

A novel molecular marker for endothelin-A receptor gene — lack of association between G1354C polymorphism and arterial disease in males

Nowy marker molekularny genu dla receptora endotelinowego typu A — brak zależności między polimorfizmem G1354C a chorobą miażdżycową tętnic u mężczyzn

Daniel P. Potaczek, Marek Sanak, Marek Krzanowski, Andrzej Szczeklik

Department of Internal Medicine, Collegium Medicum, Jagiellonian University, Cracow, Poland
(II Katedra Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie)

Abstract

Background. There is some evidence pointing toward endothelin system involvement in pathogenesis of atherosclerosis, manifested as coronary heart disease (CHD) and peripheral arterial occlusive disease (PAOD).

Material and methods. In the study, 133 male patients — 46 with CHD (age 47.1 ± 4.12 years), 87 with PAOD (51.7 ± 5.31) and 87 healthy controls (46.35 ± 3.81) were genotyped by a polymerase chain reaction and restrictive fragments length polymorphism (PCR-RFLP) for a endothelin-A receptor (ENDRA) polymorphism. The allelic and genotype frequencies were compared between the groups using the χ^2 test.

Results. The novel single nucleotide polymorphism of the ENDRA gene (G1354C) was studied as a marker in CHD or PAOD. Genotype distribution in each of the groups did not deviate from the Hardy-Weinberg equilibrium. The allelic and genotype frequencies of the ENDRA gene did not differ between the groups. The allele G frequencies were 0.522 in CHD group, 0.506 in PAOD patients and 0.483 in controls.

Conclusions. No genetic association between allelic variants of ENDRA and CHD or PAOD was found. It is unlikely that genetic variation at this ENDRA gene locus could contribute to the pathogenesis of arterial disease.

Key words: atherosclerosis, endothelin, ENDRA, peripheral arterial occlusive disease, coronary heart disease, single nucleotide polymorphism, genetic association

Streszczenie

Wstęp. Istnieją przesłanki wskazujące na udział układu endotelin w patogenezie miażdżycy objawiającej się klinicznie jako choroba wieńcowa (CHD) i choroba obwodowych naczyń tętniczych (PAOD).

Material i metody. Badaniem objęto 133 chorych mężczyzn — 46 osób z CHD w wieku $47,1 \pm 4,12$ roku, 87 pacjentów z PAOD w wieku $51,7 \pm 5,31$ roku oraz grupę kontrolną 87 zdrowych mężczyzn w wieku $46,35 \pm 3,81$ roku. Genotypowanie polimorfizmu genu dla receptora endotelinowego typu A (ENDRA) wykonano z zastosowaniem reakcji łańcuchowej polimerazy i polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP-PCR). Porównano częstości występowania alleli i genotypów pomiędzy grupami, posługując się testem χ^2 .

Wyniki. Poszukiwano asocjacji genetycznej nowego polimorfizmu pojedynczego nukleotydu genu ENDRA (G1354) z występowaniem CHD i PAOD. We każdej z grup częstości występowania genotypów były zgodne z prawem Hardy'ego-Weinberga. Częstości alleliczne i genotypowe genu ENDRA nie różniły się istotnie w badanych grupach. Częstość występowania allelu G wynosiła 0,522 u osób z CHD; 0,506 u pacjentów z PAOD i 0,483 w grupie kontrolnej.

Address for correspondence (Adres do korespondencji):

Prof. dr Andrzej Szczeklik, II Katedra Chorób Wewnętrznych UJ
ul. Skawińska 8, 31–066 Kraków
tel: + 48 (12) 430 51 69, fax: + 48 (12) 430 52 03
e-mail: mmszczek@cyf-kr.edu.pl

Wnioski. Nie stwierdzono asocjacji genetycznej między wariantami allelicznymi ENDRA a CHD i PAOD. Zbadany wariant genetyczny genu dla receptora endoteliny nie wiąże się z ryzykiem miażdżycy tętnic.

Słowa kluczowe: miażdżycza, endotelina, ENDRA, choroba tętnic obwodowych, choroba wieńcowa, polimorfizm pojedynczego nukleotydu, asocjacja genetyczna

Introduction

The endothelin (ET) family consists of at least of three isoforms: ET-1, ET-2 and ET-3. They act mainly in the cardiovascular (CV) system, especially ET-1, produced by endothelial cells. Two types of ET receptors were cloned: endothelin receptor A (ENDRA) and endothelin receptor B (ENDRB). ENDRA is distributed on vascular smooth-muscle cells (VSMC) and mediates vasoconstriction. ETs, ET-converting enzymes (ECEs) and ET receptors form the ET system, which plays a role in the regulation of CV homeostasis. ETs counterbalance vascular relaxation produced by nitric oxide, prostacycline or atrial and brain natriuretic peptides (ANP and BNP), thus influencing arterial blood pressure. ETs in combination with natriuretic peptides and the angiotensin system also regulates blood volume [1–4].

There is some evidence that ETs participate in pathogenesis of vascular diseases such as congestive heart failure (CHF), atherosclerosis (CHD — coronary heart disease, PAOD — peripheral arterial occlusive disease), pulmonary hypertension, systemic arterial hypertension and brain stroke.

Besides the potent impact on vasomotor tone, in atherosclerosis, ET-1 acts as a chemoattractant for inflammatory cells, activating them and stimulating cytokine production. This leads to oxidization of low-density lipoprotein (LDL). ETs remodel VSMC by promoting muscle cell hypertrophy and collagen production. Fibroblasts stimulated by ETs produce matrix components. Blood platelets respond to ETs by primary and secondary aggregation [5–9].

Two classes of drugs affecting ET system were described: ET receptor antagonists and ECE inhibitors. Clinical application of the orally active mixed antagonist of ENDRA and ENDRB bosentan was evaluated. ET modifying drugs were proposed for treatment of CHF, arterial hypertension, pulmonary hypertension, symptomatic atherosclerosis and subarachnoid haemorrhage [10–12].

We did a mutational screening of ENDRA loci using single strand conformation polymorphism and found a novel G1354C single nucleotide polymorphism (SNP) [13]. The aim of this study was to search for any associations between genetic variants of the ENDRA gene and two atherosclerotic conditions, PAOD and CHD.

Wstęp

Rodzina endoteliny (ET) obejmuje co najmniej trzy izoformy tego peptydu: ET-1, ET-2 i ET-3. Miejszem ich działania jest głównie układ sercowo-naczyniowy, zwłaszcza w przypadku wytwarzanej przez komórki śródbłonka ET-1. Sklonowano 2 typy receptorów ET: receptor endotelinowy typu A (ENDRA) i receptor endotelinowy typu B (ENDRB). Pierwszy z nich jest zlokalizowany na komórkach mięśni gładkich ściany naczyniowej (VSMC) i pośredniczy w skurczu naczyń. Endoteliny, enzymy konwertujące endotelinę (ECE) i receptory ET tworzą układ ET, który odgrywa rolę w regulacji homeostazy układu sercowo-naczyniowego. Endoteliny równoważą naczyniorozkurczowe działanie tlenu azotu, prostacykliny, a także przedsionkowego i mózgowego peptydu natriuretycznego (ANP i BNP), wpływając tym samym na ciśnienie tętnicze. Wspólnie z peptydami natriuretycznymi i układem angiotensyny regulują również wypełnienie łóżyska naczyniowego [1–4].

Istnieją dowody na to, że ET biorą udział w patogenezie chorób układu krążenia, takich jak zastoinowa niewydolność serca (CHF), miażdżycza, choroba wieńcowa serca (CHD), choroba obwodowych naczyń tętniczych (PAOD), nadciśnienie płucne, nadciśnienie tętnicze i udar mózgu.

W przebiegu miażdżycy, oprócz wywierania silnego wpływu na napięcie wazomotoryczne, ET-1 działa jako czynnik chemotaktyczny dla komórek zapalnych, aktywując je i pobudzając wytwarzanie cytokin. Prowadzi to do oksydacji lipoprotein o małej gęstości (LDL). Sprzyjając przerostowi komórek mięśniowych i wytwarzaniu kolagenu, ET wywołuje przebudowę VSMC. Pobudzone przez ET fibroblasty wytwarzają składniki macierzy międzykomórkowej. Endoteliny działają na płytki krwi, wywołując agregację pierwotną i wtórną [5–9].

Z dwóch klas leków wpływających na układ ET (antagonistów receptorowych ET oraz inhibitorów ECE) zastosowanie kliniczne znalazła postać doustna mieszanego antagonisty ENDRA i ENDRB — bosentanu. Sugerowano również potencjalne zastosowanie tych leków w terapii CHF, nadciśnienia tętniczego, nadciśnienia płucnego, objawowej miażdżycy i krwotoku podpajęczynówkowego [10–12].

Table I. Charakterystyka badanych pacjentów
Tabela I. Characteristics of the subjects studied

	Controls Grupa kontrolna	Patients with PAOD Pacjenci z PAOD	Patients with CHD Pacjenci z CHD
n	87	87	46
Age, mean \pm SD (years) Wiek (lata)	46.35 \pm 3.81	51.7 \pm 5.31	47.1 \pm 4.12
Fasting homocysteine [μ mol/l] Stężenie homocysteiny na czczo	15.27 \pm 3.97	14.7 \pm 5.66	15.6 \pm 6.36
Diabetes Cukrzyca	0%	16.4%	4.5%
Hypertension Nadciśnienie tętnicze	22%	31.5%	21%
Fontaine scale score, mean (1–4) Średnia w skali Fontaine'a	0	2	0.33
Coronary heart disease Choroba wieńcowa serca	0	21%	100%
Tobacco smokers (%) Osoby palące tytoń	52.5	90	75

PAOD — peripheral arterial occlusive disease (choroba obwodowych naczyń wieńcowych); CHD — coronary heart disease (choroba wieńcowa serca)

Material and methods

Study group

Male patients with CHD ($n = 46$, age 47.1 ± 4.12 years) were diagnosed by clinical manifestation (stable angina) and their disease was confirmed by coronarography. Male patients with PAOD ($n = 87$, age 51.7 ± 5.31 years; mean Fontaine scale score = 2) were diagnosed on clinical criteria followed by angiographic examination. The control group consisted of 87 healthy men (age 46.35 ± 3.81 years). Risk factors for atherosclerosis like diabetes mellitus, hypertension, tobacco smoking and elevated fasting homocysteine were ascertained in all groups. Clinical characteristics of the studied subjects are given in Table I.

ENDRA genotyping

DNA was extracted from peripheral blood leukocytes by a standard method. ENDRA G1354C SNP was genotyped by PCR-RFLP method. Amplification was carried out using Taq polymerase (0.75 U, Finnzymes, Espoo, Finland), and specific primers: 5'-CAGACCG-GAGCAGCCATAAG and 5'-TACCTTGCGGTTTTG-GAAAGC in 30 μ L volume 7.5 pmol each, with 3 μ L of STR buffer (Promega, Madison, WI) and 0.1 μ g of genomic DNA. Thermal profile was 95°C for 2 min followed by 34 cycles of 95°C — 30 s, 58°C — 30 s and 72°C for 1 min, with the final extension at 72°C for 10 min. Quality of amplification was controlled by 0.75% agarose gel electrophoresis (Figure 1). PCR product was digested with restrictive endonuclease *Mae III* (2U, Roche, Germany) at 55°C overnight (Figure 2). Restriction frag-

Metodą polimorfizmu konformacyjnego pojedynczego łańcucha DNA poszukiwano mutacji w obrębie locus ENDRA i znaleziono nowy polimorfizm pojedynczego nukleotydu (SNP) G1354C [13]. Celem niniejszego badania było wykrycie zależności między wariantami genetycznymi genu ENDRA i dwiema chorobami o etiologii miażdżycowej — PAOD i CHD.

Material i metody

Badana grupa

Mężczyzn z CHD ($n = 46$) w wieku $47,1 \pm 4,12$ roku zdiagnozowano na podstawie obrazu klinicznego (stabilna dławica piersiowa), a rozpoznanie potwierdzono koronarograficznie. Diagnozę PAOD u 87 chorych mężczyzn w wieku $51,7 \pm 5,31$ roku (średnia niedokrwienia w skali Fontaine'a = 2) postawiono na podstawie kryteriów klinicznych i wykonanego następnie badania angiograficznego. Grupa kontrolna obejmowała 87 zdrowych mężczyzn w wieku $46,35 \pm 3,81$ roku. We wszystkich grupach oceniono czynniki ryzyka miażdżycy, takie jak cukrzyca, nadciśnienie tętnicze, palenie tytoniu i zwiększone stężenie homocysteiny w osoczu na czczo. Charakterystykę kliniczną badanych przedstawiono w tabeli I.

Oznaczanie genotypu ENDRA

Za pomocą standardowej metody nieenzymatycznej z leukocytów krwi obwodowej izolowano DNA. Genotyp SNP ENDRA G1354C oznaczano przy użyciu techniki amplifikacji polimerazową reakcją łańcuchową i trawienia restrykcyjnego (PCR-RFLP). Amplifikację przeprowadzono w objętości 30 μ l z zastosowaniem

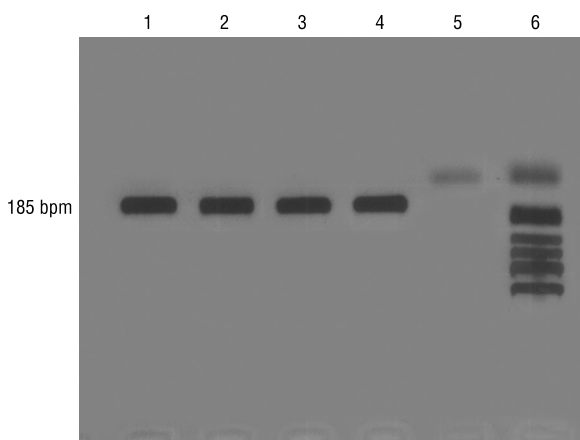


Figure 1. Results of polymerase chain reaction. Agarose gel electrophoresis with ethidium bromide staining. '185 bp' indicates an expected fragment size (lanes 1–4). Lane 5 — a blank sample. A size marker (pBR322/AluI) — lane 6

Rycina 1. Wynik reakcji łańcuchowej polimerazy. Elektroforeza w żelu agarozowym barwionym bromkiem etydy. „185 bp” (bp — pary zasad) — spodziewany produkt reakcji (ścieżki 1–4). Ścieżka 5 — kontrola reakcji. Marker długości DNA (pBR322/AluI) — ścieżka 6

ments were separated and genotypes scored (Figure 3) on acrylamide gel using automated electrophoresis (AlfExpress, Pharmacia, Sweden).

Polymorphism sequencing

To verify the polymorphic site of allelic variants we sequenced amplification products of 2 opposite homozygotes. The amplification products, after purification with High Pure PCR Purification Kit (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany), were directly sequenced by dideoxy terminator method, using BigDye Sequencing kit v. 3.0 on ABI Prism 377 sequencing instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Results

We found a novel ENDRA G1354C SNP, which was useful for genetic association studies. Genotypes distributions in the groups studied conformed to the Hardy-Weinberg equilibrium. The genotype and allelic distribution of the ENDRA G1354C polymorphism is presented in Table II. The variant G allele frequencies were 0.522 in the CHD group, 0.506 in PAOD patients and no significant difference was found between patients and healthy controls in whom this allele was observed with frequency 0.483.

Discussion

Single nucleotide polymorphisms could play a role in atherosclerosis related CV diseases, such as CHD and PAOD. In some studies, the associations between different polymorphisms and PAOD or CHD were investi-



Figure 2. The fragments of genotyped alleles. The Mae III restriction site is shown in frame. The presence of cytosine (underlined) in the allele cut by restrictase

Rycina 2. Fragmenty alleli, których genotypy oznaczano. Miejsce trawienia Mae III ujęto w ramce. Restryktaza rozcina fragment, gdy obecna jest cytozyna (podkreślona)

polimerazy *Taq* (0,75 U, Finnzymes, Espoo, Finlandia) i swoistych primerów: 5'-CAGACCGGAGCAGCCATA-AG i 5'-TACCTTGCGGTTTTGGAAAGC (oba po 7,5 pmol), oraz 3 μ l buforu STR (Promega, Madison, WI) i 0,1 μ g DNA genomowego. Profil termiczny reakcji był następujący: 95°C przez 2 min, a dalej 34 cykle (95°C — 30 s, 58°C — 30 s i 72°C — 1 min), z końcowym etapem elongacji 72°C przez 10 min. Jakość amplifikacji oceniono w elektroforezie w 0,75-procentowym żelu agarozowym (ryc. 1). Produkt PCR trawiono endonukleazą restrykcyjną *Mae III* (2U, Roche, Niemcy) w 55°C, przez 12 godz. (ryc. 2). Fragmenty restrykcyjne rozdzielano na żelu akrylamidowym z zastosowaniem elektroforezy automatycznej (AlfExpress, Pharmacia, Szwecja), uzyskując tym samym wynik genotypowania (ryc. 3).

Sekwencjonowanie polimorfizmu

W celu weryfikacji miejsca polimorficznego przeprowadzono sekwencjonowanie produktów amplifikacji u dwóch przeciwstawnych homozygot. Produkty amplifikacji, po oczyszczeniu z zastosowaniem zestawu High Pure PCR Purification Kit (Boehringer Mannheim, Mannheim, Niemcy) poddano bezpośredniemu sekwencjonowaniu metodą znakowanych dideoksyterminatorów, przy użyciu zestawu BigDye Sequencing kit v. 3.0 na sekwenatorze ABI Prism 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA, Stany Zjednoczone).

Wyniki

Znaleziony przez autorów niniejszej pracy nowy polimorfizm typu SNP genu ENDRA — G1354C — okazał się użyteczny do badań asocjacji genetycznych. Rozkład częstości genotypów w niniejszym badaniu był zgodny z prawem równowagi Hardy'ego-Weinberga. Częstości genotypów i alleli dla polimorfizmu ENDRA G1354C przedstawiono w tabeli II. Częstość alleliczna wariantu G wynosiła 0,522 w grupie osób z CHD oraz 0,506 wśród pacjentów z PAOD, co nie stanowiło istotnej różnicy w porównaniu z częstością zanotowaną w grupie kontrolnej, w której stwierdzono występowanie tego allelu w 0,483 zbadanych chromosomów.

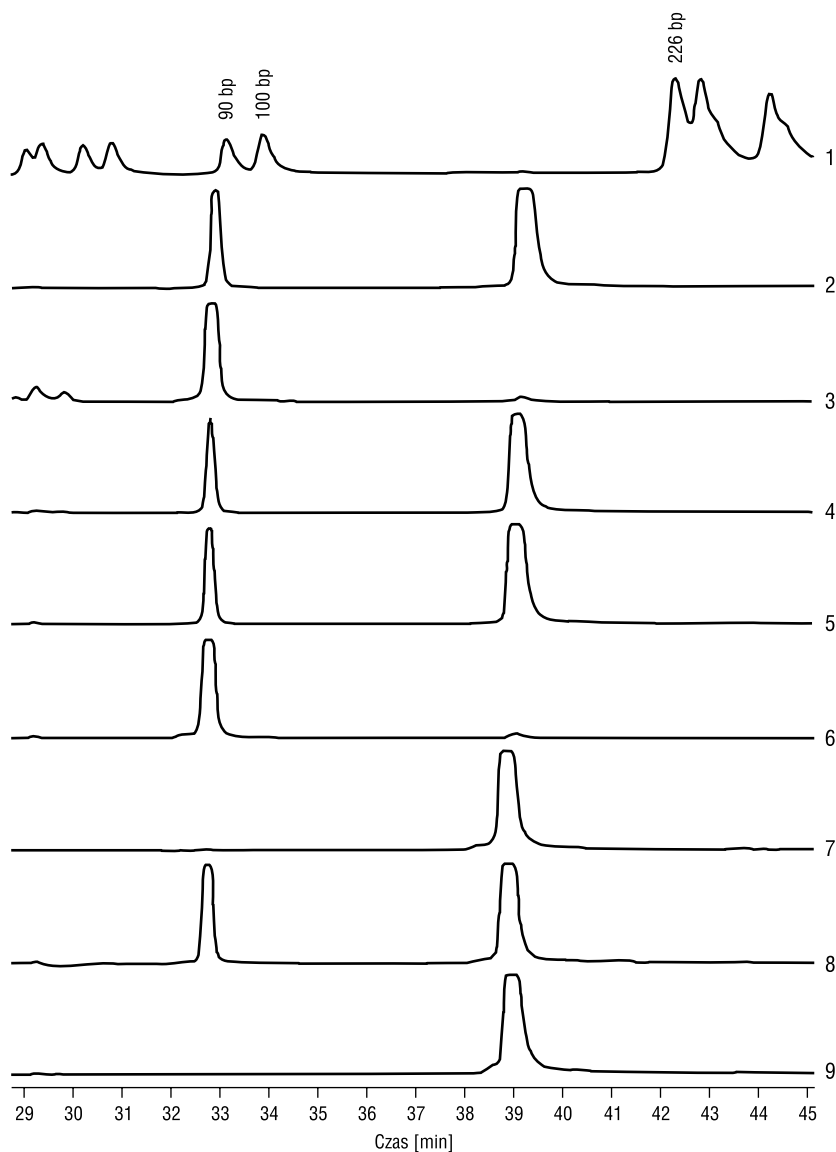


Figure 3. Results of genotyping. Polyacrylamide gel electrophoresis. Lane 1 — a size marker. Lanes 2, 4, 5 and 8 — heterozygotes (C/G). Lanes 3 and 6 — C/C homozygotes. Lanes 7 and 9 — G/G homozygotes. The length of indicative fragments pointed

Rycina 3. Wyniki genotypowania. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym. Ścieżka 1 — wskaźnik długości; ścieżki 2, 4, 5 i 8 — heterozygoty (C/G), ścieżki 3 i 6 — homozygoty C/C, ścieżki 7 i 9 — homozygoty G/G. Zaznaczono długość charakterystycznych fragmentów restrykcyjnych (bp — pary zasad). Na osi poziomej przedstawiono czas elektroforezy w minutach

Table II. Genotype and allelic frequencies of ENDRA G1354C SNP

Tabela II. Częstości genotypów i allelu G dla polimorfizmu G1354C ENDRA

	Controls Grupa kontrolna (n = 87)	Patients with PAOD Pacjenci z PAOD (n = 87)	Patients with CHD Pacjenci z CHD (n = 46)
Genotype frequency (n) Częstość genotypu (n)			
C/C	0.276 (24)	0.253 (22)	0.2 (9)
C/G	0.483 (42)	0.483 (42)	0.56 (26)
G/G	0.241 (21)	0.264 (23)	0.24 (11)
Allelic frequency Częstość allelu G	0.483	0.506	0.522

PAOD — peripheral arterial occlusive disease (choroba obwodowych naczyń wieńcowych); CHD — coronary heart disease (choroba wieńcowa serca)

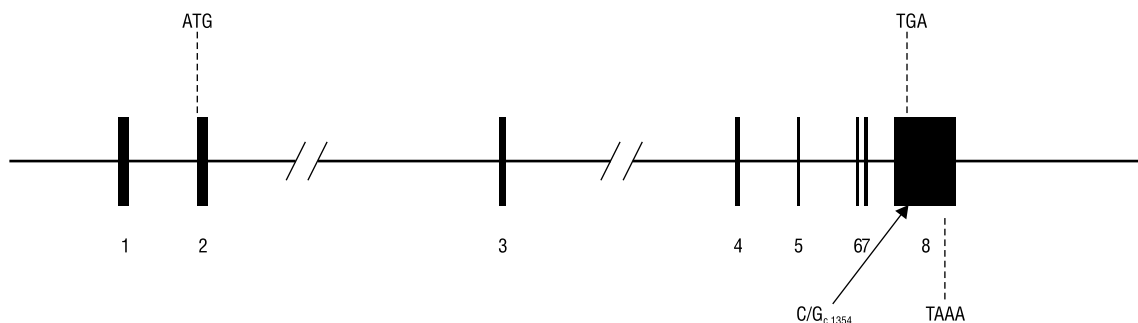


Figure 4. Schematic representation of the endothelin A receptor gene. The sites for translation initiation (ATG) and termination (TGA) are indicated. Exons are represented by closed boxes and are numbered

Rycina 4. Schemat genu genu receptora endothelinowego typu A. Zaznaczono miejsca inicjacji (ATG) i terminacji translacji (TGA). Eksony przedstawiono w formie czarnych ponumerowanych prostokątów

gated. For example, it was shown that K469E polymorphism of the ICAM-1 gene was a risk factor for PAOD, whereas C242T SNP of the p22 PHOX gene is not associated with PAOD [14, 15]. Similar studies on gene polymorphisms were performed in CHD, and indicated that polymorphisms of human stromelysin-1 and fractalkine receptor CX3CR1 genes could be involved in pathogenesis of CHD, while an intron 4a/b eNOS gene polymorphism was not associated with severity of CHD, although protective effect against the development of myocardial infarction was suggested [16–18].

A role of genetic polymorphisms within endothelin system genes, including ENDRA, in CV system was also investigated [19]. Moreover, some examples of functional ENDRA gene polymorphisms related to cardiovascular system diseases were published recently, e.g. Tzourio et al found a positive association between migraine and –231A/G ENDRA polymorphism [20].

We report on ENDRA G1354C SNP, a novel molecular marker for ENDRA gene. As suggested by previous studies, the endothelin system could participate in the pathogenesis of atherosclerosis and related CV diseases, such as CHD and PAOD. The aim of this study was to search for any association between a novel ENDRA gene marker and CHD or PAOD in males.

The ENDRA gene is localized on chromosome 4. It spans more than 40 kilobases (kb) and consists of eight exons and seven introns. The scheme of the ENDRA gene is presented in Figure 4. The 3'-flanking region of the gene is characterized by the presence of polyadenylation signal, followed by six GT clusters [21, 22, 23].

The polymorphism investigated by us localizes 1354 bp (base pairs) downstream of the ATG initiation codon in exon 8 of the 3'-noncoding region. G1354C polymorphism does not change the aminoacid sequence of the coded protein. Theoretically, a single nucleotide mutation in the 3'-untranslated region of the gene co-

Dyskusja

Polimorfizm pojedynczego nukleotydu może odgrywać rolę w chorobach układu sercowo-naczyniowego o etiologii miażdżycowej, takich jak CHD i PAOD. W kilku badaniach oceniano asocjację między różnymi polimorfizmami genetycznymi a PAOD lub CHD. Wykazano na przykład, że polimorfizm K469E genu ICAM-1 jest czynnikiem ryzyka PAOD, podczas gdy SNP C242T genu p22 PHOX nie jest skojarzony z PAOD [14, 15]. Podobne badania polimorfizmów przeprowadzono w przypadku CHD, gdzie stwierdzono, iż polimorfizmy genów dla stromelizyny-1 i receptora fraktalkinowego CX3CR1 mogą uczestniczyć w patogenezie CHD, podczas gdy intronowy polimorfizm 4a/b genu eNOS nie wiązał się ze stopniem ciężkości CHD, choć zasugerowano jego efekt ochronny polegający na przeciwdziałaniu rozwojowi zawału serca [16–18].

Badano także asocjacje z układem sercowo-naczyniowym niektórych polimorfizmów genów dla układu endotheliny, w tym ENDRA [19]. Ostatnio opisano również przykłady czynnościowych polimorfizmów genu ENDRA związane z układem krążenia. Tzourio i wsp. [20] odkryli istotną asocjację genetyczną między polimorfizmem –231A/G ENDRA a migreną.

Zbadany przez autorów niniejszej pracy polimorfizm typu SNP genu ENDRA G1354C jest nowym molekularnym markerem tego genu. Jak sugerują wyniki opublikowanych badań, układ ET może uczestniczyć w patogenezie miażdżycy i związanych z nią chorób układu sercowo-naczyniowego, takich jak CHD i PAOD. Celem niniejszego badania było znalezienie zależności między nowym markerem genetycznym ENDRA a CHD lub PAOD u mężczyzn.

Gen ENDRA znajduje się na chromosomie 4. Obejmuje ponad 40 000 par zasad i składa się z 8 eksonów oraz 7 intronów. Na rycinie 4 przedstawiono schemat genu ENDRA. W regionie 3' tego genu niepodlegającym translacji znajduje się sygnał poliadenylacji, a także 6 odcinków sekwencji bogatych w parę GT [21–23].

uld affect polyadenylation of the transcript or translational efficacy, as exemplified by the functional polymorphism of the prothrombin gene G20210A [24]. However, in our study we could not test this hypothesis. If this silent polymorphism were associated with a change of the receptor function, there could exist a linkage disequilibrium between an allelic variant and the disease. A similar mechanism was demonstrated for the integrin $\alpha 2$ gene [25]. Thus, ENDRA G1354C SNP could be a marker for a functional polymorphism of the ENDRA gene.

Within the three groups of subjects that we genotyped, i.e. CHD and PAOD patients, and healthy controls we did not find any statistically significant differences in genotype or allelic frequencies of the SNP. Our results do not support any association between polymorphism of the ENDRA gene and the risk for development of PAOD or CHD. Additional studies, involving ENDRA mRNA and protein expression within the vessel wall, seem to be required to investigate the role of this receptor in pathogenesis of arterial disease.

Conclusions

No association between G1354C allelic variants of ENDRA and risk for CHD or PAOD was detected. It is unlikely that genetic variation at the ENDRA gene locus could contribute to the pathogenesis of arterial disease.

References

- Potaczek DP, Sanak M (2002) Endotelina — biosynteza, czynność i udział w chorobach układu krążenia. *Pol Arch Med Wewn*, 58: 703–714.
- Masaki T (2000) The endothelin family: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol*, 35 (Suppl. 2): 3–5.
- Levin ER (1995) Endothelins. *N Engl J Med*, 333: 356–363.
- Angielski S (2000) Peptydowe hormony natriuretyczne. In: Januszewicz A, Januszewicz W, Szczepańska-Sadowska E, Sznajderman M (eds.). *Nadciśnienie tętnicze*. Medycyna Praktyczna, Kraków 215–220.
- Remuzzi G, Benigni A (1993) Endothelins in the control of cardiovascular and renal function. *Lancet*, 342: 589–593.
- d'Uscio LV, Barton M, Shaw S, Lüscher TF (2000) Endothelin in atherosclerosis: importance of risk factors and therapeutic implications. *J Cardiovasc Pharmacol*, 35 (Suppl. 2): 55–59.
- Best PJM, Lerman A (2000) Endothelin in cardiovascular disease: from atherosclerosis to heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol*, 35 (Suppl. 2): 61–63.
- Halcox JJP, Nour KRA, Zalos G, Quyyumi AA (2001) Coronary vasodilation and improvement in endothelial dysfunction with endothelin ET A receptor blockade. *Circ Res*, 89: 969–976.
- Dashwood MR, Jagroop LA, Gorog DA, Bagger JP (2000) A potential role of endothelin-1 in peripheral vascular disease. *J Cardiovasc Pharmacol*, 36 (Suppl. 1): 93–94.
- Clozel M (2000) Endothelin receptor antagonists: current status and perspectives. *J Cardiovasc Pharmacol*, 35 (Suppl. 2): 65–68.

Badany przez autorów niniejszej pracy polimorfizm znajduje się 1354 par zasad za kodonem inicjacji ATG, w niekodującym fragmencie eksonu 8. Polimorfizm G1354C nie wywołuje zatem zmiany sekwencji aminokwasowej kodowanego polipeptydu. Mutacja punktowa genu w regionie niepodlegającym translacji 3' może jednak wpływać na wydajność poliadenylacji transkryptu lub translacji, tak jak w przypadku czynnościowego polimorfizmu G20210A genu dla protrombiny [24]. Jednak w niniejszym badaniu nie można było zbadać tej hipotezy. Jeśli opisany polimorfizm wiązałby się ze zmianą funkcji receptora, prawdopodobne stwierdzono by jego asocjacje z chorobą. Podobny mechanizm wykazano w przypadku genu integryny $\alpha 2$ [25]. Polimorfizm G1354C ENDRA mógłby zatem być markerem genetycznie uwarunkowanej zmienności ENDRA w badanych chorobach.

W trzech zbadanych grupach: u chorych z CHD, u pacjentów z PAOD i u zdrowych mężczyzn, u których określono genotyp, nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania genotypów i alleli w zakresie polimorfizmu ENDRA. Wyniki niniejszego badania nie dostarczają dowodów na zależność pomiędzy polimorfizmem genu ENDRA i ryzykiem rozwoju PAOD lub CHD. Aby w pełni poznać rolę biologiczną ENDRA w miażdżycy tętnic, należy przeprowadzić badania, w których będzie można ocenić ekspresję mRNA i białka ENDRA.

Wnioski

Nie stwierdzono zależności między wariantami allelicznymi G1354C ENDRA a ryzykiem rozwoju CHD lub PAOD. Jest mało prawdopodobne, by zmienność genetyczna genu dla ENDRA odgrywała rolę w patogenezie choroby miażdżycowej tętnic u mężczyzn.

- Löffler BM (2000) Endothelin-converting enzyme inhibitors: current status and perspectives. *J Cardiovasc Pharmacol*, 35 (Suppl. 2): 79–82.
- Benigni A, Remuzzi G (1999) Endothelin antagonists. *Lancet*, 353: 133–138.
- Sanak M (2002) Metodyka badań genetycznych i ich zastosowanie w klinice. In: Ciechanowicz A, Januszewicz A, Januszewicz W, Rużyłło W (eds.). *Genetyka chorób układu krążenia*. Medycyna Praktyczna, Kraków 23–30.
- Gaetani E, Flex A, Pola R et al (2002) The K469 polymorphism of the ICAM-1 gene is a risk factor for peripheral arterial occlusive disease. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 13: 483–488.
- Renner W, Schallmoser K, Gallippi P et al (1999) C242T polymorphism of the p22 phox gene is not associated with peripheral arterial occlusive disease. *Atherosclerosis*, 152: 175–179.
- Ye S, Eriksson P, Hamsten A, Kurkinen M, Humphries SE, Henney AM (1996) Progression of coronary atherosclerosis is associated with a common genetic variant of the

- human stromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression. *J Biol Chem*, 271: 13055—13060.
17. Moatti D, Faure S, Fumeron F et al (2001) Polymorphism in the fractalkine receptor CX3CR1 as a genetic risk factor for coronary artery disease. *Blood*, 97: 1925–1928.
 18. Kunnas TA, Ilveskoski E, Niskakangas T et al (2002) Association of the endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism with risk of coronary artery disease and myocardial infarction in middle-aged men. *J Mol Med*, 80: 605–609.
 19. Brown MJ, Sharma P, Stevens PA (2000) Association between diastolic blood pressure and variants of the endothelin-1 and endothelin-2 genes. *J Cardiovasc Pharmacol*, 35 (Suppl. 2): 41–43.
 20. Tzourio C, El Amrani M, Poirier O, Nicaud V, Bousser MG, Alperovitch A (2001) Association between migraine and endothelin type A receptor (ETA -231 A/G) gene polymorphism. *Neurology*, 56: 1273–1277.
 21. Lin HY, Kaji EH, Winkel GK, Ives HE, Lodish HF (1991) Cloning and functional expression of a vascular smooth muscle endothelin 1 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 3185–3189.
 22. Hosoda K, Nakao K, Tamura N et al (1992) Organization, structure, chromosomal assignment, and expression of the gene encoding the human endothelin-A receptor. *J Biol Chem*, 267: 18797–18804.
 23. Yamashita J, Yoshimasa T, Arai H et al (1998) Identification of cis-elements of the human endothelin-A receptor gene and inhibition of the gene expression by the decoy strategy. *J Biol Chem*, 273: 15993–15999.
 24. Gehring NH, Frede U, Neu-Yilik G et al (2001) Increased efficiency of mRNA 3' end formation: a new genetic mechanism contributing to hereditary thrombophilia. *Nat Genet*, 28: 389–392.
 25. Jacquelin B, Tarantino MD, Kritzik M et al (2001) Allele-dependent transcriptional regulation of the human integrin $\alpha 2$ gene. *Blood*, 97: 1721–1726.