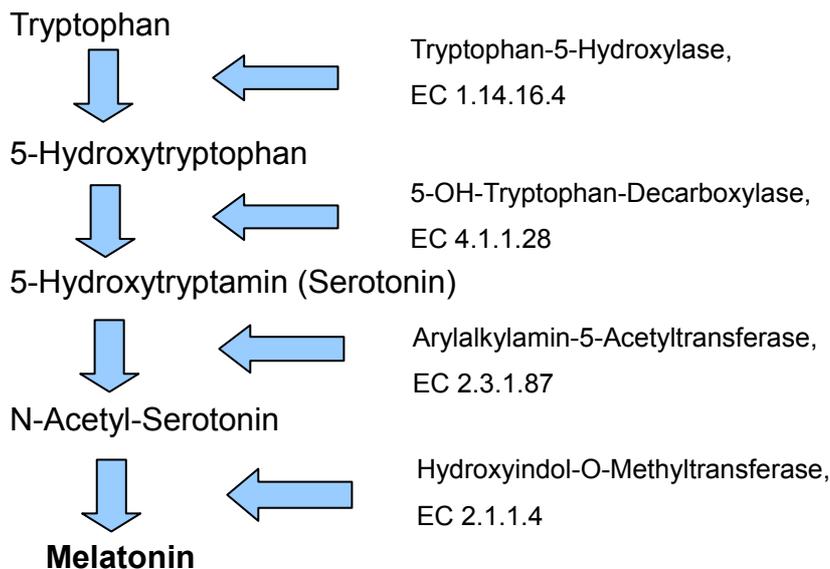


Abb. 2 Schematische Darstellung der Melatoninbiosynthese in der Epiphyse (10),
 EC entspricht der Enzymklassifikationsnummer nach BRENDA
 (BRAunschweig ENzyme DAtabase) (13)

Die Sekretion des Melatonins aus der Epiphyse erfolgt nach einer zirkadianen Rhythmik (14,15). Deswegen wird die Zirbeldrüse auch als „biologische Uhr“ bezeichnet (8). Das zirkadiane System besteht insgesamt aus drei Komponenten: den Augen, der Epiphyse und den suprachiasmatischen Kernen des Hypothalamus (2). Nachts wird vermehrt Melatonin freigesetzt (16), wobei die Melatoninfreisetzung neben der Tageszeit auch eng mit der Körperkerntemperatur zusammenhängt (10). Die Melatoninkonzentration schwankt interindividuell. So liegt die durchschnittliche Tageskonzentration von gesunden Erwachsenen bei 20 pg/ml, während der Nacht steigt der Melatoninspiegel auf durchschnittlich 60 pg/ml an. Der Höchstwert kann ungefähr um drei Uhr nachts gemessen werden (17). Bei Untersuchungen zu den durchschnittlichen Melatoninspiegeln ergaben sich Hinweise darauf, dass die Melatoninspiegel bei jüngeren Menschen höher liegen als bei älteren, wodurch dem Melatonin auch ein Anti-
 alterungseffekt zugeschrieben wird (18). Die Halbwertszeit des Melatonins liegt zwischen 10 und 60 Minuten (4). Die Freisetzung von Melatonin aus den Pinealozyten wird über

die Retina gesteuert (19), wobei Lichtreize sowohl bei Tag wie auch bei Nacht zu einer Suppression der Melatoninsekretion führen (10,20).

Über einen retinohypothalamischen Trakt gelangt die Lichtinformation zu den suprachiasmatischen Kernen im Hypothalamus. Dieser zirkadiane Schrittmacher steht ebenso mit der Epiphyse in Verbindung. Der Hypothalamus bekommt direkte Informationen aus der Netzhaut über retinale Ganglienzellen (19,21). Die Epiphyse erhält ihre Informationen über eine sympathisch noradrenerge Leitungsbahn. Die Umschaltung auf das postganglionäre Neuron findet im Ganglion cervicale superius statt. Von dort verlaufen Nervenfasern als bilaterale Nervi conarii bis ins Diencephalon, wo sie die dem Thalamus von hinten anliegende unpaare Epiphyse erreichen (20,21).

Melatoninkonzentrationen im Blut geben Aufschluss über die aktuelle Melatoninaktivität, da das Hormon nicht in den Pinealozyten gespeichert wird (3).

Abgebaut wird Melatonin zum überwiegenden Teil in der Leber über Cytochrom-P-450-Enzyme (22). Der Hauptmetabolit ist das 6-Hydroxymelatonininsulfat, welches mit dem Urin ausgeschieden wird und in diesem auch messbar ist (23,24). Vor allem der morgendliche Sammelurin gibt Aufschlüsse über die Höhe der Melatoninspiegel, da die Freisetzung von 6-Hydroxymelatonininsulfat in der Nacht am höchsten ist (22).

2.1.2 Funktionen von Melatonin

Eine Funktion des Melatonins besteht in der Induktion einer zirkadianen Rhythmik (14,15). Diese wird über das Zusammenspiel von Nucleus suprachiasmaticus mit der Epiphyse gesteuert. Melatonin nimmt an der Regulation des Schlaf-Wach-Rhythmus teil. Schlaf und die abfallende Körperkerntemperatur sind mit höheren Melatoninkonzentrationen im Blut verbunden (25). Bei Winterschläfern sind auch jahreszeitabhängige Parameter, wie die Körperkerntemperatur, das Brunstverhalten und das Fellwachstum auf die Wirkung des Melatonins zurückzuführen (3,26).

Beim Menschen wirkt das Melatonin neben der Schlafförderung auch als Radikalfänger (27). Es reduziert somit oxidativen Stress, welcher als einer der Hauptfaktoren bei der Zellalterung diskutiert wird (28).

Weiterhin wird dem Melatonin ein immunmodulatorischer Effekt zugeschrieben (29).

Das Melatonin wirkt im Zusammenspiel mit verschiedenen interzellulären Botenstoffen. Durch einen direkten Effekt auf T-Helferzellen werden diese angeregt zur Freisetzung von Zytokinen, wie zum Beispiel Interferon-Gamma und Interleukin-2. Dadurch kommt es durch die Stimulation der Immunantwort zu einer antiinflammatorischen Wirkung. Mit dem immunmodulatorischen Einfluss hängt auch eine antikanzerogene Wirkung zusammen. So wirkt Melatonin synergistisch mit antitumoralen Zytokinen. Hierbei findet auch der antioxidative Effekt des Melatonins als Radikalfänger Beachtung. Daher wird ein zukünftig vermehrter Einsatz von Melatonin in der Tumorthherapie diskutiert (29).

2.1.3. Melatonin und kardiovaskuläres System

Melatonin beeinflusst den Blutdruck und die myokardiale Kontraktilität (30). Die antioxidative Wirkung des Melatonins wirkt dabei protektiv auf das kardiovaskuläre System. Es wurden verminderte Plasmakonzentrationen von Melatonin bei verschiedenen Erkrankungen wie Bluthochdruck, Herzinsuffizienz und der ischämischen Herzkrankheit festgestellt. Patienten nach akutem Myokardinfarkt wiesen ebenfalls geringere Melatoninwerte im Plasma auf.

In einer Studie an mikrovaskulären Rattenendothelien wurde nachgewiesen, dass Melatonin die Stickstoffmonoxid (NO)-Produktion in vitro und in vivo vermindern kann (31). Das freie Radikal NO führt im Körper von Individuen zu oxidativem Stress, wirkt kanzerogen und kann durch die Bildung von Methämoglobin toxisch wirken.

An Ratten wurde nachgewiesen, dass eine Pinealektomie zu einem Anstieg des Blutdrucks bis hin zur Entwicklung einer Hypertonie führt (32), wobei die exogene Zufuhr von Melatonin an pinealektomierten Ratten den Blutdruck normalisieren kann (33).

Die antihypertensive Wirkung des Melatonins beruht auf der direkten Wirkung des Indolamins als freier Radikalfänger (27). Daraus resultiert eine Verminderung des oxidativen Stresses. Weiterhin verbessert das Melatonin die kardialen Baroreflexe in spontan-hypertensiven Ratten (34) und kann bei dauerhafter Gabe über sechs Wochen verglichen mit einer Kontrollgruppe zu einem Abfall des Blutdrucks führen (35). Gleichzeitig wurde eine antiinflammatorische Wirkung des Melatonins an Rattennieren

bestätigt, verbunden mit einer verminderten Expression des Transkriptionsfaktors NF- κ B.

Allerdings gibt es Hinweise, dass Melatonin kaum zu strukturellen und morphologischen Veränderungen am hypertensiv geschädigten hypertrophen Herzen führt. So konnte an spontan-hypertensiven Ratten keine signifikante Gewichtsreduktion des linken Ventrikels nach Melatoningabe festgestellt werden (34).

Verschiedene Mechanismen der Melatoninwirkung führen zu einer Blutdruckreduktion. Hierzu gehören ein direkt-hypothalamischer Effekt, eine Verminderung der Katecholaminspiegel, eine Relaxation der glatten Gefäßwandmuskelzellen der Aorta und die antioxidative Komponente (36).

Auch am Menschen wurden bereits einige Untersuchungen zum Zusammenhang von Melatonin und dem Blutdruck durchgeführt. So ergab sich eine negative Korrelation zwischen dem Blutdruck und den in der Nacht gemessenen Melatoninspiegeln (37). Je höher die Konzentrationen des im Urin gemessenen Metaboliten 6-Hydroxymelatonininsulfat sind, desto stärker ist eine Blutdruckverminderung bei den untersuchten Patienten festzustellen. Dabei können bei Patienten mit Hypertonie sogenannte „Dippers“ mit einer deutlichen Blutdruckreduktion während der Nacht von „Non-Dippers“ mit einem nur geringfügig verminderten Blutdruck unterschieden werden. „Non-Dipper“-Patienten weisen im Vergleich zu den „Dippers“ vermehrt kardiovaskuläre Veränderungen auf wie links-ventrikuläre Hypertrophie, links-ventrikuläre diastolische Dysfunktion und Arrhythmie verbunden mit einem erhöhten kardiovaskulären Mortalitätsrisiko (38).

Die Melatoninspiegel erhöhen sich bei Patienten mit Bluthochdruck, wobei eine antihypertensive Therapie über 6 Monate mit 4 mg Lacidipin pro Tag die Konzentration von Melatonin im Plasma normalisieren kann (39). Folglich wird diskutiert, dass Melatonin als körpereigenes Antihypertensivum bei Patienten mit Bluthochdruck verstärkt gebildet wird.

Bei Untersuchungen an gesunden jungen Frauen und Männern ohne blutdruckrelevante Medikation konnte nach Einmalgabe von 1 mg Melatonin eine signifikante Blutdruckreduktion nachgewiesen werden (40,41).

2.2 Melatoninrezeptoren

2.2.1 Struktur und Klassifikation

Die Melatoninrezeptoren wurden in den 1980er Jahren nach pharmakologischen und kinetischen Kriterien klassifiziert. Sie wurden in zwei Subtypen unterteilt, den ML1- und den ML2-Rezeptor. Die Einteilung erfolgte mittels Bindungsstudien (42). Genutzt wurde hierzu ein spezifischer Ligand, das 2-[125I]iodomelatonin ([125I]Mel).

1994 konnte der erste Melatoninrezeptor aus *Xenopus laevis*-Melanophoren kloniert werden (43). Darauf basierend wurde entdeckt, dass drei verschiedene Subtypen der Melatoninrezeptoren mit dem Charakter des ML1-Rezeptors existieren. Sie werden unterteilt in Mel1a, nach jetzt gültiger Terminologie MT1 mit dem zugehörigen Gen *MTNR1A*; und Mel1b, analog nach dieser Terminologie MT2 genannt, mit dem zugehörigen Gen *MTNR1B*. Mel1c ist ein weiterer Rezeptorsubtyp, welcher in Säugetieren noch nicht gefunden werden konnte. Dieser liegt bei Vögeln vor, bei welchen stattdessen kein Nachweis von MT2 erbracht werden konnte (44,45).

Die Melatoninrezeptoren gehören zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Sie weisen eine ungefähr 55-prozentige Übereinstimmung ihrer Aminosäuresequenzen auf. Molekular bestehen sie aus 7 Transmembran- α -Helices, welche gekoppelt sind an 3 intra- (ic1-3) und 3 extrazellulären Loops (ec1-3) (46).

Die Affinität zum Bindungsliganden 2-[125I]Mel von menschlichen MT1-Rezeptoren liegt bei $K_D = 20\text{--}40$ pmol/l, die von MT2-Rezeptoren deutlich geringer bei $K_D = 160$ pmol/l (47). Ein weiterer Rezeptor mit circa 40-prozentiger Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen wurde kloniert (GPR50). Dieser Rezeptor ist allerdings nicht in der Lage Melatonin zu binden und wird daher als melatonin-related-receptor (MRR) bezeichnet (48). Der vormals als ML2-Rezeptor und nun als MT3 klassifizierte Melatoninrezeptor gehört nicht zu den GPCRs. In neueren Studien wurde erforscht, dass es sich hierbei um eine Chinon-Reduktase-2 handelt. Die Funktion des MT3 ist noch weitgehend unbekannt (49).

Insgesamt liegen also drei Melatoninrezeptoren vor, die physiologisch eine nachweisliche Rolle spielen. Hierzu gehören MT1, MT2 und Mel1c. Zusätzlich zu diesen membrangebundenen Rezeptoren wurden auch nukleäre Melatoninrezeptoren in der

Literatur beschrieben. Melatonin bindet an Rezeptoren, welche zur retinoid-verwandten nukleären Hormonrezeptorfamilie gehören (50). Die Funktion dieser nukleären Rezeptoren konnte noch nicht geklärt werden.

2.2.2 Vorkommen

Melatoninrezeptoren befinden sich in niederen Wirbeltieren weit verbreitet im Zentralnervensystem (ZNS). Die Anzahl der Melatoninrezeptoren im ZNS wie auch die Gesamtanzahl ist höher als bei den Säugetieren (45,51).

Beim Menschen werden mehr MT1-Rezeptoren als MT2-Rezeptoren gebildet (4). Die höchste Konzentration von Melatoninrezeptoren findet sich in der Pars tuberalis des Frontallappens. MT1-Rezeptoren werden vor allem im Hypothalamus und dort verstärkt in den suprachiasmatischen Kernen gefunden. Aber auch im Großhirn, im Cerebellum, in der Retina, dem Hippocampus und dem Thalamus können MT1-Rezeptoren nachgewiesen werden. MT2-Rezeptoren sind im ZNS lokalisiert im Hippocampus, Kleinhirn, im Nucleus suprachiasmaticus und der Retina (4,46,52).

Auch in peripheren Geweben konnten Melatoninrezeptoren nachgewiesen werden. Im bronchus-assoziierten lymphatischen Gewebe (BALT) in der Lunge von tropischen Wachteln fanden sich sowohl MT1-, wie auch MT2-Rezeptoren (53). Im Gastrointestinaltrakt und der duodenalen Einheit, bestehend aus Leber, Gallenblase und Pankreas, wurden sowohl Melatoninrezeptoren wie auch eine Melatoninproduktion außerhalb der Zirbeldrüse nachgewiesen (54). In in-vitro-Studien konnten mittels des Liganden 2-[125I]Mel die Expression von MT1- und MT2-Rezeptoren in fetalen menschlichen Nieren und das Vorkommen von MT1-Rezeptoren im Kortex der Nebenniere bewiesen werden (55,56). Auch in der Haut lassen sich Melatoninrezeptoren nachweisen (57).

Ebenso wurden Melatoninrezeptoren im kardiovaskulären System entdeckt. So zeigte sich eine Expression von Melatoninrezeptoren in cerebralen Arterien von Ratten. Diesen wird eine enge Korrelation mit der Thermoregulation zugeschrieben. Diesen Studien zufolge übt Melatonin einen vasokonstriktorischen Effekt auf die Blutgefäße aus (58,59). 2001 erfolgte erstmals der Nachweis des Rezeptor-Subtyps MT1 an isolierten

menschlichen Koronararterien (60). Eine weitere Untersuchung ergab, dass auch MT2-Rezeptoren an menschlichen Koronararterien, an Aorten und linken Herzventrikeln vorhanden sind (61). Es zeigte sich, dass die Expression sowohl an Menschen ohne kardiovaskulärer Schädigung, wie auch bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) und mit Kardiomyopathie vorlag. Interindividuell war die Anzahl an MT2-Rezeptoren sehr unterschiedlich und ließ in diesen Studien keine Rückschlüsse auf die Anzahl und das Vorkommen von Melatoninrezeptoren im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen zu.

2.2.3 Signaltransduktion

In Geweben werden verschiedene Wege der Signalübertragung durch Melatoninrezeptoren initiiert (62). Vorwiegend findet die Signaltransduktion an den drei Rezeptorsubtypen (MT1, MT2 und Mel1c) über ein inhibitorisches Gi-Protein statt. Nach Bindung des entsprechenden Liganden an den Rezeptor kommt es über eine Aktivierung der Adenylatzyklase zu einer Hemmung der Neubildung von forskolin-stimuliertem cAMP aus ATP (46). Dieses Gi-Protein ist sensitiv für das Pertussis-Toxin. Es wurde ferner eine Cholera-Toxin-sensitive Komponente entdeckt, welche die zyklische AMP-Produktion hemmt. Diese ist gekoppelt an ein Go-Protein (63).

Nach aktueller Studienlage interagiert die 5-Methoxygruppe des Melatonins mit der Transmembrandomäne 5 (TM5) des Melatoninrezeptors (MT1), wodurch die Signaltransduktion ausgelöst wird (64).

Aktivierte Melatoninrezeptoren weisen eine Wirkung auf verschiedene Transkriptionsfaktoren auf. So können aktivierte MT1-Rezeptoren die Phosphorylierung des eng mit der zirkadianen Rhythmik zusammenhängenden Transkriptionsfaktors CREB-1 (cAMP response element-binding protein) inhibieren (65). CREB-1 wird durch Lichtreize aktiviert, durch den Einfluss des Melatonins kommt es zu einer Hemmung.

Auch die heterodimerischen AP-1-Transkriptionsfaktoren *c-fos* und *jun-B* werden mittels Aktivierung des MT-1 Rezeptors in der Hypophyse inhibiert (66).

An rekombinanten stimulierten MT1-Rezeptoren wurde neben der oben aufgezeigten Signalkaskade eine vermehrte Freisetzung von Prostaglandin-F2 α -abhängiger

Arachidonsäure verbunden mit einer Hydrolyse von Phosphoinositid beschrieben (67). Mit der Freisetzung von Arachidonsäure wird die Proteinkinase C inhibiert. Die Freisetzung von Prostaglandin-F2 α aktiviert die Phospholipase C. Vor allem der Subtyp Phospholipase C- β führt zu erhöhten Spiegeln der bei der Signaltransduktion als second Messenger fungierenden Inositol-(1,4,5)-trisphosphat und 1,2-Diacylglycerol (46). Durch das Inositol-(1,4,5)-trisphosphat wird vermehrt ionisiertes Kalzium (Ca $^{2+}$) aus dem endoplasmatischen Retikulum freigesetzt und die zytosolische Ca $^{2+}$ -Konzentration steigt an (68).

Der MT2-Rezeptor ist zusätzlich zur Wirkung auf cAMP auch in der Lage die Bildung von zyklischem Guanosin-Monophosphat (cGMP) zu inhibieren (69). Dabei wird durch Hemmung von Stickstoffmonoxid das Schlüsselenzym zur Bildung von cGMP, die Guanylatzyklase, indirekt inhibiert (68).

In Zellen der Fibroblasten-Zelllinie COS-7 konnte nachgewiesen werden, dass aktivierte MT1-, wie auch MT2-Rezeptoren die *c-jun* N-terminale Kinase (JNK) mittels Pertussis-Toxin-sensitiven, aber auch -nicht-sensitiven G-Proteinen stimulieren (70). Auch weitere Mitogen-aktivierte Proteinkinasen wie die Extracellular-signal Regulated Kinases (ERK) 1/2 werden durch die Aktivierung des MT1-Rezeptors stimuliert (70).

Insgesamt ist die Signaltransduktion des Melatoninrezeptors sehr vielschichtig. Die Wirkung und Übertragung von Informationen findet über verschiedene Wege und second Messenger statt und ist noch nicht abschließend verstanden.

2.2.4 Pharmakologie

Seit einigen Jahren wird an Rezeptoragonisten und -antagonisten für die Melatoninrezeptoren mit dem Ziel der therapeutischen Einsatzfähigkeit am Menschen geforscht. Es gibt Subtyp-spezifische Liganden für den MT1- und für den MT2-Rezeptor (12). Gegenwärtig stehen drei Agonisten mit hoher Affinität zum Melatoninrezeptor im Fokus der Forschungen, da sie eine klinische Relevanz aufweisen. Deren Strukturformeln sind in Abb. 3 dargestellt.

Agomelatine ist ein oral applizierbarer nicht-selektiver MT1/MT2-Rezeptoragonist und wirkt antagonistisch auf Serotoninrezeptoren. Dem Agomelatine wird ein chronobiotischer und ein angstlösender sowie antidepressiver Effekt zugeschrieben (71). Therapeutische Anwendung findet Agomelatine bei schweren Depressionen. Es kann auch zur Behandlung von Schlafstörungen genutzt werden (72).

Ramelteon ist ein selektiver MT1/MT2-Agonist. Es verfügt über einen chronobiotischen Effekt und wird in den USA als Schlafmittel für den Langzeitgebrauch angewandt (71). In einer Studie an 289 Erwachsenen wurde eine signifikante Verkürzung der Einschlafzeit um 7,5 Minuten mit der Gabe von 8 mg Ramelteon im Vergleich zu einem Placebo nachgewiesen. Die Gesamtschlafzeit verlängerte sich um 17,1 Minuten (73).

Tasimelteon ist ein Rezeptoragonist mit hoher Affinität zu MT1 und MT2. Es befindet sich in der dritten Phase des pharmakologischen Zulassungsverfahrens (71). In präklinischen Studien zeigt es gute Wirksamkeit zur Behandlung der Schlaflosigkeit und Verbesserung der Symptome der schweren Depression. Langzeitstudien vor allem im Hinblick auf die Verträglichkeit von Tasimelteon müssen noch abgewartet werden (74).

Aufgrund des Einflusses von Melatonin bei der zirkadianen Rhythmik wird eine therapeutische Wirkung des Melatonins bei der Bekämpfung der Jetlag-Symptomatik diskutiert (75). Dabei soll die Wirkung von Melatonin umso größer sein, je mehr Zeitzonen überquert worden sind. Ebenfalls soll sich eine bessere Wirkung zeigen bei ostwärts gerichteten Flügen, also bei einer Verschiebung der Uhrzeit im Uhrzeigersinn.

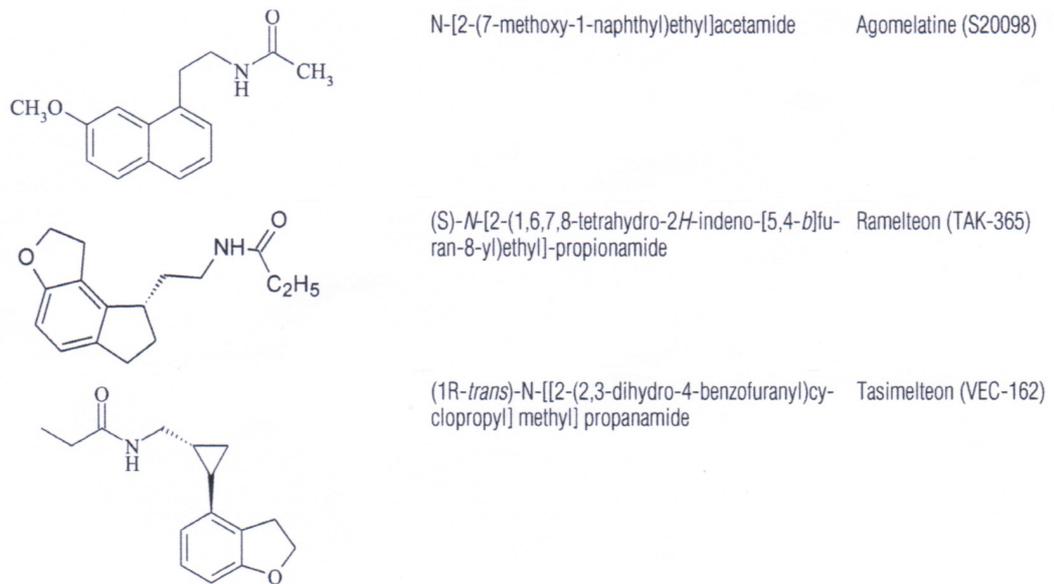


Abb. 3 Pharmakologische Derivate des Melatonins (4)

Der nicht zu den GPCRs gehörende MT3-Rezeptor wird von einem Vorläufer der Melatoninsynthese, dem N-Acetylserotonin aktiviert (46). Aufgrund der unterschiedlichen pharmakologischen Eigenschaften des MT3-Rezeptors im Vergleich zu MT1 und MT2, gibt es bei MT3 auch unterschiedliche Liganden, die an den Rezeptor binden. Selektive MT3-Liganden sind der Rezeptoragonist 5-Methoxy-Carbonylamino-N-Acetyltryptamin, der Rezeptorantagonist Prazosin und N-Acetyltryptamin (4). Die selektiven MT3-Liganden werden dahingehend geprüft, ob sie ebenfalls einen antidepressiven Effekt und somit eine therapeutische Bedeutung aufweisen (76).

2.3 Melatoninrezeptoren und kardiovaskuläres System

Bezogen auf die Melatoninrezeptoren wird ein kardioprotektiver Effekt des Melatonins diskutiert (36). Hierbei steht die Wirkung des Melatonins über die G-Protein gekoppelten Rezeptoren MT1 und MT2 im Fokus der Forschungen (5).

Eine Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration durch eine von Bradykinin und ATP getriggerte Aktivierung der MT2-Rezeptoren an Endothelzellen konnte nachgewiesen werden (77). Durch die Erhöhung des intrazellulären Kalzium-Spiegels wird die Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) gesteigert. NO führt seinerseits zu einer Vasodilatation und somit zu einer Senkung des Blutdrucks.

Eine andere Untersuchung an cerebralen Gefäßen von Ratten zeigte vasokonstriktorische Wirkungen von Melatonin (59). Über eine Aktivierung des Melatoninrezeptors wird die Bildung von forskolin-stimuliertem cAMP intrazellulär gesenkt, was den vasokonstriktorischen Effekt hervorruft. Ebenfalls zu einer Gefäßverengung führt die Hydrolyse von Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphat nach Aktivierung von Melatoninrezeptoren, nachgewiesen durch eine in vitro-Studie (42).

Es gibt Hinweise darauf, dass der MT2-Rezeptor eine größere Rolle bei der Blutdruckregulation spielt als der MT1-Rezeptor (78). Zwei Wochen nach einem experimentell ausgelösten Myokardinfarkt ohne folgende Melatoningabe wurden am linken Rattenventrikel gleichbleibende mRNA-Expressionen von MT1 und MT2 gemessen. Mit der Gabe von Melatonin kam es zwei Wochen nach dem Infarkt zu einem stärkeren Abfall der gemessenen Melatoninrezeptor-mRNA bei MT1 im Vergleich mit MT2. In diesen Untersuchungen wurden mittels Western Blotting die Proteinexpressionen von MT1 und MT2 gemessen. Einen Tag nach Auslösung des Myokardinfarktes waren die MT1-Rezeptor-Proteine im geringeren Ausmaß vorhanden im Vergleich zu einer Kontrollgruppe, dagegen fand man vermehrt MT2-Rezeptor-Proteine. Dieses Ergebnis könnte ein Hinweis darauf sein, dass der MT2-Rezeptor eine Rolle in der kardiovaskulären Regeneration nach Myokardinfarkt spielt (78). Bei einer Untersuchung an Mäusen und Ratten wurde festgestellt, dass zwar Melatonin selbst einen kardioprotektiven Effekt hat, ein verbesserter Effekt über eine Wirkung des MT1-

Rezeptors konnte nicht nachgewiesen werden (79). Nach experimentell erzeugtem myokardialen Infarkt mit Ischämie bewirkte die anschließende Gabe von Melatonin eine verbesserte kardiale Funktion und Regeneration (4,80). Die kardioprotektive Wirkung von Melatonin wurde wiederum durch den Melatoninrezeptorantagonisten Luzindole aufgehoben.

2.4 Melatoninrezeptoren und Diabetes mellitus Typ II

Bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ II wurde eine signifikant höhere Anzahl von Melatoninrezeptoren im pankreatischen Gewebe im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe nachgewiesen (81). Interessanterweise ergaben umfassende genetische Assoziationsstudien statistische Korrelationen zwischen erhöhten Plasmaglukosespiegeln und bestimmten genetischen Varianten, den sogenannten Einzelnukleotidpolymorphismen des *MTNR1B* (82-88). Diese genetischen Varianten werden in der angloamerikanischen Literatur auch als single nucleotide polymorphism (SNP) bezeichnet.

Die SNPs rs10830962, rs4753426, rs12804291, rs10830963 und rs3781638 zeigten in einer genetischen Studie zum Teil statistische Signifikanz mit einer erhöhten Plasmaglukosekonzentration und einem erhöhten Risiko zur Entwicklung eines Typ II Diabetes (89). Sämtliche dieser fünf untersuchten SNPs liegen im Gen-Bereich des *MTNR1B* auf Chromosom 11q21-q22. Inwiefern diese genetischen Polymorphismen funktionelle Veränderungen des Rezeptors bewirken ist bisher ungeklärt. Im Kontext mit kardiovaskulären Erkrankungen könnten sie jedoch in die Genetik des metabolischen Syndroms eingebunden sein.

2.5 Fragestellung

Melatonin ist ein Hormon, das beim Menschen die zirkadiane Rhythmik reguliert und gegen oxidativen Stress schützt. Seine Wirkung wird grundlegend durch membranständige Melatoninrezeptoren vermittelt. Assoziationsstudien zeigten neuerdings, dass die Genetik des Melatoninrezeptors MT2 mit dem Diabetes mellitus Typ II verknüpft ist. Interessanterweise wird genau dieser Rezeptor auch an Kardiomyozyten des menschlichen Herzens exprimiert. Insofern stellte sich für die vorliegende Studie folgende Frage: Sind jene Einzelnukleotidpolymorphismen, die sich als assoziiert mit Parametern des Diabetes mellitus Typ II gezeigt haben, auch signifikant verbunden mit Blutdruckwerten oder mit jenen echokardiographischen Parametern, welche die Herzstruktur bzw. die Herzfunktion beschreiben? Diese Frage basiert auf dem Konzept, dass diese genetischen Varianten die Funktionsweise des Rezeptors verändern könnten. Als Zielgrößen sollen der mittlere systolische und diastolische 24-Stunden-Blutdruck (24h-Blutdruck), für die Herzfunktion die Ejektionsfraktion (EF) und für die Herzstruktur der linksventrikuläre Massenindex (LVMI) festgesetzt werden. Die Untersuchung der Einzelnukleotidpolymorphismen soll erweitert werden durch die Analyse von Haplotypen des zum Melatoninrezeptor MT2 gehörenden Rezeptorgens *MTNR1B*, um damit ein umfassenderes Bild über die genetische Bedeutung des *MTNR1B* für den Blutdruck und die kardialen Parameter zu bekommen. Die Fragestellung soll unter klinischen Bedingungen bei Patienten mit arteriellem Hypertonus untersucht werden. Der Bluthochdruck der Patienten soll standardisiert nach europäischen Richtlinien behandelt sein. Aufgrund der komplexen klinischen Studiensituation soll die Auswertung mittels statistischer Modelle über multivariate Analysen unter Beachtung der Kovariaten erfolgen.

3 Material und Methoden

3.1 Studienpopulation

Die Studienpopulation bestand aus Patienten, welche bei Studieneintritt mindestens 18 Jahre alt waren und mindestens einen Monat an nachgewiesenen und dokumentierten kardiovaskulären Erkrankungen litten (siehe Tabelle 5). Dazu zählten koronare Herzkrankheit, Myokardinfarkt, Schlaganfall und periphere arterielle Verschlusskrankheit. Die Patienten nahmen an einem Rehabilitationsprogramm in 15 Kliniken teil (89). Ein weiteres Einschlusskriterium war eine nachgewiesene arterielle Hypertonie, der systolische Blutdruck lag dabei definiert nach den Kriterien der WHO durchschnittlich mindestens bei 140 mmHg und der diastolische Blutdruck durchschnittlich bei mindestens 90 mmHg (90). Der arterielle Hypertonus wurde gemäß der europäischen Leitlinie medikamentös behandelt (91). Die Werte der Langzeitblutdruckmessung der medikamentös eingestellten Patienten zeigt Tabelle 6. Ausschlusskriterien für die Teilnahme an der vorliegenden Studie stellten Einwilligungsunfähigkeit und Alter unter 18 Jahren dar.

Nach Aufnahme in die Studie wurde die Anamnese der Patienten erfragt und dokumentiert. Hierzu gehörten die Krankheitsgeschichte, die Medikation, der Raucherstatus und das Vorliegen eines Diabetes mellitus Typ II.

Anschließend wurde die körperliche Leistungsfähigkeit getestet und demographische Daten erhoben. Der BMI (Body Mass Index) wurde errechnet, nachdem die Patienten mit leichter Kleidung gewogen und die Körpergröße gemessen wurde. Der BMI ergibt sich durch das Körpergewicht in Kilogramm dividiert durch die Körpergröße in Meter hoch zwei (Einheit kg/m^2). Ebenso wurde bei den Patienten die glomeruläre Filtrationsrate (eGFR, Einheit $\text{ml} \times \text{min}^{-1} \times 1,73 \text{ m}^{-2}$) der Nieren geschätzt.

Den Patienten wurde nach einer zwölfstündigen Fastenperiode Blut entnommen. Die Blutproben wurden mit Standardmethoden der klinischen Chemie und entsprechenden Qualitätskontrollen untersucht.

Die Studie steht im Einverständnis mit der Erklärung von Helsinki, sämtliche Patienten wurden aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Studienteilnahme. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin Berlin (Campus Benjamin Franklin) zustimmend bewertet.

3.2 Blutdruckmessung

Der Blutdruck wurde in sitzender Position nach fünf Minuten Ruhezeit mit einem Blutdruckmessgerät bestimmt. Zusätzlich wurde eine 24h-Blutdruckmessung mit einem tragbaren Blutdruckmessgerät (custo med GmbH Ottobrunn, Deutschland) durchgeführt. Der Blutdruck wurde tagsüber (6-22 Uhr) alle 15 Minuten und nachts (22-6 Uhr) alle 30 Minuten automatisch gemessen. Die durchschnittlichen 24h-Blutdruckwerte wurden in vier Zeitfenster unterteilt: der Tageszeit (Werte zwischen 6 und 22 Uhr), der Nachtzeit (Werte von 22–6 Uhr morgens), der Zeit von 6-10 Uhr vormittags und der gesamten 24-Stunden-Periode.

3.3 Echokardiographie

Es wurde bei allen Patienten eine zwei-dimensionale M(motion)-mode echokardiographische Untersuchung des linken Herzventrikels durchgeführt. Bei der M-mode Echokardiographie können durch Unterschiede der einzelnen Impulsechos Bewegungsabläufe der untersuchten Strukturen dargestellt werden. Durch die zwei-dimensionale Darstellung lassen sich bessere Rückschlüsse auf die Geometrie und Größe der Strukturen und Gewebe ziehen.

Mittels der Echokardiographie wurde der linksventrikuläre Massenindex LVMI in Gramm/Meter^{2,7} (g/m^{2,7}) bestimmt (92). Ebenso konnten die Ejektionsfraktion (EF =

ejection fraction) in Prozent und das Verhältnis des frühen Füllungsvolumens zum späteren Spitzenwert (E/A = ratio of early filling velocity (E) and peak late filling velocity (A)), errechnet werden. Die weiteren Herzparameter LA = left atrial diameter (Durchmesser des linken Herzvorhofs), LVED = left ventricular end-diastolic diameter (links-ventrikulärer enddiastolischer Durchmesser), LVES = left ventricular end-systolic diameter (endsystolischer Durchmesser des linken Ventrikels), IVST = interventricular septum thickness (Dicke des Interventrikularseptums), PWT = posterior wall thickness (Dicke der Herzhinterwand) und RWT = relative wall thickness (relative Herzwanddicke) wurden ausgemessen.

3.4 Vorbereitende Maßnahmen zur Genotypisierung

3.4.1 Konzentrationsmessung

In der vorliegenden genetischen Assoziationsstudie wurden Einzelnukleotidpolymorphismen (single nucleotide polymorphisms = SNPs) auf dem für den Melatoninrezeptor MT2 kodierenden Chromosom 11q21-q22 bestimmt. Die hierzu verwendete DNA wurde aus den Blutproben der Patienten extrahiert und war für die vorliegende Studie bereits aufgearbeitet. Die DNA wurde einer Konzentrationsmessung unterzogen, um später durch Verdünnung eine gleichmäßige Konzentration der DNA-Proben zu erreichen.

Die Konzentrationsbestimmungen erfolgten mit dem NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Fa. NanoDrop products, Wilmington, USA) (siehe Abb. 4). Ein Beispiel für die Konzentrationsmessungen zeigt Abb. 5. Die DNA-Proben sind unter Sample ID entsprechend ihres Pseudonymisierungscode aufgeführt.

Nach der Konzentrationsbestimmung wurden die Proben auf eine einheitliche DNA-Konzentration von 10 ng/ μ l mittels Aqua bidest. verdünnt. Insgesamt wurde je DNA-Probe eine dazugehörige Verdünnung mit einem Volumen von 40 μ l hergestellt.

Es fand folgende Formel zur Errechnung der benötigten Menge DNA Anwendung:

$$\frac{10 \text{ ng}/\mu\text{l}}{\text{Konzentration DNA in ng}/\mu\text{l}} \times 40 \mu\text{l} = \text{gesuchte Menge DNA in } \mu\text{l}$$

Lag die Konzentration der DNA unterhalb von 10 ng/ μ l, wurde keine Verdünnung erstellt. Das Ausplattieren fand dann mittels der Original-DNA statt.

Nach dem Pipettieren der erforderlichen DNA-Menge in ein verschließbares Eppendorf-Gefäß (Fa. Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) wurde die Probe bis zu einem Volumen von 40 μ l mit Aqua bidest. aufgefüllt.

Die erstellten Verdünnungen wurden entsprechend des Pseudonymisierungscode nummeriert und bei -20°C aufbewahrt. Sie wurden für den weiteren Schritt des Ausplattierens verwendet, während die Original-DNA mit Konzentrationen >10 ng/ μ l für weitere Verdünnungsreihen unverändert blieb.



Abb. 4 NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Fa. NanoDrop products, Wilmington, USA)

| Sample ID | User ID | Date | Time | ng/ul | A260 | A280 | 260/280 | 260/230 | Constant | Cursor Pos. | Cursor abs. | 340 raw |
|-------------|---------|------------|-------|--------|-------|-------|---------|---------|----------|-------------|-------------|---------|
| Esther 324 | Default | 15.05.2009 | 14:02 | 217,70 | 4,354 | 2,348 | 1,85 | 2,25 | 50,00 | 230 | 1,939 | 0,044 |
| Esther 392 | Default | 15.05.2009 | 14:04 | 291,49 | 5,830 | 3,195 | 1,82 | 2,36 | 50,00 | 230 | 2,467 | 0,053 |
| Esther 393 | Default | 15.05.2009 | 14:05 | 192,26 | 3,845 | 2,045 | 1,88 | 2,21 | 50,00 | 230 | 1,743 | 0,035 |
| Esther 394 | Default | 15.05.2009 | 14:06 | 179,14 | 3,583 | 1,895 | 1,89 | 2,28 | 50,00 | 230 | 1,574 | 0,027 |
| Esther 422 | Default | 15.05.2009 | 14:06 | 209,36 | 4,187 | 2,257 | 1,85 | 2,19 | 50,00 | 230 | 1,915 | 0,024 |
| Esther 428 | Default | 15.05.2009 | 14:07 | 131,32 | 2,626 | 1,452 | 1,81 | 2,16 | 50,00 | 230 | 1,217 | 0,028 |
| Esther 430 | Default | 15.05.2009 | 14:09 | 261,33 | 5,227 | 2,848 | 1,84 | 2,35 | 50,00 | 230 | 2,222 | 0,013 |
| Esther 609 | Default | 15.05.2009 | 14:10 | 79,58 | 1,592 | 0,837 | 1,90 | 2,07 | 50,00 | 230 | 0,770 | 0,021 |
| Esther 610 | Default | 15.05.2009 | 14:11 | 202,63 | 4,053 | 2,185 | 1,85 | 2,21 | 50,00 | 230 | 1,833 | 0,011 |
| Esther 611 | Default | 15.05.2009 | 14:12 | 307,42 | 6,148 | 3,291 | 1,87 | 2,37 | 50,00 | 230 | 2,591 | 1,598 |
| Esther 795 | Default | 15.05.2009 | 14:13 | 271,29 | 5,426 | 2,927 | 1,85 | 2,28 | 50,00 | 230 | 2,378 | 0,009 |
| Esther 967 | Default | 15.05.2009 | 14:14 | 185,50 | 3,710 | 1,974 | 1,88 | 2,20 | 50,00 | 230 | 1,688 | 0,010 |
| Esther 976 | Default | 15.05.2009 | 14:15 | 186,47 | 3,729 | 1,994 | 1,87 | 1,91 | 50,00 | 230 | 1,955 | 0,013 |
| Esther 977 | Default | 15.05.2009 | 14:16 | 158,05 | 3,161 | 1,646 | 1,92 | 1,88 | 50,00 | 230 | 1,684 | 0,021 |
| Esther 981 | Default | 15.05.2009 | 14:17 | 85,47 | 1,709 | 0,935 | 1,83 | 2,06 | 50,00 | 230 | 0,830 | 0,003 |
| Esther 982 | Default | 15.05.2009 | 14:18 | 163,42 | 3,268 | 1,773 | 1,84 | 2,24 | 50,00 | 230 | 1,458 | -0,017 |
| Esther 983 | Default | 15.05.2009 | 14:18 | 169,77 | 3,395 | 1,823 | 1,86 | 2,27 | 50,00 | 230 | 1,497 | 0,023 |
| Esther 986 | Default | 15.05.2009 | 14:19 | 284,11 | 5,682 | 3,066 | 1,85 | 2,31 | 50,00 | 230 | 2,456 | 0,032 |
| Esther 1095 | Default | 15.05.2009 | 14:21 | 165,96 | 3,319 | 1,773 | 1,87 | 2,27 | 50,00 | 230 | 1,461 | 0,024 |
| Esther 1097 | Default | 15.05.2009 | 14:22 | 97,30 | 1,946 | 1,046 | 1,86 | 2,19 | 50,00 | 230 | 0,889 | 0,007 |
| Esther 1098 | Default | 15.05.2009 | 14:23 | 219,28 | 4,386 | 2,339 | 1,87 | 2,27 | 50,00 | 230 | 1,930 | 0,012 |
| Esther 1109 | Default | 15.05.2009 | 14:24 | 371,96 | 7,439 | 4,017 | 1,85 | 2,24 | 50,00 | 230 | 3,321 | 0,049 |
| Esther 1182 | Default | 15.05.2009 | 14:25 | 205,50 | 4,110 | 2,202 | 1,87 | 2,13 | 50,00 | 230 | 1,929 | 0,012 |
| Esther 1418 | Default | 15.05.2009 | 14:25 | 295,04 | 5,901 | 3,164 | 1,87 | 2,23 | 50,00 | 230 | 2,642 | 0,035 |

Abb. 5 Beispiel für eine DNA-Konzentrationsmessung mittels NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Fa. NanoDrop products, Wilmington, USA)

3.4.2 Ausplattieren der DNA

Nach der Konzentrationsmessung wurden jeweils 2,5 µl der entsprechend verdünnten DNA-Proben bzw. bei niedriger Konzentration (DNA <10 ng/µl) 2,5 µl aus der Original-DNA in eine 96-Well-Platte (Perkin-Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, California, USA) pipettiert und abgedeckt bei Raumtemperatur getrocknet. Die Lagerung der nummerierten Platten 1-17 fand anschließend bei -20°C statt.

Die Plattenbelegung wurde mit dem Programm ABI Prism 7000 SDS 1.0 Software (Perkin-Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, California, USA) erstellt und gespeichert.

3.5 Auswahl der verwendeten SNPs

Insgesamt wurden fünf SNPs des *MTNR1B* für die vorliegende Untersuchung bestimmt. Die SNPs rs10830962 C/G und rs4753426 T/C liegen in der 5'-Region des Gens, die anderen drei SNPs rs12804291 C/T, rs10830963 C/G und rs3781638 A/C sind lokalisiert im Single Intron des *MTNR1B* (87).

3.6 Genotypisierung

3.6.1 Polymerase-Kettenreaktion

Eine PCR (Polymerase Chain Reaction) ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA. Der Vorgang findet in mehreren aufeinanderfolgenden Zyklen statt, deswegen spricht man von einer Kettenreaktion. Die Endprodukte eines Zyklus sind wiederum die Ausgangsprodukte für den folgenden Zyklus. Eine Polymerase-Kettenreaktion wird enzymatisch katalysiert durch eine DNA-Polymerase. Diese Methode entwickelten Mullis und Mitarbeiter im Jahre 1983 (93).

Bei der Amplifikation der DNA laufen mehrere Schritte nacheinander ab. Zuerst wird die DNA erhitzt, um den Doppelstrang aufzutrennen. Chemisch werden hierbei die Wasserstoffbrückenbindungen gelöst. Dieser Schritt der Denaturierung wird auch melting oder Schmelzen genannt.

Nach der Denaturierung folgt die Primer-Hybridisierung, auch als primer annealing bezeichnet. Die Temperatur wird bei diesem Schritt so gewählt, dass sich die für die DNA-Vervielfältigung notwendigen Primer an die entsprechenden komplementären Sequenzen der DNA anlagern können.

Als nächstes synthetisiert die DNA-Polymerase ausgehend vom 3'-Ende des angelagerten Primers den neuen komplementären DNA-Strang. Hierbei werden die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden aufgefüllt. Dieser Vorgang wird als Elongation bzw. extending bezeichnet. Die gewählte Temperatur hängt von der optimalen

Arbeitstemperatur der DNA-Polymerase ab. Anfänglich wurden bei dieser Methode nicht-thermostabile Polymerasen isoliert aus E.coli-Bakterien verwendet (93). Als Weiterentwicklung werden hitzestabile Polymerasen verwendet, welche somit nicht nach jedem Denaturierungsschritt neu hinzugegeben werden müssen. Die thermostabile Taq-Polymerase wird aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen, welches 1969 erstmals in den USA isoliert werden konnte (94).

Die Vervielfältigung der DNA bei der Polymerase-Kettenreaktion geschieht exponentiell. An den neugebildeten DNA-Strängen lagern sich nach deren Denaturierung im folgenden Zyklus wiederum Primer an, so dass die neuen DNA-Stränge ebenso wie die Ausgangs-DNA als Matrize dienen. Es werden insgesamt ca. 12-50 Zyklen durchlaufen. Die folgende eigene Schemazeichnung zeigt den Ablauf eines Zyklus einer PCR:

Denaturierung (Denaturation)



Primer-Hybridisierung (Annealing)



DNA-Synthetisierung (Elongation)

3.6.2 Real-time PCR – Quantifizierung von DNA

Eine weiterentwickelte Form der PCR stellt die quantitative Echtzeit-PCR (Real-time PCR) dar (96). Zusätzlich zur DNA-Amplifikation kann hierbei eine Quantifizierung vorgenommen werden. In das entsprechende PCR-Gerät sind eine UV-Lampe und eine Charge-coupled Device-Kamera (CCD-Kamera) eingebaut. Durch Fluoreszenz-Messungen während eines PCR-Zyklus kann die gewonnene Menge an DNA bestimmt werden. Die Quantifizierung erfolgt in der exponentiellen Phase der PCR, wobei die Fluoreszenzintensität mit der Menge der PCR-Produkte ansteigt.

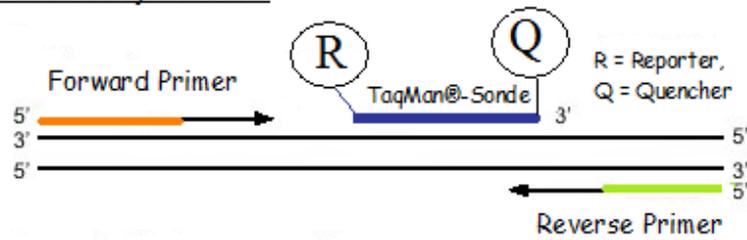
Im Falle der vorliegenden Studie wurde die Real-time PCR zur Genotypisierung genutzt.

Die heute gängige Methode der Real-time PCR basiert auf der Ausnutzung des Fluoreszenz-Energie-Transfers (=FRET) (97). Dabei wird Energie von einem Fluoreszenzfarbstoff (=Fluorochrom) nach dessen Anregung durch eine Lichtquelle an ein sich in unmittelbarer Nähe befindendes weiteres Fluorochrom abgegeben. Das Emissionsspektrum des ersten Fluorochroms muss dabei dem Anregungsspektrum von Fluorochrom 2 entsprechen. Die Fluorochrome sind radioaktiv oder fluoreszenzoptisch markierte Oligonukleotide, die in die DNA eingebaut werden und durch eine Blockierung an ihrem 3'-Ende nicht als Primer fungieren können. Sie werden von der DNA durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase abgelöst. Diese Eigenschaft der Taq-Polymerase in Zusammenhang mit der PCR wurde bereits 1991 publiziert und später auch für die Real-time PCR genutzt (98). Sind die beiden Fluorochrome räumlich weit voneinander entfernt, wird die Emission des ersten Fluorochroms gemessen, Fluorochrom 1 wird dann als reporter, Fluorochrom 2 als quencher bezeichnet. Bei räumlicher Nähe und entsprechendem Energietransfer wird letztendlich die Emission von Fluorochrom 2 gemessen, Fluorochrom 1 wird dann als Donor, Fluorochrom 2 als Akzeptor tituliert. Das bei der vorliegenden Studie genutzte Prinzip der Real-time PCR wurde unter dem Begriff TaqMan® patentiert (99). Hierbei sitzen Reporter und Quencher auf demselben Oligonukleotid (siehe Abb. 6). Bei Freisetzung des Reporter-Farbstoffs durch die Taq-Polymerase steigt die Lichtintensität

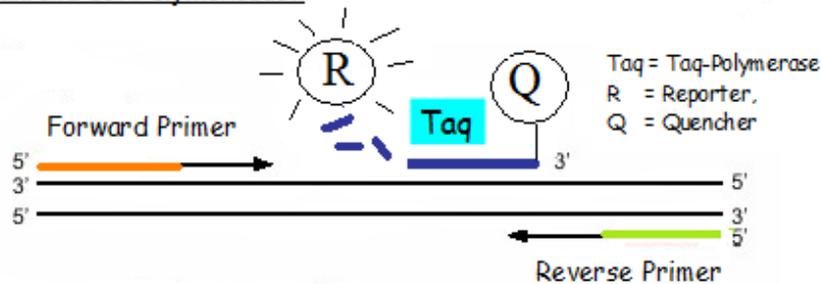
bei dieser Wellenlänge an. Je mehr DNA gebildet wird, desto höher ist folglich die Signalstärke.

Die folgende Abbildung 6 stellt schematisch den Ablauf einer TaqMan® Real-time PCR dar.

Zustand vor Polymerisation



Abspaltung des Reporter-Moleküls während der Polymerisation



Vervollständigung der Polymerisation

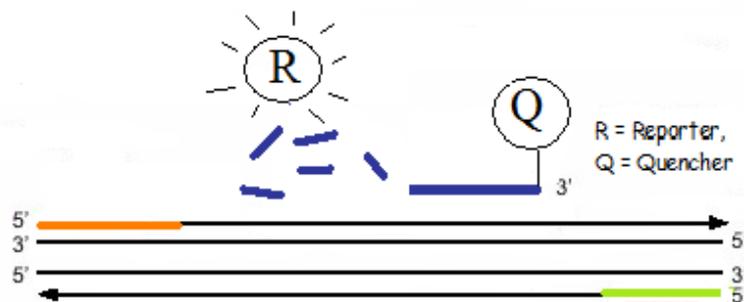


Abb. 6 TaqMan® Real-time PCR mittels Taq-Polymerase

In dieser selbst angefertigten Schemazeichnung ist ein Reporter-Molekül an die TaqMan®-Sonde angehängt.

3.6.3 Genotypisierung von SNPs mittels Real-time PCR

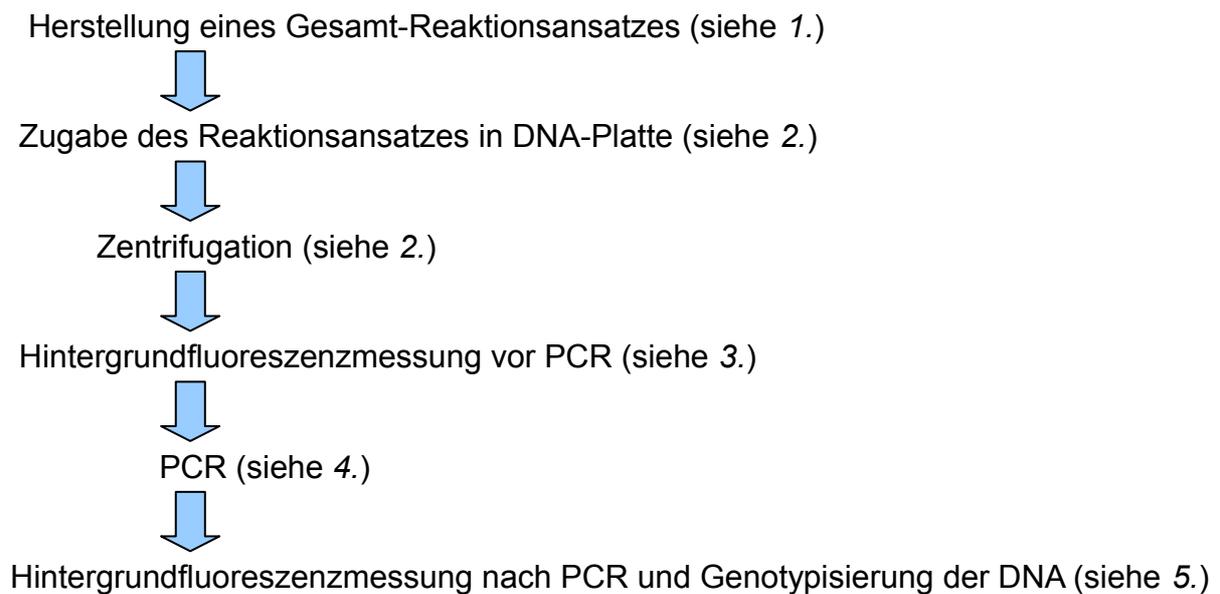
Bei den hier durchgeführten Versuchen wurden TaqMan®-Sonden (Fa. Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) mit den Reporter-Farbstoffen 6-FAM (6-Carboxyfluorescein) und VIC (chemische Struktur nicht publiziert) verwendet. Jeder der beiden Reporter repräsentierte bei den Assays jeweils ein Allel des entsprechenden SNPs. Als Quencher wurde der Farbstoff 5-TAMRA (5-Carboxytetramethylrhodamin) eingesetzt.

Zur Genotypisierung wurde mithilfe des ABI PRISM 7000 SDS (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) und der im Gerät enthaltenen CCD-Kamera eine Aufnahme der 96-Well-Platte (Perkin-Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, California, USA) unter UV-Licht angefertigt. Die erste Fluoreszenzmessung entstand vor Durchführung der PCR, um den Hintergrundwert der Fluoreszenzintensität zu bestimmen. Nach der PCR wurde erneut eine Messung der 96-Well-Platte mithilfe des ABI PRISM 7000 SDS (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) durchgeführt. Durch die Differenz der Fluoreszenzintensitäten der beiden Reporter-Farbstoffe vor und nach der PCR jedes Reaktionsansatzes, konnten Rückschlüsse auf das jeweilige Allel gezogen werden. Lagen die Intensitäten der beiden Farbstoffe im ausgeglichenen Verhältnis vor, so wurde von einem heterozygoten Genotyp ausgegangen. Bei Dominanz eines der beiden Farbstoffe wurde auf den dem Farbstoff zugeordneten homozygoten Genotyp geschlossen. Diese Zuordnung erfolgte über einen Algorithmus der verwendeten Software (siehe Abb. 8).

Die für die PCR benötigten Komponenten befanden sich im ABI TaqMan® Universal Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Die Messungen wurden im ABI PRISM 7000 SDS (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) in Kombination mit der Auswertungssoftware ABI Prism 7000 SDS 1.0 Software (Perkin-Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, California, USA) vollzogen. Für die Durchführung der PCR wurden Thermalcycler (Fa. Applied Biosystems, Foster City, California, USA) verwendet.

3.6.4 Praktische Durchführung der Genotypisierung mittels Real-time PCR

Zur Genotypisierung mittels Real-time PCR wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:



1. Herstellung eines Gesamt-Reaktionsansatzes

Hierzu wurden die zu befüllenden mit DNA versehenen Wells einer 96-Well-Platte (Perkin-Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, California, USA) gezählt, addiert wurden zwei Leerwerte (NTC = no template control) plus drei weitere imaginäre Wells, um ausreichend Reaktionsansatz für jede Platte sicherzustellen. Für diesen Vorgang wurden Pipetten der Größe 0-10 µl, 10-100 µl und 100-1000 µl (Fa. Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) benutzt.

Der Reaktionsansatz bestand aus 4 µl Genotyping-Mastermix (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), 0,2 µl TaqMan®-Sonde und 3,8 µl Aqua bidest. pro Well (siehe Tabelle 1).

2. Zugabe des Reaktionsansatzes und Zentrifugation

In jedes Well einer mit DNA ausplattierten 96-Well-Platte (Perkin-Elmer, Applied Biosystems, Foster City, California, USA) wurden 8 µl des Reaktionsansatzes pipettiert, zusätzlich wurden zur Kontrolle noch zwei NTCs gemessen.

Danach wurde die 96-Well-Platte zum Schutz gegen Verdunstung mit einer Abdeckfolie (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) beklebt. Anschließend wurde die Platte mit der Eppendorf Centrifuge 5610 R (Fa. Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei 2000 rpm für 1 Minute zentrifugiert (siehe Abb. 7). Ein Beispiel für die Aufteilung eines Gesamt-Reaktionsansatzes zeigt nachfolgende Tabelle 1.

Tabelle 1 Reaktionsansatz (85 Wells mit DNA, 2 Wells NTC, 3 Wells als Überschuss = 90 x 8 µl, entspricht insgesamt 720 µl)

| Reagens | Volumen/ Well | Gesamtvolumen |
|----------------------|----------------------|----------------------|
| Genotyping-Mastermix | 4 µl | 360 µl |
| TaqMan®-Sonde | 0,2 µl | 18 µl |
| Aqua bidest. | 3,8 µl | 342 µl |
| Summe | 8 µl | 720 µl |



Abb. 7 Eppendorf Centrifuge 5810 R (Fa. Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

3. Fluoreszenzmessung

Die Messung der Hintergrundfluoreszenz wurde mit dem ABI PRISM 7000 SDS (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) in Kombination mit der Software ABI Prism 7000 SDS 1.0 Software (Perkin-Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, California, USA) durchgeführt. Die Zuordnung der Farbstoffe zu den entsprechenden Allelen wurde gemäß der Herstellerangaben in das Auswertungsprogramm übertragen.

4. Polymerase-Kettenreaktion

Die 96-Well-Platte wurde nach der Messung der Hintergrundfluoreszenz aus dem ABI PRISM 7000 SDS (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) entnommen und in den Thermalcycler (Fa. Applied Biosystems, Foster City, California, USA) zur Durchführung der PCR gestellt. Die DNA-Amplifikation verlief unter folgenden Reaktionsbedingungen: 50°C für 2 min, 95°C für 10 min; gefolgt von 40 Zyklen (94°C, 15 Sekunden + abschließend 58°C, 1 min).

5. Genotypisierung nach erneuter Hintergrundfluoreszenzmessung

Anschließend erfolgte mit dem ABI PRISM 7000 SDS (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) in Kombination mit der Software ABI Prism 7000 SDS 1.0 Software (Perkin-Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, California, USA) eine erneute Messung der Fluoreszenzintensitäten für beide Farbstoffe. Über den Algorithmus des Computerprogramms wurde jedem Ansatz der entsprechende Genotyp zugeordnet.

Die folgende Abbildung 8 stellt ein Beispiel für die Auswertung dieser Rohdaten dar. Entsprechend der Wellenlänge der Fluoreszenz kann die DNA einem Genotyp zugeordnet werden.

Nicht einem Genotyp zugeordnete Ergebnisse wurden durch das Programm mit einem X (undetermined = unbestimmt) markiert und bedurften einer Wiederholung.

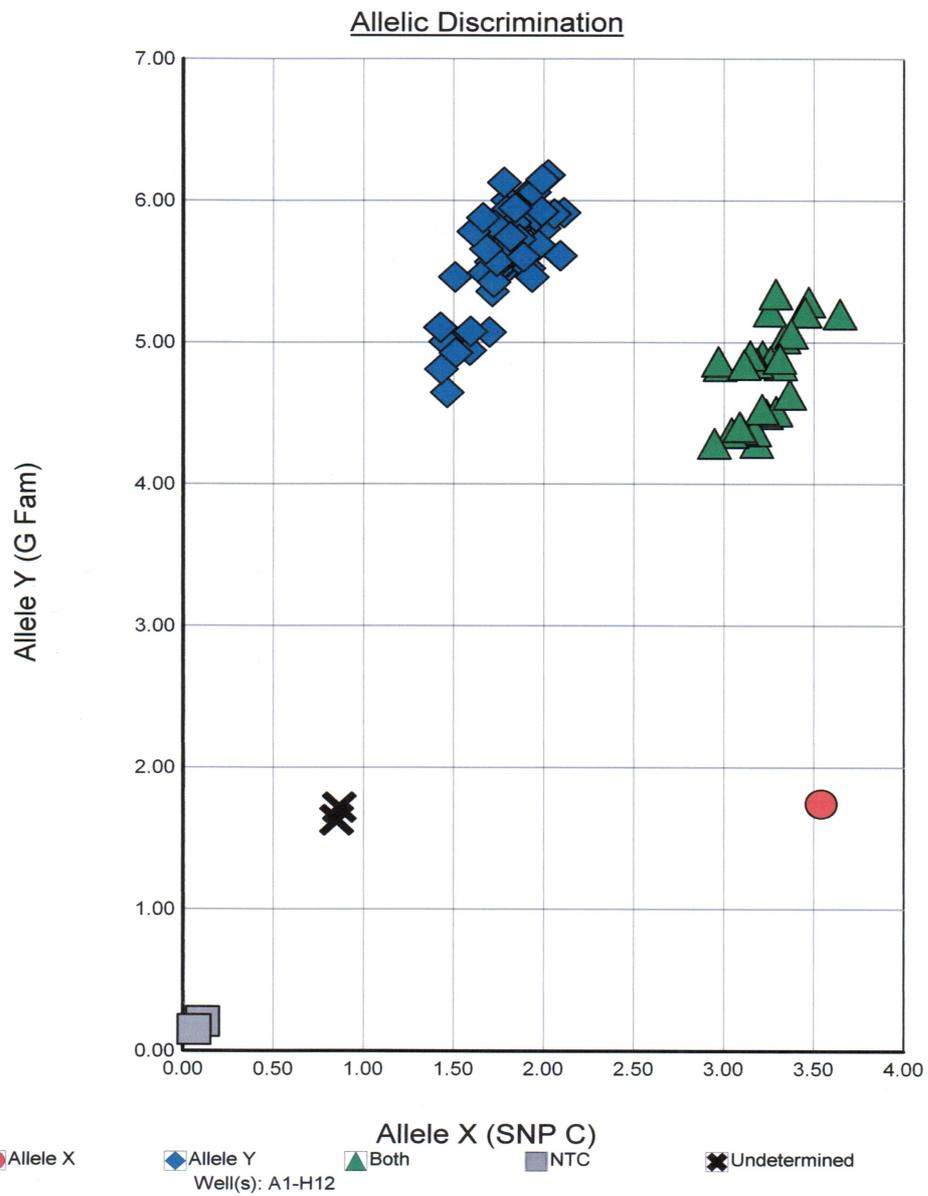


Abb. 8 Genotypisierung mithilfe des Programms ABI Prism 7000 SDS 1.0 Software (Perkin-Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, California, USA)

3.7 Sequenzierung

3.7.1 Didesoxymethode nach Sanger

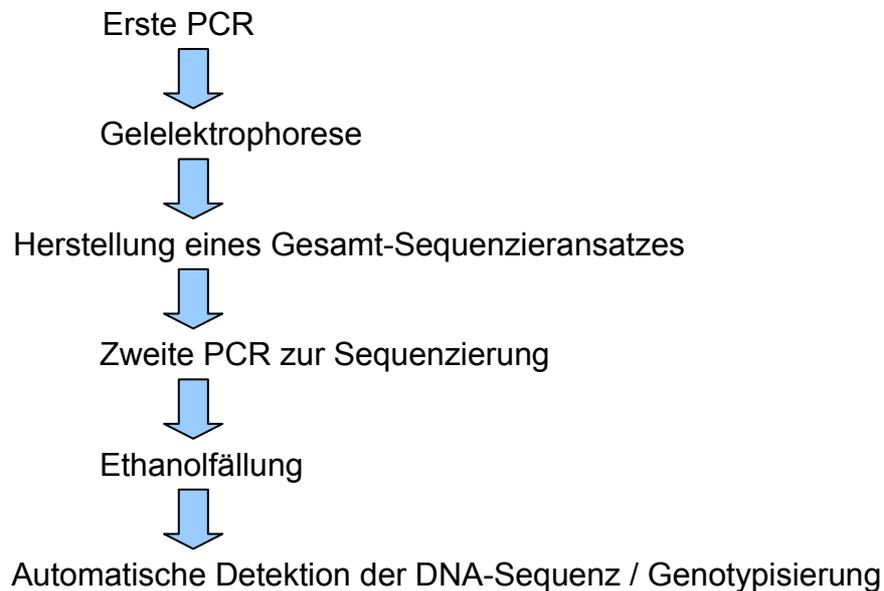
Als weitere Methode zur Genotypisierung von DNA wurde die 1977 entwickelte Didesoxy- bzw. Kettenabbruchmethode nach Sanger angewandt (100). Dabei werden dem Reaktionsansatz Didesoxynukleotide (ddNTPs) beigefügt, die bei Einbau in die DNA durch die DNA-Polymerase zum Kettenabbruch führen. Durch die fehlende OH-Gruppe am 3'-Ende der ddNTPs ist eine weitere Anlagerung von Nukleotiden an den entsprechenden Strang nicht mehr möglich. Bei einer Sequenzier-Reaktion entstehen somit DNA-Fragmente bestimmter Länge, die jeweils mit entsprechenden ddNTPs enden. Die ddNTPs sind jeweils einer der vier Basen zugeordnet. Die Arbeitsgruppe um Sanger hatte die ddNTPs radioaktiv markiert (100). Seit den 1990er Jahren benutzt man vorwiegend Fluoreszenzfarbstoffe zur Markierung der Basen. Dazu wird jedes der vier möglichen ddNTPs mit einem spezifischen Farbstoff gekoppelt. Vor der Fluoreszenzmessung müssen die Produkte der Kettenabbruchmethode kapillarelektrophoretisch aufgetrennt werden. Die DNA-Fragmente werden fluoreszenzbasiert detektiert.

3.7.2 Praktische Durchführung einer Sequenzierung

Die Sequenzierreaktion erfolgte mit dem ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Dabei wurde als Reagens das BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) verwendet. Das Sequenzierkit enthält die mit unterschiedlichen Farbstoffen markierten Nukleotide.

Die Sequenzierreaktion diente der Überprüfung der Ergebnisse, welche durch die TaqMan®-Real-time PCR entstanden sind.

Zur Genotypisierung mittels Sequenzierung wurden folgende Schritte durchgeführt:



1. Erste PCR vor Sequenzierung

Es wurde jeweils zu 3 µl auf 10 ng/µl verdünnter DNA ein Mastermix mit einem Volumen von 21 µl in ein steriles Tube hinzugegeben. Die Inhaltsstoffe des Mastermixes sind in folgender Tabelle 2 aufgelistet.

Die vor der Sequenzierreaktion notwendige PCR zur Amplifikation der DNA wurde im Thermalcycler (Fa. Applied Biosystems, Foster City, California, USA) durchgeführt. Als Annealing-Temperatur wurde 58°C gemäß der entworfenen Primer gewählt.

Tabelle 2 Mastermix für PCR für 10 DNA-Proben

| Inhaltsstoff | Volumen in μl |
|---------------------|-------------------------------------|
| Aqua bidest | 145 |
| 10x Puffer | 25 |
| MgCl ₂ | 10 |
| dNTP 2,5 mM | 20 |
| Primer (forward) | 5 |
| Primer (reverse) | 5 |
| Taq- Polymerase | 0,75 |

2. Gelelektrophorese

Der Nachweis der PCR-Produkte wurde mittels einer Gelelektrophorese erbracht, wodurch eine Erfolgskontrolle der PCR stattfand. Nur diese DNA wurde für die folgende Sequenzierreaktion genutzt.

Das Gel enthielt 1,5% Agarose in einfach konzentriertem TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer).

Nachfolgend wurden 4 μ l Ethidiumbromid hinzugegeben, welches zwischen den Basen der Nukleinsäuren interkaliert. Somit erfolgte die Detektion der PCR-Produkte.

Das Gel wurde in eine Gelkammer überführt, welche mit einem Ladepuffer (einfach konzentrierter Tris-Aacetat-EDTA-Puffer = TAE-Puffer) versehen war.

30 min nachdem ein Strom von 110 Volt angelegt wurde, konnten die Banden der Gelelektrophorese ausgewertet werden.

3. Herstellung eines Sequenzieransatzes

In jedes Well für die BigDye® Terminator-Sequenzierung wurden 1 µl PCR-Produkt, 1 µl Primer (10 M), 2 µl BigDye®-Mix und 6 µl Aqua bidest. pipettiert, so dass jedes Well 10 µl Sequenzieransatz enthielt (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3 Sequenzieransatz pro Well

| Inhaltsstoff | Volumen |
|---------------|---------|
| PCR-Produkt | 1 µl |
| Primer (10 M) | 1 µl |
| Big Dye®-Mix | 2 µl |
| Aqua bidest. | 6 µl |

4. Zweite PCR zur Sequenzierung

Mit dem Thermalcycler (Fa. Applied Biosystems, Foster City, California, USA) konnte nun die Sequenzierung der DNA-Proben unter folgenden Reaktionsbedingungen (siehe Tabelle 4) erfolgen:

Tabelle 4 Programm ABI-SEQ zur DNA-Amplifikation

| | |
|-------------|----------|
| 1. 95°C | 2:00 min |
| 2. 96°C | 0:15 min |
| 3. 45°C | 0:15 min |
| 4. 60°C | 4:00 min |
| 5. go to 2. | 24 times |
| 6. end | |

5. Ethanolfällung

Die Produkte der PCR-Sequenzierung wurden durch eine Alkoholfällung gereinigt und konzentriert.

In ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß (Fa. Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) wurden 2 µl DNA-Produkt bei intensiven Banden und 5 µl DNA-Produkt bei schwachen Banden pipettiert. Dann wurde ein Fällungsmix erstellt aus 3,3 ml Aqua bidest., 10 ml Ethanol und 0,4 ml 3M Natrium-Acetat (pH 4,8). 340 µl dieses Fällungsmixes wurden in das Eppendorf-Gefäß mit der entsprechenden DNA pipettiert. Es folgte eine Zentrifugation mit der Eppendorf Centrifuge 5610 R (Fa. Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei 2000 rpm für 15 Minuten (siehe Abb. 7). Anschließend wurde der Überstand mittels einer Vakuumpumpe entfernt.

Daraufhin wurden zu diesem Mix 300 µl 70% Ethanol gegeben gefolgt von einer erneuten Zentrifugation (2000 rpm für 7 min). Der Überstand wurde anschließend entfernt und die Probe getrocknet.

6. Automatische Detektion der DNA-Sequenz

Mithilfe des ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) konnten die Genotypen der aus der Studienpopulation gewonnenen DNA-Proben nachgewiesen werden. Vor der Analyse wurde in jedes Well 30 µl Formamid zur Denaturierung der gefällten DNA pipettiert. Die Basenpaare konnten abgelesen und somit der Genotyp der DNA bestimmt werden.

3.8 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie der Universitätsmedizin Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Sie erfolgte mit SAS 9.2 und der SPSS Software Version 17.0 (SPSS for Windows; SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

Es wurden statistische Analysen bezüglich der Relation der SNPs zu den klinischen Parametern EF, LVMI und dem 24h-Blutdruck angefertigt.

Es wurden Analysen im kodominanten, rezessiven oder dominanten Modell in Bezug auf die klinischen Zielparameter durchgeführt. Die Analyse von Haplotypen erfolgte mit der Software PHASE 2.0 (101,102). Durch die Kovarianzanalysen im ANCOVA-Modell konnten Kovariaten identifiziert und in das Modell einbezogen werden (103).

Blockweise wurden verschiedene Variablen in die Analysen integriert. Als erstes wurden die demographischen Daten Alter und Geschlecht und deren Interaktion in die Kovarianzanalyse eingefügt. Danach wurden in drei Blöcken weitere Variablen ergänzt (Block 1: kardialer Status, Block 2: Medikamente, Block 3: Laborbefunde aus der Blutuntersuchung). Nach den Analysen mithilfe der Faktoren aus den jeweiligen Blöcken wurden finale Selektionen zur Ermittlung statistisch relevanter Kovariaten durchgeführt und diese in das Modell einbezogen. Der Wert für die statistische Aussagefähigkeit (p-Wert) wurde als signifikant eingestuft, wenn $p < 0,05$ lag.

4 Ergebnisse

4.1 Charakteristika der Studienkohorte

4.1.1 Eigenschaften der Studienpopulation

Demographische und klinische Parameter der Studienpopulation sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Die 605 Patienten waren im Durchschnitt $56,2 \pm 9,4$ Jahre alt, wobei die Rekrutierung einen Anteil von 82,3% Männern ergab.

Sämtliche Patienten litten unter einer arteriellen Hypertonie (100%).

Über zwei Drittel der Studienteilnehmer wies schwerwiegende kardiovaskuläre Erkrankungen auf. So waren 442 (73,1%) der Patienten an koronarer Herzkrankheit (KHK) erkrankt und fast die Hälfte der Studienkohorte hatte mit einem zeitlichen Mindestabstand von einem Monat einen Myokardinfarkt erlitten (291 Patienten = 48,1%).

Als antihypertensive Medikamente wurden am häufigsten Beta-Blocker (83,8%) und ACE-Hemmer (69,3%) eingesetzt.

Mit N=139 (23,0%) lag der Anteil der Studienteilnehmer mit Diabetes mellitus unterhalb eines Viertels der Gesamtkohorte (N=605).

Tabelle 5 Charakteristika der Studienpopulation (N=605)

| Parameter | |
|---|-------------|
| Alter (in Jahren) | 56,2 ± 9,4 |
| Männer | 498 (82,3%) |
| Frauen | 107 (17,7%) |
| BMI (kg/m ²) | 29,6 ± 4,9 |
| Raucher | 184 (30,4%) |
| eGFR (ml x min ⁻¹ x 1,73 m ⁻²) | 78,7 ± 22,7 |
| eGFR <60 (ml x min ⁻¹ x 1,73 m ⁻²) | 77 (14,6%) |
| Arterielle Hypertonie | 605 (100%) |
| KHK | 442 (73,1%) |
| Myokardinfarkt | 291 (48,1%) |
| Diabetes mellitus | 139 (23,0%) |
| Blutdrucksenkende Medikamente | |
| ACE-Hemmer | 419 (69,3%) |
| AT1-Antagonisten | 92 (15,2%) |
| Beta-Blocker | 507 (83,8%) |
| Kalzium-Antagonisten | 108 (17,9%) |
| Diuretika | 246 (40,7%) |

Die Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung bzw. Absolutzahlen mit dem prozentualen Anteil an der Gesamtkohorte in Klammern; BMI, Body-Mass-Index; eGFR, geschätzte glomeruläre Filtrationsrate (estimated glomerular filtration rate); KHK, Koronare Herzerkrankung; ACE, Angiotensin Converting Enzym; AT1, Angiotensin-Typ 1-Rezeptor

Die Ergebnisse der Langzeitblutdruckmessung zeigt Tabelle 6. Der 24h-Blutdruck lag systolisch bei durchschnittlich $126,1 \pm 14,6$ mmHg, der durchschnittliche diastolische Wert war $76,4 \pm 9,5$ mmHg. Die höchsten Blutdruckwerte wurden sowohl systolisch ($128,6 \pm 16,1$ mmHg) wie auch diastolisch ($79,4 \pm 10,6$ mmHg) zwischen 6-10 Uhr morgens gemessen. Die niedrigsten durchschnittlichen Werte zeigten die Blutdruckmessungen bei Nacht. Der systolische Blutdruck lag in dieser Zeitperiode bei $119,1 \pm 15,8$ mmHg, der diastolische Blutdruck bei $69,9 \pm 10,1$ mmHg. Tagsüber lagen die mittleren Blutdruckwerte bei systolisch $128,3 \pm 14,8$ mmHg, diastolisch bei $78,6 \pm 9,8$ mmHg.

Tabelle 6 Werte der Langzeitblutdruckmessung in der Studienkohorte

| Langzeitblutdruckwerte (mmHg) | |
|--------------------------------------|------------------|
| systolisch über 24 h | $126,1 \pm 14,6$ |
| diastolisch über 24 h | $76,4 \pm 9,5$ |
| systolisch 6 bis 10 Uhr | $128,6 \pm 16,1$ |
| diastolisch 6 bis 10 Uhr | $79,4 \pm 10,6$ |
| systolisch bei Tag | $128,3 \pm 14,8$ |
| diastolisch bei Tag | $78,6 \pm 9,8$ |
| systolisch bei Nacht | $119,1 \pm 15,8$ |
| diastolisch bei Nacht | $69,9 \pm 10,1$ |

Die Werte sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardabweichung

4.1.2 Echokardiographische Parameter in der Studienkohorte

Durch echokardiographische Untersuchungen der Patienten wurde der LVMI gemessen (104). Der durchschnittliche LVMI lag für die Gesamtkohorte bei $49,0 \pm 22,7 \text{ g/H}^{2,7}$. Bei den Männern lag der LVMI durchschnittlich bei $49,0 \pm 23,0 \text{ g/H}^{2,7}$ und somit geringfügig unter dem Durchschnittswert der hier untersuchten Frauen ($49,4 \pm 21,7 \text{ g/H}^{2,7}$). Eine links-ventrikuläre Hypertrophie (LVH = left ventricular hypertrophy) wird definiert als $\text{LVMI} \geq 50 \text{ g/H}^{2,7}$ bei Männern und als $\text{LVMI} \geq 47 \text{ g/H}^{2,7}$ bei Frauen (92).

In der Gesamtkohorte wurde bei 230 (38,0%) Patienten eine Hypertrophie des linken Ventrikels nachgewiesen. Hierbei bezifferte sich der prozentuale Anteil bei den Frauen mit 43,9% höher als bei den Männern (36,8%). Die EF als Maß für die Herzfunktion wies einen durchschnittlichen Wert von $63,7 \pm 8,9\%$ auf.

Die Resultate der echokardiographischen Untersuchung der Patienten zeigt Tabelle 7.

Tabelle 7 Echokardiographische Parameter in der Studienkohorte

| Parameter | | |
|----------------------------|-----------|-------------|
| LVMI (g/H ^{2,7}) | insgesamt | 49,0 ± 22,7 |
| | Männer | 49,0 ± 23,0 |
| | Frauen | 49,4 ± 21,7 |
| LVH | insgesamt | 230 (38,0%) |
| | Männer | 183 (36,8%) |
| | Frauen | 47 (43,9%) |
| EF (%) | | 63,7 ± 8,9 |
| LA (mm) | | 40,9 ± 5,6 |
| LVED (mm) | | 51,9 ± 6,3 |
| LVES (mm) | | 34,1 ± 6,9 |
| E/A | | 1,1 ± 0,35 |
| IVST (mm) | | 10,6 ± 3,1 |
| PWT (mm) | | 10,2 ± 3,0 |
| RWT | | 0,40 ± 0,14 |

Die Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung bzw. Absolutzahlen mit dem prozentualen Anteil an der Gesamtkohorte in Klammern; LVMI, linksventrikulärer Massenindex; LVH, linksventrikuläre Hypertrophie; LA, left atrial diameter (Durchmesser des linken Herzvorhofs); LVED, left ventricular end-diastolic diameter (links-ventrikulärer enddiastolischer Durchmesser); LVES, left ventricular end-systolic diameter (endsystolischer Durchmesser des linken Ventrikels); EF, ejection fraction (Ejektionsfraktion); E/A, ratio of early filling velocity (E) and peak late filling velocity (A) (Verhältnis des frühen Füllungsvolumens zum späteren Spitzenwert); IVST, interventricular septum thickness (Dicke des Interventrikularseptums); PWT, posterior wall thickness (Dicke der Herzhinterwand); RWT = relative wall thickness (relative Herzwanddicke)

4.2 Genetische Analysen

Die Genotyp-Frequenzen der untersuchten SNPs rs10830962, rs4753426, rs12804291, rs10830963 und rs3781638 waren gemäß dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht verteilt (105,106). Genotypen und Haplotypen der oben aufgeführten SNPs wurden auf ihre Korrelation mit der EF, dem LVMI und dem 24h-Blutdruck analysiert.

4.2.1 Haplotyp-Frequenzen

Die aus den oben angegebenen SNPs ermittelten Haplotypen H1 und H2 mit Frequenzen von $\geq 0,150$ sind in folgender Tabelle 8 aufgeführt. Das spezifische dem entsprechenden SNP zuzuordnende Allel ist in den jeweiligen Spalten dargestellt. So ergab sich die höchste Frequenz für die Kombination CTCCC mit 0,402 (Haplotyp H1). Der Haplotyp mit der Allel-Kombination GCCGA und einer Frequenz von 0,277 wird mit H2 bezeichnet.

Tabelle 8 Die Haplotypen entsprechender SNPs mit einer Frequenz $\geq 0,150$

| Haplotyp-ID | SNP rs 10830962 | SNP rs 4753426 | SNP rs 12804291 | SNP rs 10830963 | SNP rs 3781638 | Frequenz |
|--------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------|
| H1 | C | T | C | C | C | 0,402 |
| H2 | G | C | C | G | A | 0,277 |

H, Haplotyp

4.2.2 Assoziationen der SNPs und Haplotypen mit der EF und dem LVMI

Die Analyse der Genotypen mit dem Zielparameter EF im kodominanten Modell ist in Tabelle 9 dargestellt. Für rs4753426, rs12804291 und rs3781638 ergaben sich signifikante Differenzen in der EF für die jeweiligen drei Genotypen.

Tabelle 9 Ergebnisse der genetischen Analyse im kodominanten Modell

| SNP ID | Genotyp | EF [95% CI] | p |
|---------------|----------------|--------------------|----------|
| rs10830962 | CC | 63,3 [61,3-65,2] | 0,287 |
| | CG | 63,5 [61,6-65,4] | |
| | GG | 64,9 [62,6-67,1] | |
| | TT | 63,9 [61,8-66,0] | |
| rs4753426 | TC | 62,9 [61,0-64,8] | 0,033 |
| | CC | 65,2 [63,1-67,2] | |
| | TT | 61,3 [56,0-66,5] | |
| rs12804291 | TC | 61,6 [59,2-64,0] | 0,021 |
| | CC | 64,1 [62,4-65,9] | |
| | CC | 63,1 [61,3-65,0] | |
| rs10830963 | CG | 63,6 [61,6-65,5] | 0,147 |
| | GG | 65,7 [63,0-68,4] | |
| | AA | 64,5 [62,5-66,5] | |
| rs3781638 | AC | 62,8 [60,9-64,6] | 0,011 |
| | CC | 65,3 [63,1-67,5] | |

95% CI, 95% Konfidenzintervall; p, p-Wert des ANCOVA Modells

Die Ergebnisse von Trägern gegenüber Nicht-Trägern eines bestimmten Allels im dominanten und rezessiven Modell sind in Tabelle 10 aufgeführt. Es ergaben sich folgende signifikante Ergebnisse: Das T-Allel von jeweils rs4753426 und rs12804291 war mit einer verminderten Ejektionsfraktion gegenüber den entsprechenden Nicht-Trägern assoziiert. Dies traf auch zu für das A-Allel von rs3781638.

Tabelle 10 Ergebnisse der Analyse von Trägern gegenüber Nicht-Trägern in Bezug auf die Ejektionsfraktion

| SNP-ID | Vergleich | EF Differenz in % [95% CI] | p |
|---------------|------------------|-----------------------------------|----------|
| rs 10830962 | CC+CG vs. GG | -1,49 [-3,3 – 0,4] | 0,115 |
| | CC vs. CG+GG | -0,65 [-2,1 - 0,8] | 0,362 |
| rs 4753426 | CC vs. TC+TT | 1,9 [0,3 – 3,5] | 0,020 |
| | CC+TC vs. TT | -0,3 [-1,9 – 1,3] | 0,728 |
| rs 12804291 | CC+CT vs. TT | 2,5 [-2,5 – 7,6] | 0,326 |
| | CC vs. CT+TT | 2,5 [0,8 – 4,3] | 0,006 |
| rs 10830963 | CC+CG vs. GG | -2,4 [-4,9 – 0,1] | 0,061 |
| | CC vs. CG+GG | -0,8 [-2,1 – 0,6] | 0,269 |
| rs 3781638 | AA+AC vs. CC | -1,8 [-3,6 – -0,1] | 0,038 |
| | AA vs. AC+CC | 1,0 [-0,5 – 2,4] | 0,181 |

95% CI, 95% Konfidenzintervall; p, p-Wert des ANCOVA Modells

Bei der Analyse der Haplotypen H1 und H2 zeigten Träger von H2 (63,5%, CI: 61,7 bis 65,3%) eine erhöhte EF im Vergleich zu Nicht-Trägern (61,7%, CI: 60,0 bis 63,4%). Die Differenz von 1,8% erreichte statistische Signifikanz ($p=0,009$). Analoge Analysen für Haplotyp H1 ergaben keine signifikanten Resultate. Die Ergebnisse der Haplotyp-Untersuchungen und deren Korrelation zur EF sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11 Ergebnis der genetischen Analyse von Haplotypen in Bezug auf die Ejektionsfraktion

| Haplotyp | Vergleich | EF-Differenz in % [95% CI] | p |
|-----------|------------------------|-------------------------------|-------|
| H1: CTCCC | H1 vs. Nicht-H1-Träger | 0,52 [-0,83 – 1,87] | 0,448 |
| H2: GCCGA | H2 vs. Nicht-H2-Träger | 1,81 [0,45 – 3,14] | 0,009 |

H, Haplotyp; 95% CI, 95% Konfidenzintervall; p, p-Wert des ANCOVA Modells

Bei analogen Analysen der Genotypen im kodominanten Modell und der Analyse von Allelträgern für den Zielparameter LVMI erreichten die ermittelten Ergebnisse nicht den Grad der Signifikanz. Dies traf ebenfalls zu für die Analyse der Träger von Haplotyp H1 bzw. H2 im Vergleich zu den entsprechenden Nicht-Trägern in Bezug auf den LVMI.

4.2.3 Assoziationen der SNPs und Haplotypen mit Parametern der Langzeitblutdruckmessung

Nach statistischer Auswertung der Daten konnten keine signifikanten Korrelationen der einzelnen SNPs mit den mittleren systolischen oder diastolischen 24h-Blutdruckparametern ermittelt werden.

Bei der Analyse der Haplotypen ergab sich für Träger des Haplotyps H1 (Träger: 127,5 mmHg, CI: 124,9 bis 130,0 mmHg) gegenüber den Nicht-Trägern (125,0 mmHg, CI: 122,4 bis 127,7 mmHg) ein signifikant höherer durchschnittlicher systolischer 24h-Blutdruck ($p=0,023$).

Subanalysen bezüglich verschiedener Zeitrahmen, wie bei Tag (6-22 Uhr), bei Nacht (22-6 Uhr) und am Morgen (6-10 Uhr) ergaben die höchsten mittleren systolischen Blutdruckwerte am Morgen sowohl bei Trägern von Haplotyp 1 (129,9 mmHg, CI: 127,4 bis 132,4 mmHg) als auch bei Nicht-Trägern (127,4 mmHg, CI: 124,9 bis 129,9 mmHg); der Unterschied von 2,5 mmHg zwischen Trägern und Nicht-Trägern war signifikant ($p=0,034$).

Die niedrigsten durchschnittlichen systolischen 24h-Blutdruckwerte wurden während der Nacht gemessen sowohl bei Trägern von Haplotyp H1 (119,4 mmHg, CI: 116,5 bis 122,3 mmHg), als auch bei Nicht-Trägern (116,6 mmHg, CI: 113,7 bis 119,6 mmHg). Für diesen zeitlichen Rahmen war die Differenz der mittleren systolischen Blutdruckwerte zwischen Trägern von Haplotyp H1 und Nicht-Trägern mit 2,8 mmHg maximal von allen gemessenen Zeitperioden ($p=0,019$).

Ähnliche Ergebnisse, wie die Untersuchungen am systolischen Blutdruck, zeigten die Messwerte des mittleren diastolischen 24h-Blutdrucks. Die maximale Differenz der Blutdruckwerte zwischen Trägern von Haplotyp H1 und Nicht-Trägern wurde analog zu den systolischen Werten während der Nacht gemessen (Träger: 67,4 mmHg, CI: 65,8 bis 69,0 mmHg; Nicht-Träger: 65,8 mmHg, CI: 64,1 bis 67,5 mmHg). Die Differenz betrug 1,6 mmHg. Ebenfalls analog zu den systolischen Messwerten zeigten sich die niedrigsten diastolischen Blutdruckwerte sowohl bei Trägern wie auch bei Nicht-Trägern von Haplotyp H1 während der Nacht, wobei die Werte der Träger um 1,6 mmHg höher lagen als bei Nicht-Trägern ($p=0,044$).

Träger und Nicht-Träger von Haplotyp H2 hatten die höchsten durchschnittlichen systolischen Blutdruckwerte während der Zeitperiode zwischen 6 bis 10 Uhr vormittags (Träger: 128,2 mmHg, CI: 125,6 bis 130,9 mmHg; Nicht-Träger: 129,0 mmHg, CI: 126,6 bis 131,4 mmHg) und die niedrigsten mittleren Blutdruckwerte während der Nacht (Träger: 119,4 mmHg, CI: 116,5 bis 122,3 mmHg; Nicht-Träger: 116,6 mmHg, CI: 113,7 bis 120,0 mmHg).

Bei der Messung der durchschnittlichen diastolischen 24h-Blutdruckwerte wurden analog zu den systolischen Werten die höchsten Blutdruckwerte zwischen 6 und 10 Uhr morgens ermittelt (Träger: 76,8 mmHg, CI: 75,2 bis 78,4 mmHg; Nicht-Träger: 76,8 mmHg, CI: 75,3 bis 78,3 mmHg). Die niedrigsten über den Zeitraum von 24 Stunden gemessenen Blutdruckwerte ergaben sich während der Nacht (Träger: 66,6 mmHg, CI: 64,9 bis 68,3 mmHg; Nicht-Träger: 66,7 mmHg, CI: 65,1 bis 68,3 mmHg).

Die Unterschiede in den Blutdruckwerten von Trägern und Nicht-Trägern von Haplotyp H2 erreichten bei den systolischen Werten als auch bei den diastolischen Werten in allen Zeitrahmen und über die gesamten 24 Stunden keine Signifikanz.

5 Diskussion

Eine Funktion des Hormons Melatonin besteht in der Regulation zirkadianer Rhythmen. (4). Darüber hinaus beeinflusst Melatonin auch die Physiologie des kardiovaskulären Systems (27,32–36,39–41). So verringert die Gabe von Melatonin den Blutdruck bei hypertensiven Patienten und wirkt als Radikalfänger gegen den oxidativen Stress (27). Das Indolamin Melatonin bindet an membranständige Melatoninrezeptoren, wobei besonders der Melatoninrezeptor MT2 physiologische Funktionen beim Menschen vermittelt (46). Die Bedeutung des MT2-Rezeptors wird durch Ergebnisse von Studien gestützt, die genetische Varianten im MT2-Rezeptorgen (*MTNR1B*) als signifikant assoziiert mit klinischen Parametern des Diabetes mellitus Typ II beschrieben (82-88). So wird diskutiert, dass einzelne SNPs des *MTNR1B* mit erhöhten Plasmaglukosespiegeln verbunden sind und ein genetisch bedingt erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Typ II Diabetes anzeigen könnten (87).

Aus verschiedenen experimentellen und klinischen Studien in Bezug auf das metabolische Syndrom ist bekannt, dass Stoffwechselerkrankungen wie Typ II Diabetes mit der Physiologie des kardiovaskulären Systems vernetzt sind (107,108). Daraus ergab sich für die vorliegende Arbeit die Fragestellung, ob es analog zum Diabetes mellitus auch einen genetischen Hintergrund des Melatoninsystems zu klinisch relevanten kardiovaskulären Parametern gibt.

Studienpopulation

Die Studienpopulation repräsentierte 605 kaukasische Patienten. Die Rekrutierung ergab, dass die Mehrzahl der Patienten männlich war (n=498 Männer) und der Anteil der Frauen (n=107) bei 17,7% lag (89). Sämtliche Patienten nahmen an einem kardiovaskulären Rehabilitationsprogramm in 15 Kliniken teil und hatten gemäß den Kriterien der Weltgesundheitsorganisation (WHO) eine arterielle Hypertonie (90). Die Patienten wurden nach der europäischen Leitlinie antihypertensiv medikamentös behandelt (91). Insofern lagen die durchschnittlich gemessenen 24h-Blutdruckwerte im Normbereich (siehe Tabelle 6). Auch unter dieser medikamentösen Behandlung, die bei

jedem Patienten in einer Kombinationstherapie bestand, ergab sich eine typische zirkadiane Rhythmik im Langzeitblutdruckprofil mit Tiefstwerten in der Nacht und maximalen Blutdruckwerten am Morgen zwischen 6 und 10 Uhr.

Der überwiegende Teil der Patienten wies eine koronare Herzkrankheit (KHK) auf (442 Patienten, 73,1%). Fast die Hälfte aller untersuchten Patienten erlitt einen Myokardinfarkt (291 Patienten, 48,1%, siehe Tabelle 5) mit einem zeitlichen Mindestabstand von einem Monat.

Gemäß dem Einschlusskriterium wiesen alle Patienten eine EF von mindestens 40% auf. Die durchschnittliche EF der Studienkohorte ($EF = 63,7 \pm 8,9\%$) war vereinbar mit dem Referenzbereich (109). Der Anteil der Männer mit linksventrikulärer Hypertrophie lag bei 36,8% und derjenige der Frauen bei 43,9%. Als antihypertensiv wirkende Medikation wurden überwiegend Beta-Blocker (507 Patienten, 83,8%) und ACE-Inhibitoren (419 Patienten, 69,3%) eingesetzt.

Zusammenfassend wurden daher in der vorliegenden Arbeit Patienten unter klinischen Bedingungen und standardisierter Behandlung untersucht, wobei schwer erkrankte Patienten, z. B. mit ausgeprägter Herzinsuffizienz gemäß der Einschlusskriterien nicht repräsentiert waren.

Genetische Analyse im Verhältnis zur Ejektionsfraktion

Ein wesentliches Ergebnis der vorliegenden Untersuchung war, dass Träger des Haplotyps H2 gegenüber Nicht-Trägern eine um 1,8% erhöhte EF ($p=0,009$) aufwiesen. Dieser Haplotyp hatte eine Frequenz von 0,277.

Die signifikante Assoziation könnte darauf hindeuten, dass genetische Variationen in *MTNR1B* eine Rolle für die kardiale Wirkung des Melatonins nach dessen Bindung an kardiale MT2-Rezeptoren spielen. Der Befund, dass das Melatoninsystem kardiovaskuläre Funktionen beeinflusst, wurde durch verschiedene experimentelle Studien gezeigt (27,30-41).

So konnte in einem grundlegenden Experiment 1978 an Ratten nachgewiesen werden, dass eine Pinealektomie zu einer Hypertonie bei den Tieren führt (32), die durch Gabe von Melatonin reversibel ist (33). Weitergehende Studien wiesen darauf hin, dass die

Wirkung des Melatonins auf das Herz-Kreislauf-System auf einem antioxidativen Effekt des Indolamins beruht (27,36). Melatonin wirkt dabei als Radikalfänger und vermindert den oxidativen Stress. Es wird diskutiert, dass dieser antioxidative Effekt nicht nur durch direkte Wechselwirkung mit den Sauerstoffradikalen erfolgt, sondern auch über Melatoninrezeptoren vermittelt wird. So soll Melatonin antioxidative Enzyme aktivieren und pro-oxidative Enzyme deaktivieren (110). Insofern könnten genetische Varianten des Rezeptors prinzipiell zur Modulation der antioxidativen Wirkung von Melatonin führen. Die Bindung von Melatonin an Melatoninrezeptoren vermittelt über den Phospholipase C – Signaltransduktionsweg die Expression antioxidativer Enzyme, wie z. B. Glutathion-Peroxidase. Die Glutathion-Peroxidase spielt eine wichtige Rolle, um als Antioxidans eine Entwicklung oder ein Fortschreiten kardiovaskulärer Erkrankungen zu verhindern (111). Neben der Aktivierung der antioxidativen Enzyme wird über die Phospholipase C – Signaltransduktion auch die direkte Radikalfängeraktivität des Melatonins unterstützt (111,112). Melatonin reagiert dabei mit reaktiven Stickstoffspezies (RNI – reactive nitrogen species) und mit reaktiven Sauerstoffspezies (ROS – reactive oxygen species), zu denen die freien Radikale, aber auch stabile molekulare Oxidantien gehören (110). Den ROS wird eine Funktion bei der Ausbildung kardiovaskulärer Erkrankungen wie der Hypertonie zugeschrieben (113). Exogene ROS können bei kardialen Myozyten zur Dysfunktion und letztendlich sogar zur Nekrose führen, indem sie die mitochondriale Funktion stören. Ferner hemmen sie die Kalziumaufnahme und den -transport im sarkoplasmatischen Retikulum und reduzieren die kalzium-abhängige ATPase-Aktivität (114). Hier könnte es möglich sein, Melatonin oder deren Analoga therapeutisch zur Verbesserung der kardialen Funktion zu nutzen. Es wird diskutiert, dass Melatonin den RNI und ROS entgegenwirken kann im Sinne einer Schutzfunktion für die Mitochondrien in den Zellen. Dies geschieht vorwiegend über den antioxidativen bzw. antinitrosativen Effekt, sowie über die antiinflammatorische Wirkung des Melatonins (115). Weiterhin gibt es Hinweise, dass Melatonin rezeptorvermittelt den Kalziumhaushalt innerhalb von Zellen regulieren kann. Somit hat das Hormon eine antagonistische Wirkung zu den ROS. Dabei kann durch Gabe von Melatonin die Suppression der kalzium-abhängigen ATPase im kardialen Sarkolemm verringert werden. Weiterhin werden die Dichte der Kalzium-Kanäle und der Kalziumtransport erhöht. Der Kalziumhaushalt stellt einen wichtigen Faktor für die

Kontraktilität der Kardiomyozyten dar (116,117). In einer in vivo-Studie an Mäusen und Ratten zeigte sich durch die Gabe von Melatonin ein reduziertes Auftreten von iatrogen ausgelösten myokardialen Infarkten (79). In einer weiteren in vivo-Studie an Ratten mit experimentell ausgelöster renovaskulärer Hypertonie litten die Tiere an einer ausgeprägten kardialen Dysfunktion und es lag eine signifikant verringerte Expression von antioxidativen Enzymen, wie z.B. der Glutathion-Peroxidase vor. Nach anschließender Gabe von Melatonin konnte eine Blutdruckreduktion und eine verbesserte linksventrikuläre Funktion festgestellt werden. Dies zeigte sich auch in einem Trend für eine erhöhte und somit verbesserte Ejektionsfraktion (118).

Damit konform gehen die Ergebnisse einer in vivo-Studie an anästhesierten Schweinen, welche intrakoronare Melatonininfusionen erhalten haben. Daraufhin verbesserten sich signifikant der koronare Blutfluss und die kardiale Funktion. Diese Wirkung des Melatonins konnte innerhalb jener Studie durch Melatoninrezeptorantagonisten aufgehoben werden (119). Dies unterstreicht einerseits die Bedeutung von Melatonin, aber eben auch die der Melatoninrezeptoren für die kardiale Funktion.

Es wird neben dem therapeutischen Einsatz von Melatonin auch der von Melatoninrezeptoragonisten und -antagonisten im Bereich des kardiovaskulären Systems untersucht. Neuerdings wird diskutiert, dass Melatonin und Melatoninrezeptoragonisten den Augeninnendruck senken und somit bei erhöhtem Augeninnendruck therapeutisch eingesetzt werden könnten (120).

Ergänzend soll erwähnt sein, dass nicht nur das Melatonin, sondern auch seine oxidativen Metaboliten nach aktueller Studienlage eine antioxidative und kardioprotektive Wirkung haben (121,122). Zu den untersuchten Metaboliten gehören N1-Acetyl-N2-formyl-5-methoxykynurenin (AFMK) und N1-Acetyl-5-methoxykynurenin (AMK). Somit wird deutlich, dass der Melatoninstoffwechsel Einflüsse auf das kardiovaskuläre System aufweist und viele dieser Eigenschaften durch die Melatoninrezeptoren vermittelt werden.

Genetische Analyse im Verhältnis zum LVMI

Weder in der Genotyp-, noch in der Carrier- oder der Haplotypanalyse zeigten sich signifikante Korrelationen des *MTNR1B* mit dem linksventrikulären Massenindex LVMI. Dies verläuft parallel zu experimentellen Tierstudien, bei denen ein kardioprotektiver Effekt von Melatonin durch seine antioxidative Wirkung nachgewiesen wurde, gleichzeitig jedoch keine reduzierende Wirkung des Melatonins auf die linksventrikuläre Masse vorlag (122). Jedoch zeigten sich durch den Einfluss des Melatonins eine verminderte linksventrikuläre Fibrose (122,123). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Melatonin eher einen stabilisierenden Einfluss auf die kardiale Struktur hat.

An spontan-hypertensiven Ratten konnte der Blutdruck durch die Gabe von Melatonin signifikant reduziert werden, während das relative Gewicht des linken Ventrikels unverändert blieb. Auch in dieser Studie wurde eine Verminderung linksventrikulär fibrotischer Prozesse beobachtet, es kam somit zu einem verminderten linksventrikulären Remodelling (124). Die Abnahme von Umbauprozessen zeichnete sich auch durch eine verringerte Bildung von Kollagen und dem reduzierten Gehalt an der Aminosäure Hydroxyprolin aus. Interessanterweise reagierte das Melatonin auf zellulärer Ebene, also rezeptorvermittelt, indem es die Expression des Kernfaktors NF- κ B verminderte. Neben vielfältigen anderen Funktionen wird dem Kernfaktor NF- κ B eine Rolle bei der Auslösung von Bluthochdruck zugeschrieben (123). Dieser Aspekt bestätigt erneut die Wichtigkeit der Melatoninrezeptoren für das kardiale System.

In einer experimentellen Studie mit Kardiomyozyten präsentierte sich durch Melatonin neben einem antioxidativen Effekt auch eine antihypertrophe Wirkung (125). Somit ist anzunehmen, dass ein antihypertropher Effekt von Melatonin auf den linken Ventrikel unter bestimmten noch nicht näher bekannten Bedingungen möglich ist. Dennoch stellt die aktuelle Studienlage die Wirkungen des Melatonins in Bezug auf ein vermindertes kardiales Remodelling in den Vordergrund. Damit im Einklang steht der Befund, dass Melatonin Matrixmetalloproteinasen regulieren kann (126). Diese Enzyme wirken bei strukturellen Umbauprozessen wie Proliferation, Angiogenese, Apoptose, Invasion und auch Metastasierung entscheidend mit und sind eingebunden in das kardiale Remodelling (126).

Genetische Analyse im Verhältnis zum Langzeitblutdruck

Als weiteres wesentliches Resultat der vorliegenden Arbeit wurde nach der statistischen Analyse ein um 2,5 mmHg erhöhter systolischer 24h-Blutdruck bei Trägern des Haplotypen H1 im Vergleich zu Nicht-Trägern vorgefunden ($p=0,023$). Parallel hierzu zeigte sich bei der Analyse des diastolischen 24h-Blutdrucks ein erhöhter Wert um 2,8 mmHg bei Trägern von H1 gegenüber den Nicht-Trägern ($p=0,019$).

Eine hypotensive Wirkung des Melatonins konnte bereits vor über 40 Jahren an pinealektomierten Ratten nachgewiesen werden (32). Nach der Pinealektomie stieg der Blutdruck, durch Zugabe von exogenem Melatonin konnte der Blutdruck wieder normalisiert werden (33). Die physiologische Grundlage der hypotensiven Wirkung des Melatonins ist noch nicht vollständig verstanden. Verschiedene Mechanismen wie ein direkt-hypothalamischer Effekt, eine Verminderung der Katecholaminspiegel, eine Relaxation der glatten Gefäßwandmuskelzellen der Aorta und die antioxidative Komponente werden als blutdrucksenkende Mechanismen diskutiert (36). Auch die Wechselwirkungen des Melatonins mit Stickstoffmonoxid (NO), welches oxidativen Stress auslöst, sind eng mit einer Regulation des Blutdrucks verbunden (30,31). Hier wird dem Melatonin ein antihypertensiver Effekt durch die Erhöhung der NO-Produktion und der damit verbundenen vasodilatatorischen Wirkung zugeschrieben.

Es wird diskutiert, dass auch die Melatoninrezeptoren eng mit der Blutdruckregulation in Verbindung stehen. In Untersuchungen ergaben sich hierbei kontroverse Ergebnisse. So zeigte sich sowohl eine Vasodilatation über einen verstärkten rezeptorvermittelten Eintritt von Ca^{2+} in Endothelzellen (77), aber auch vasokonstriktorische und blutdrucksteigernde Effekte werden in der Literatur beschrieben (42,59).

Antihypertensive Wirkungen im Zusammenhang mit Melatoninrezeptoren konnten in peripheren Gefäßen aufgezeigt werden, ebenso wie in jenen Teilen des Zentralnervensystems, welche an der Blutdruckkontrolle beteiligt sind (127). Die direkte Aktivierung von Melatoninrezeptoren dämpft hierbei den sympathischen Tonus.

Es gibt Hinweise, dass Melatonin durch Aktivierung seiner dazugehörigen Rezeptoren an Endothelzellen und glatten Gefäßwandmuskelzellen den Blutdruck regulieren kann, und dass durch die Aktivierung der MT1/MT2-Rezeptoren Gegenregulationsmechanismen bei einer Hypotension gehemmt werden (30).

Insgesamt gesehen wirkt Melatonin im Zusammenhang mit den Melatoninrezeptoren antihypertensiv. Die exakten physiologischen Hintergründe sind Gegenstand weiterer Forschung.

Die Ergebnisse in Bezug auf die Genetik des Diabetes mellitus Typ II

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten SNPs wurden bewusst auf dem Hintergrund ausgewählt, dass diese in vorhergehenden Untersuchungen signifikante Assoziationen mit klinischen Parametern des Diabetes mellitus Typ II zeigten (81-88). Parallel hierzu konnten mit der vorliegenden Studie nun wiederum genetische Assoziationen mit kardiovaskulären Parametern, besonders mit der EF, gefunden werden. Dies bildet auf genetischer Ebene die vielfältige Bedeutung des Melatoninsystems für physiologische Prozesse ab. Eventuelle signifikante Zusammenhänge zu weiteren physiologischen Körpersystemen sind denkbar. Außerdem wird dabei die Bedeutung der rezeptorvermittelten Signalübertragung des Melatonins unterstrichen. Die neuen Ergebnisse zeigen jedoch auch, dass die genetischen Zusammenhänge verschiedener physiologischer Funktionen komplex sind. So konnten keine gemeinsamen Risikoallele für den Diabetes mellitus Typ II und den pathologischen Abweichungen von kardiovaskulären Parametern identifiziert werden. Es zeigten z.B. Allele, für welche eine genetische Assoziation mit erhöhten Plasmaglukosespiegeln beschrieben wurde, jetzt keine Assoziation mit erhöhten 24h-Blutdruckwerten oder mit einer erniedrigten EF. Dies unterstreicht, dass weitere physiologische Untersuchungen zum Verständnis wichtig sind.

Grenzen der Studie

Die vorliegende Untersuchung weist einige wichtige Limitationen auf.

Genetische Assoziationsstudien können lediglich Hinweise für pathophysiologische Zusammenhänge liefern, sie klären jedoch keine Kausalitäten. Insofern wären jetzt weitergehende experimentelle Untersuchungen sinnvoll, die klären, ob die Signaltransduktion durch diese genetischen Varianten moduliert wird. Außerdem sind die Effektgrößen in genetischen Assoziationsstudien gering, so dass deren unmittelbare klinische Bedeutung grundlegend wiederholt kontrovers diskutiert wird.

Die vorliegenden Ergebnisse beziehen sich auf Patienten mit arterieller Hypertonie, die nach Leitlinie medikamentös behandelt wurden. Außerdem waren deutlich mehr Männer (82,3%) als Frauen in die Studie eingeschlossen. Insofern müssen die Resultate in diesem besonderen Zusammenhang interpretiert werden und dürfen nicht ungeprüft auf Kohorten mit anderen Eigenschaften übertragen werden. Interessant wäre ebenfalls die Überprüfung der vorliegenden Ergebnisse an einer gesunden Kontrollgruppe.

Die kardialen Parameter wurden mittels Echokardiographie bestimmt. Diese Untersuchungsmethode ist beim vorliegenden Patientenkollektiv nicht optimal. Eine Magnetresonanztomographie (MRT) würde eine genauere Untersuchungsmethode darstellen als die Ultraschalluntersuchung. Allerdings war diese Methode in der vorliegenden Studie aus praktischen und logistischen Gründen nicht durchführbar.

Ausblick

Die vorliegende genetische Assoziationsstudie unterstreicht eine mögliche funktionelle Bedeutung des Melatoninsystems für klinisch relevante kardiovaskuläre Parameter.

Sie weist dabei auf mögliche individuelle Unterschiede für die rezeptorvermittelte Wirkung von Melatonin hin. Beim therapeutischen Einsatz von Melatonin könnte sich daraus die Chance ergeben, die Therapie individuell anzupassen. Auf der Grundlage der vorliegenden Ergebnisse sind jedoch nun physiologische Untersuchungen wichtig, die klären, welche funktionellen Veränderungen die untersuchten Geno- und Haplotypen in der Signaltransduktion des MT₂-Rezeptors nach sich ziehen.

6 Literaturverzeichnis

1. Brennan R, Jan JE, Lyons CJ. Light, dark, and melatonin: emerging evidence for the importance of melatonin in ocular physiology. *Eye (Lond)*. 2007 Juli;21(7):901–8.
2. Susko I, Mornjaković Z, Alicelebić S, Cosović E, Beganović A. [Retinal and pineal melatonin--from a circadian signal to therapeutic use]. *Med Arh*. 2004;58(1):61–4.
3. Arendt J. Melatonin and the mammalian pineal gland. Eds. Chapman and Hall, London; 1995 Jan. ISBN 10: 0412536005
4. Zawilska JB, Skene DJ, Arendt J. Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms. *Pharmacol Rep*. 2009 Juni;61(3):383–410.
5. Dubocovich ML, Delagrange P, Krause DN, Sugden D, Cardinali DP, Olcese J. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. *Pharmacol. Rev*. 2010 Sep;62(3):343–80.
6. Kitay, JI, Altschule, MD. The Pineal Gland-A Review of Physiological Literature. *Harvard University Press*. Cambridge, Massachusetts; 1954;
7. Minneman KP, Wurtman RJ. The pharmacology of the pineal gland. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 1976;16:33–51.
8. López-Muñoz F, Marín F, Alamo C. [The historical background of the pineal gland: II. From the seat of the soul to a neuroendocrine organ]. *Rev Neurol*. 2010 Jan 16;50(2):117–25.
9. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes¹. *Journal of the American Chemical Society*. 1958 Mai 1;80(10):2587.
10. Arendt J. Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Rev. Reprod*. 1998 Jan;3(1):13–22.
11. Axelrod J, Weissbach H. Purification and properties of hydroxyindole-O-methyl transferase. *J. Biol. Chem*. 1961 Jan;236:211–3.
12. Zlotos DP. Recent advances in melatonin receptor ligands. *Arch. Pharm. (Weinheim)*. 2005 Juni;338(5-6):229–47.
13. Scheer M, Grote A, Chang A, et al. BRENDA, the enzyme information system in 2011. *Nucleic Acids Res*. 2011 Jan;39(Database issue):D670–676.
14. Brzezinski A. Melatonin in humans. *N. Engl. J. Med*. 1997 Jan 16;336(3):186–95.

15. Claustrat B, Brun J, Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev.* 2005 Feb;9(1):11–24.
16. Falcón J, Besseau L, Fuentès M, Sauzet S, Magnanou E, Boeuf G. Structural and functional evolution of the pineal melatonin system in vertebrates. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2009 Apr;1163:101–11.
17. Illnerová H, Zvolsky P, Vaněček J. The circadian rhythm in plasma melatonin concentration of the urbanized man: the effect of summer and winter time. *Brain Res.* 1985 Feb 25;328(1):186–9.
18. Cardinali DP, Esquifino AI, Srinivasan V, Pandi-Perumal SR. Melatonin and the immune system in aging. *Neuroimmunomodulation.* 2008;15(4-6):272–8.
19. Kappers JA. The development, topographical relations and innervation of the epiphysis cerebri in the albino rat. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 1960;52:163–215.
20. Macchi MM, Bruce JN. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol.* 2004 Dez;25(3-4):177–95.
21. Kappers JA. Short history of pineal discovery and research. *Prog. Brain Res.* 1979;52:3–22.
22. Borjigin J, Li X, Snyder SH. The pineal gland and melatonin: molecular and pharmacologic regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1999;39:53–65.
23. Arendt J. Melatonin and human rhythms. *Chronobiol. Int.* 2006;23(1-2):21–37.
24. Arendt J. Melatonin: characteristics, concerns, and prospects. *J. Biol. Rhythms.* 2005 Aug;20(4):291–303.
25. Dijk DJ, Cajochen C. Melatonin and the circadian regulation of sleep initiation, consolidation, structure, and the sleep EEG. *J. Biol. Rhythms.* 1997 Dez;12(6):627–35.
26. Arendt J, Skene DJ. Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Med Rev.* 2005 Feb;9(1):25–39.
27. Korkmaz A, Reiter RJ, Topal T, Manchester LC, Oter S, Tan DX. Melatonin: an established antioxidant worthy of use in clinical trials. *Mol. Med.* 2009 Feb;15(1-2):43–50.
28. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 1956 Juli;11(3):298–300.
29. Giannoulia-Karantana A, Vlachou A, Polychronopoulou S, Papassotiriou I, Chrousos GP. Melatonin and immunomodulation: connections and potential clinical applications. *Neuroimmunomodulation.* 2006;13(3):133–44.

30. Paulis L, Simko F. Blood pressure modulation and cardiovascular protection by melatonin: potential mechanisms behind. *Physiol Res.* 2007;56(6):671–84.
31. Silva CLM, Tamura EK, Macedo SMD, et al. Melatonin inhibits nitric oxide production by microvascular endothelial cells in vivo and in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 2007 Mai;151(2):195–205.
32. Zanoboni A, Forni A, Zanoboni-Muciaccia W, Zanussi C. Effect of pinealectomy on arterial blood pressure and food and water intake in the rat. *J. Endocrinol. Invest.* 1978 Apr;1(2):125–30.
33. Holmes SW, Sugden D. Proceedings: The effect of melatonin on pinealectomy-induced hypertension in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 1976 März;56(3):360P–361P.
34. Girouard H, Denault C, Chulak C, de Champlain J. Treatment by n-acetylcysteine and melatonin increases cardiac baroreflex and improves antioxidant reserve. *Am. J. Hypertens.* 2004 Okt;17(10):947–54.
35. Nava M, Quiroz Y, Vaziri N, Rodriguez-Iturbe B. Melatonin reduces renal interstitial inflammation and improves hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2003 März;284(3):F447–454.
36. Sewerynek E. Melatonin and the cardiovascular system. *Neuro Endocrinol. Lett.* 2002 Apr;23 Suppl 1:79–83.
37. Reiter RJ, Tan DX, Korkmaz A. The circadian melatonin rhythm and its modulation: possible impact on hypertension. *J Hypertens Suppl.* 2009 Aug;27(6):S17–20.
38. Ersoylu ZD, Tuğcu A, Yildirimtürk O, Aytakin V, Aytakin S. [Comparison of the incidences of left ventricular hypertrophy, left ventricular diastolic dysfunction, and arrhythmia between patients with dipper and non-dipper hypertension]. *Türk Kardiyol Dern Ars.* 2008 Juli;36(5):310–7.
39. Escames G, Khaldy H, León J, González L, Acuña-Castroviejo D. Changes in iNOS activity, oxidative stress and melatonin levels in hypertensive patients treated with lacidipine. *J. Hypertens.* 2004 März;22(3):629–35.
40. Cagnacci A, Arangino S, Angiolucci M, Maschio E, Melis GB. Influences of melatonin administration on the circulation of women. *Am. J. Physiol.* 1998 Feb;274(2 Pt 2):R335–338.
41. Arangino S, Cagnacci A, Angiolucci M, et al. Effects of melatonin on vascular reactivity, catecholamine levels, and blood pressure in healthy men. *Am. J. Cardiol.* 1999 Mai 1;83(9):1417–9.
42. Dubocovich ML. Melatonin receptors: are there multiple subtypes? *Trends Pharmacol. Sci.* 1995 Feb;16(2):50–6.

43. Ebisawa T, Karne S, Lerner MR, Reppert SM. Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994 Juni 21;91(13):6133–7.
44. Reppert SM, Godson C, Mahle CD, Weaver DR, Slaugenhaupt SA, Gusella JF. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995 Sep 12;92(19):8734–8.
45. Reppert SM, Weaver DR, Cassone VM, Godson C, Kolakowski LF. Melatonin receptors are for the birds: molecular analysis of two receptor subtypes differentially expressed in chick brain. *Neuron.* 1995 Nov;15(5):1003–15.
46. Dubocovich ML, Rivera-Bermudez MA, Gerdin MJ, Masana MI. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *Front. Biosci.* 2003 Sep 1;8:d1093–1108.
47. Dubocovich ML, Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine.* 2005 Juli;27(2):101–10.
48. Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T, Mahle CD, Kolakowski LF. Cloning of a melatonin-related receptor from human pituitary. *FEBS Lett.* 1996 Mai 20;386(2-3):219–24.
49. Nosjean O, Ferro M, Coge F, et al. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J. Biol. Chem.* 2000 Okt 6;275(40):31311–7.
50. Becker-André M, Wiesenberg I, Schaeren-Wiemers N, et al. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J. Biol. Chem.* 1994 Nov 18;269(46):28531–4.
51. Mazurais D, Brierley I, Anglade I, et al. Central melatonin receptors in the rainbow trout: comparative distribution of ligand binding and gene expression. *J. Comp. Neurol.* 1999 Juni 28;409(2):313–24.
52. Alarma-Estrany P, Pintor J. Melatonin receptors in the eye: location, second messengers and role in ocular physiology. *Pharmacol. Ther.* 2007 März;113(3):507–22.
53. Kumar Kharwar R, Haldar C. Anatomical and histological profile of bronchus-associated lymphoid tissue and localization of melatonin receptor types (Mel(1a) and Mel(1b)) in the lung-associated immune system of a tropical bird, *Perdicula asiatica*. *Acta Histochem* 2011 May;113(3):333-9.
54. Konturek SJ, Konturek PC, Brzozowska I, et al. Localization and biological activities of melatonin in intact and diseased gastrointestinal tract (GIT). *J. Physiol. Pharmacol.* 2007 Sep;58(3):381–405.

55. Drew JE, Williams LM, Hannah LT, Barrett P, Abramovich DR. Melatonin receptors in the human fetal kidney: 2-[125I]iodomelatonin binding sites correlated with expression of Mel1a and Mel1b receptor genes. *J. Endocrinol.* 1998 Feb;156(2):261–7.
56. Torres-Farfan C, Richter HG, Rojas-García P, et al. mt1 Melatonin receptor in the primate adrenal gland: inhibition of adrenocorticotropin-stimulated cortisol production by melatonin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003 Jan;88(1):450–8.
57. Slominski A, Pisarchik A, Zbytek B, Tobin DJ, Kauser S, Wortsman J. Functional activity of serotonergic and melatonergic systems expressed in the skin. *J. Cell. Physiol.* 2003 Juli;196(1):144–53.
58. Viswanathan M, Laitinen JT, Saavedra JM. Expression of melatonin receptors in arteries involved in thermoregulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1990 Aug;87(16):6200–3.
59. Capsoni S, Viswanathan M, De Oliveira AM, Saavedra JM. Characterization of melatonin receptors and signal transduction system in rat arteries forming the circle of Willis. *Endocrinology.* 1994 Juli;135(1):373–8.
60. Ekmekcioglu C, Haslmayer P, Philipp C, et al. Expression of the MT1 melatonin receptor subtype in human coronary arteries. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 2001 Feb;21(1):85–91.
61. Ekmekcioglu C, Thalhammer T, Humpeler S, et al. The melatonin receptor subtype MT2 is present in the human cardiovascular system. *J. Pineal Res.* 2003 Aug;35(1):40–4.
62. von Gall C, Stehle JH, Weaver DR. Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res.* 2002 Juli;309(1):151–62.
63. Morgan PJ, Barrett P, Hazlerigg D, et al. Melatonin receptors couple through a cholera toxin-sensitive mechanism to inhibit cyclic AMP in the ovine pituitary. *J. Neuroendocrinol.* 1995 Mai;7(5):361–9.
64. Kokkola T, Laitinen JT. Melatonin receptor genes. *Ann. Med.* 1998 Feb;30(1):88–94.
65. McNulty S, Ross AW, Shiu KY, Morgan PJ, Hastings MH. Phosphorylation of CREB in ovine pars tuberalis is regulated both by cyclic AMP-dependent and cyclic AMP-independent mechanisms. *J. Neuroendocrinol.* 1996 Aug;8(8):635–45.
66. Ross AW, Barrett P, Mercer JG, Morgan PJ. Melatonin suppresses the induction of AP-1 transcription factor components in the pars tuberalis of the pituitary. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1996 Okt 14;123(1):71–80.
67. Godson C, Reppert SM. The Mel1a melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways. *Endocrinology.* 1997 Jan;138(1):397–404.

68. Peschke E. Melatonin, endocrine pancreas and diabetes. *J. Pineal Res.* 2008 Jan;44(1):26–40.
69. Petit L, Lacroix I, de Coppet P, Strosberg AD, Jockers R. Differential signaling of human Mel1a and Mel1b melatonin receptors through the cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate pathway. *Biochem. Pharmacol.* 1999 Aug 15;58(4):633–9.
70. Chan ASL, Lai FPL, Lo RKH, Voyno-Yasenetskaya TA, Stanbridge EJ, Wong YH. Melatonin mt1 and MT2 receptors stimulate c-Jun N-terminal kinase via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins. *Cell. Signal.* 2002 März;14(3):249–57.
71. Arendt J, Rajaratnam SMW. Melatonin and its agonists: an update. *Br J Psychiatry.* 2008 Okt;193(4):267–9.
72. Eser D, Baghai TC, Möller HJ. Agomelatine: The evidence for its place in the treatment of depression. *Core Evid.* 2010;4:171–9.
73. Zammit G, Schwartz H, Roth T, Wang-Weigand S, Sainati S, Zhang J. The effects of ramelteon in a first-night model of transient insomnia. *Sleep Med.* 2009 Jan;10(1):55–9.
74. Hardeland R. Tasimelteon, a melatonin agonist for the treatment of insomnia and circadian rhythm sleep disorders. *Curr Opin Investig Drugs.* 2009 Juli;10(7):691–701.
75. Herxheimer A, Petrie KJ. Melatonin for preventing and treating jet lag. *Cochrane Database Syst Rev.* 2001;(1):CD001520.
76. Oxenkrug GF, Bachurin SO, Prakhie IV, Zefirov NS. Quinone reductase 2 and antidepressant effect of melatonin derivatives. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2010 Juni;1199:121–4.
77. Pogan L, Bissonnette P, Parent L, Sauvé R. The effects of melatonin on Ca(2+) homeostasis in endothelial cells. *J. Pineal Res.* 2002 Aug;33(1):37–47.
78. Sallinen P, Mänttari S, Leskinen H, et al. The effect of myocardial infarction on the synthesis, concentration and receptor expression of endogenous melatonin. *J. Pineal Res.* 2007 Apr;42(3):254–60.
79. Chen Z, Chua CC, Gao J, Hamdy RC, Chua BHL. Protective effect of melatonin on myocardial infarction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003 Mai;284(5):H1618–1624.
80. Lochner A, Genade S, Davids A, Ytrehus K, Moolman JA. Short- and long-term effects of melatonin on myocardial post-ischemic recovery. *J. Pineal Res.* 2006 Jan;40(1):56–63.
81. Peschke E, Stumpf I, Bazwinsky I, Litvak L, Dralle H, Mühlbauer E. Melatonin and type 2 diabetes - a possible link? *J. Pineal Res.* 2007 Apr;42(4):350–8.

82. Bouatia-Naji N, Bonnefond A, Cavalcanti-Proença C, et al. A variant near MTNR1B is associated with increased fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes risk. *Nat. Genet.* 2009 Jan;41(1):89–94.
83. Chambers JC, Zhang W, Zabaneh D, et al. Common genetic variation near melatonin receptor MTNR1B contributes to raised plasma glucose and increased risk of type 2 diabetes among Indian Asians and European Caucasians. *Diabetes.* 2009 Nov;58(11):2703–8.
84. Liu C, Wu Y, Li H, et al. MTNR1B rs10830963 is associated with fasting plasma glucose, HbA1C and impaired beta-cell function in Chinese Hans from Shanghai. *BMC Med. Genet.* 2010;11:59.
85. Prokopenko I, Langenberg C, Florez JC, et al. Variants in MTNR1B influence fasting glucose levels. *Nat. Genet.* 2009 Jan;41(1):77–81.
86. Reiling E, van't Riet E, Groenewoud MJ, et al. Combined effects of single-nucleotide polymorphisms in GCK, GCKR, G6PC2 and MTNR1B on fasting plasma glucose and type 2 diabetes risk. *Diabetologia.* 2009 Sep;52(9):1866–70.
87. Staiger H, Machicao F, Schäfer SA, et al. Polymorphisms within the novel type 2 diabetes risk locus MTNR1B determine beta-cell function. *PLoS ONE.* 2008;3(12):e3962.
88. Takeuchi F, Katsuya T, Chakrewarthy S, et al. Common variants at the GCK, GCKR, G6PC2-ABCB11 and MTNR1B loci are associated with fasting glucose in two Asian populations. *Diabetologia.* 2010 Feb;53(2):299–308.
89. Löw M, Stegmaier C, Ziegler H, Rothenbacher D, Brenner H. [Epidemiological investigations of the chances of preventing, recognizing early and optimally treating chronic diseases in an elderly population (ESTHER study)]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 2004 Dez 3;129(49):2643–7.
90. 1999 World Health Organization--International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension. Guidelines Sub-Committee. *Blood Press Suppl.* 1999;1:9–43.
91. Cifkova R, Erdine S, Fagard R, et al. Practice guidelines for primary care physicians: 2003 ESH/ESC hypertension guidelines. *J. Hypertens.* 2003 Okt;21(10):1779–86.
92. De Simone G, Devereux RB, Daniels SR, Koren MJ, Meyer RA, Laragh JH. Effect of growth on variability of left ventricular mass: assessment of allometric signals in adults and children and their capacity to predict cardiovascular risk. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1995 Apr;25(5):1056–62.
93. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985 Dez 20;230(4732):1350–4.

94. Brock TD, Freeze H. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a Nonsporulating Extreme Thermophile. *J Bacteriol.* 1969 Apr;98(1):289–97.
95. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol. Aspects Med.* 2006 Juni;27(2-3):95–125.
96. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N.Y.).* 1992 Apr;10(4):413–7.
97. Cardullo RA, Agrawal S, Flores C, Zamecnik PC, Wolf DE. Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Dez;85(23):8790–4.
98. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Aug 15;88(16):7276–80.
99. Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* 1995 Juni;4(6):357–62.
100. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Dez;74(12):5463–7.
101. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am. J. Hum. Genet.* 2001 Apr;68(4):978–89.
102. Stephens M, Scheet P. Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing-data imputation. *Am. J. Hum. Genet.* 2005 März;76(3):449–62.
103. Sir Ronald Fisher. The correlation between relatives on the supposition of Mendelian inheritance. *Trans. Roy. Soc. Edinb.* 1918 Okt 1;52:399–433.
104. Baessler A, Kwitek AE, Fischer M, et al. Association of the Ghrelin receptor gene region with left ventricular hypertrophy in the general population: results of the MONICA/KORA Augsburg Echocardiographic Substudy. *Hypertension.* 2006 Mai;47(5):920–7.
105. Hardy GH. Mendelian proportions in a mixed population. 1908. *Yale J Biol Med.* 2003;76(2):79-80.
106. Stern C. The Hardy–Weinberg law. *Science.* 1943 Feb 5;97(2510):137-8.
107. De Vegt F, Dekker JM, Ruhé HG, et al. Hyperglycaemia is associated with all-cause and cardiovascular mortality in the Hoorn population: the Hoorn Study. *Diabetologia.* 1999 Aug;42(8):926–31.

108. Barr ELM, Zimmet PZ, Welborn TA, et al. Risk of cardiovascular and all-cause mortality in individuals with diabetes mellitus, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance: the Australian Diabetes, Obesity, and Lifestyle Study (AusDiab). *Circulation*. 2007 Juli 10;116(2):151–7.
109. Herold, GD. Innere Medizin. Köln: Eigenverlag, 2007. ISBN 10: 3890197043
110. Tengattini S, Reiter RJ, Tan DX, Terron MP, Rodella LF, Rezzani R. Cardiovascular diseases: protective effects of melatonin. *J. Pineal Res*. 2008 Jan;44(1):16–25.
111. Karajibani M, Hashemi M, Montazerifar F, Bolouri A, Dikshit M. The status of glutathione peroxidase, superoxide dismutase, vitamins A, C, E and malondialdehyde in patients with cardiovascular disease in Zahedan, Southeast Iran. *J. Nutr. Sci. Vitaminol*. 2009 Aug;55(4):309–16.
112. Hardeland R, Cardinali DP, Srinivasan V, Spence DW, Brown GM, Pandi-Perumal SR. Melatonin--a pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Prog. Neurobiol*. 2011 März;93(3):350–84.
113. Sugamura K, Keaney JF Jr. Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free Radic. Biol. Med*. 2011 Sep 1;51(5):978–92.
114. Lefer DJ, Granger DN. Oxidative stress and cardiac disease. *Am. J. Med*. 2000 Sep;109(4):315–23.
115. Acuña Castroviejo D, López LC, Escames G, López A, García JA, Reiter RJ. Melatonin-mitochondria interplay in health and disease. *Curr Top Med Chem*. 2011 Jan;11(2):221–40.
116. Chen LD, Kumar P, Reiter RJ, et al. Melatonin prevents the suppression of cardiac Ca(2+)-stimulated ATPase activity induced by alloxan. *Am. J. Physiol*. 1994 Juli;267(1 Pt 1):E57–62.
117. Chen LD, Kumar P, Reiter RJ, et al. Melatonin reduces 3H-nitrendipine binding in the heart. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. 1994 Okt;207(1):34–7.
118. Erşahin M, Sehirli O, Toklu HZ, et al. Melatonin improves cardiovascular function and ameliorates renal, cardiac and cerebral damage in rats with renovascular hypertension. *J. Pineal Res*. 2009 Aug;47(1):97–106.
119. Grossini E, Molinari C, Uberti F, Mary DASG, Vacca G, Caimmi PP. Intracoronary melatonin increases coronary blood flow and cardiac function through β -adrenoreceptors, MT1/MT2 receptors, and nitric oxide in anesthetized pigs. *J. Pineal Res*. 2011 Sep;51(2):246–57.
120. Alarma-Estrany P, Guzman-Aranguez A, Huete F, et al. Design of novel melatonin analogs for the reduction of intraocular pressure in normotensive rabbits. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 2011 Juni;337(3):703–9.

121. Hevia D, Botas C, Sainz RM, et al. Development and validation of new methods for the determination of melatonin and its oxidative metabolites by high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis, using multivariate optimization. *J Chromatogr A*. 2010 Feb 19;1217(8):1368–74.
122. Reiter RJ, Manchester LC, Fuentes-Broto L, Tan DX. Cardiac hypertrophy and remodelling: pathophysiological consequences and protective effects of melatonin. *J. Hypertens*. 2010 Sep;28 Suppl 1:S7–12.
123. Simko F, Pechanova O. Remodelling of the heart and vessels in experimental hypertension: advances in protection. *J. Hypertens*. 2010 Sep;28 Suppl 1:S1–6.
124. Simko F, Pechanova O, Pelouch V, et al. Effect of melatonin, captopril, spironolactone and simvastatin on blood pressure and left ventricular remodelling in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens Suppl*. 2009 Aug;27(6):S5–10.
125. Ghosh G, De K, Maity S, et al. Melatonin protects against oxidative damage and restores expression of GLUT4 gene in the hyperthyroid rat heart. *J. Pineal Res*. 2007 Jan;42(1):71–82.
126. Swarnakar S, Paul S, Singh LP, Reiter RJ. Matrix metalloproteinases in health and disease: regulation by melatonin. *J. Pineal Res*. 2011 Jan;50(1):8–20.
127. Simko F, Paulis L. Melatonin as a potential antihypertensive treatment. *J. Pineal Res*. 2007 Apr;42(4):319–22.

7 Lebenslauf

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

8 Publikationsliste

Huber M, Treszl A, Reibis R, Teichmann C, Zergibel I, Bolbrinker J, Scholze J, Wegscheider K, Völler H, Kreutz R.

Genetics of melatonin receptor type 2 is associated with cardiac function in patients with arterial hypertension.

eingereicht bei: Eur J Intern Med.

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die mir die Kraft und Motivation gegeben haben diese Dissertation anzufangen und letztendlich auch zu vollenden.

Mein Dank gilt meinen Eltern Dr. Volker und Dr. Michaela Teichmann, die mich vor allem im Studium unterstützt und angespornt haben. Auch der „freie Freitag“ während meiner Assistenzarztzeit hat mir sehr geholfen. Viele Stunden konnte ich an den Freitagen erst im Labor und später in der Bibliothek sinnvoll nutzen.

Vielen Dank an meine Großeltern Herbert und Sieglinde Sobkowiak. Ihr habt mich von klein auf unterstützt und immer an mich geglaubt!

Ein großes Dankeschön an Ingke! Du hast mich in den vielen Stunden, die wir debattiert haben immer wieder neu motiviert und mir ständig neue Denkanstöße für das Verfassen dieser Arbeit gegeben. Wenn ich frustriert gewesen bin, warst Du immer für mich da!

Ein besonderer Dank geht an meinen Betreuer Dr. Matthias Huber. Sie haben mich gut geleitet während der Zeit der klinischen Forschung, sowie später während des Verfassens der Arbeit und mir oft neue Ideen aufgezeigt.

Vielen Dank an Frau Katrin Kossatz, die mir während meiner experimentellen Phase tatkräftig zur Seite stand! Ein Dankeschön an alle weiteren Kollegen aus der klinischen Pharmakologie, die dafür gesorgt haben, dass ich die Arbeit im Labor als sehr angenehm in einem freundlichen Arbeitsklima empfunden habe.

Ein großes Dankeschön an Professor Dr. Kreutz. Sie haben mir meine Promotion in Ihrer Abteilung ermöglicht, obwohl Sie wussten, dass ich voll berufstätig bin. Trotzdem haben Sie daran geglaubt, dass ich in der übrigen Zeit meine Forschungen mit Erfolg bei Ihnen im Institut durchführen kann!

Vielen Dank an Patrick und Gesche und alle Freunde, Verwandten und Patienten, speziell Frau Dr. Baldauf, die immer ein offenes Ohr und ermunternde Worte für mich parat hatten!

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Christopher Teichmann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Genetische Assoziation des Melatoninrezeptors mit der kardialen Funktion bei Patienten mit arterieller Hypertonie“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Christopher Teichmann hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation: Huber M, Treszl A, Reibis R, Teichmann C, Zergibel I, Bolbrinker J, Scholze J, Wegscheider K, Völler H, Kreuz R; Genetics of melatonin receptor type 2 is associated with cardiac function in patients with arterial hypertension; eingereicht bei: Eur J Intern Med

Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen): Datenerhebung

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin