

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

**Untersuchung von Single Nucleotide Polymorphisms der Gene
NOS1 und NOS3:
Assoziation mit Vorhofflimmern**

Moritz Felix Sinner

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der
Technischen Universität München zur Erlangung des
akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. I. V. Deisenhofer
2. Univ.-Prof. Dr. K.-L. Laugwitz

Die Dissertation wurde am 27.04.2007 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 18.07.2007 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis.....	6
2. Einleitung.....	10
2.1. Klassifikation und Nomenklatur von Vorhofflimmern.....	11
2.2. Epidemiologie von Vorhofflimmern.....	12
2.3. Risikofaktoren für die Entstehung von Vorhofflimmern.....	13
2.4. Genetisch fixierte Ursachen der Entstehung von Vorhofflimmern.....	14
3. Die Bedeutung von nitric oxide und der neuronalen sowie endothelialen NO-Synthasen in Bezug auf Rhythmusstörungen.....	20
4. Hintergrund der untersuchten Genpolymorphismen.....	27
4.1. c.894G>T / p.Glu298Asp / p.E298D-Variante in Exon 7 des NOS3-Gens.....	27
4.2. c.3391C>T-Variante in Exon 18 des NOS1-Gens.....	28
4.3. c.-84 G>A-Variante im Exon 1c Promotor des NOS1-Gens.....	29
5. Zielsetzung der Arbeit.....	31
6. Patientenkollektiv.....	32
6.1. Erhebung der Patientendaten.....	32
6.2. Ethik-Kommission.....	32
6.3. Ein- und Ausschlusskriterien.....	32
6.4. Verteilung klinischer Basischarakteristika in der unstratifizierten Fall- und Kontrollgruppe.....	33
6.4.1. Geschlechts- und Altersverteilung in der unstratifizierten Gesamtgruppe.....	34
6.4.2. Häufigkeit kardiovaskulärer Risikofaktoren.....	37
6.5. Substratifizierung.....	43
6.6. Substratifizierung nach Geschlecht (nur weibliche Studienteilnehmer).....	44
6.6.1. Altersverteilung.....	45
6.6.2. Häufigkeit kardiovaskulärer Risikofaktoren.....	47
6.7. Substratifizierung nach Alter (Studienteilnehmer beider Geschlechter).....	51

7. Methoden.....	57
7.1. Gewinnung des Untersuchungsmaterials.....	57
7.2. Extraktion der DNA.....	57
7.2.1. Beschreibung des Verfahrens.....	57
7.2.2. Protokoll der DNA-Extraktion.....	59
7.3. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	60
7.3.1. Allgemeine Bemerkungen zur PCR.....	60
7.3.2. TaqMan®-PCR mit allelspezifischen Fluoreszenz-Oligonukleotid-Sonden und 5' nuclease assay.....	62
7.3.3. PCR-Ansatz.....	67
7.3.3.1.Template-DNA.....	67
7.3.3.2.Primer.....	68
7.3.3.3.MGB-Sonden.....	68
7.3.3.4.Tamra™-Sonden.....	69
7.3.3.5.TaqMan® Universal PCR MasterMix.....	69
7.3.3.6.Standards.....	71
7.3.4. PCR-Bedingungen.....	71
7.3.4.1.Primer und Sonden für eNOS p.E298D.....	74
7.3.4.2.Primer und Sonden für nNOS c.3391C>T.....	75
7.3.4.3.Primer und Sonden für nNOS c.-84G>A.....	76
7.4. Auslesen der SNPs mittels ABI PRISM® Sequence Detection System 7700.....	77
8. Statistische Auswertung.....	80
9. Darstellung der Ergebnisse.....	81
9.1. Testung der Genotypen auf Abweichung vom Hardy-Weinberg-Equilibrium.....	81
9.2. Auswertung der Genotypenanalyse.....	81
9.2.1. Auswertung der unstratifizierten Gesamtgruppe.....	82
9.2.1.1.c.894G>T / p.E298D-Variante des eNOS-Gens.....	82
9.2.1.2.c.3391C>T-Variante des nNOS-Gens.....	83
9.2.1.3.c.-84G>A-Variante des nNOS-Gens.....	83

9.2.2. Substratifizierung nach Geschlecht.....	84
9.2.2.1.c.894G>T / p.E298D-Variante des eNOS-Gens.....	84
9.2.2.2.c.3391C>T-Variante des nNOS-Gens.....	85
9.2.2.3.c.-84G>A-Variante des nNOS-Gens.....	86
9.2.3. Substratifizierung nach Alter.....	87
9.2.3.1.c.894G>T / p.E298D-Variante des eNOS-Gens.....	87
9.2.3.2.c.3391C>T-Variante des nNOS-Gens.....	89
9.2.3.3.c.-84G>A-Variante des nNOS-Gens.....	90
10. Diskussion.....	91
10.1. Diskussion der Ergebnisse.....	91
10.1.1. eNOS.....	92
10.1.2. nNOS.....	97
10.2. Limitationen der Studie bei kritischer Betrachtung des Studienkonzeptes und der Methodik.....	101
11. Zusammenfassung.....	116
11.1. Zusammenfassung deutsch.....	116
11.2. Zusammenfassung englisch.....	118
12 Literaturverzeichnis.....	120
13 Danksagung.....	139
14 Lebenslauf.....	140

1. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-converting-enzyme
ACh	Acetylcholin
Adip.	Adipositas
AF	Atrial Fibrillation (engl. Vorhofflimmern)
ASO	allel-spezifische Oligonukleotidsonde
BMI	Body Mass Index
bp	basepair (engl. Basenpaar)
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
c.	cDNA
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CA	Kalifornien
cAMP	cyclisches Adenosin-Monophosphat
cDNA	copy DNA
cGMP	cyclisches Guanosin-Monophosphat
CDPI ₃	1,2-dihydro-(3H)-pyrrolo[3,2-e]indol-7-carboxylat
Chol.	Hypercholesterinämie
chr	Chromosom
Cl	Chlor
Cx40	Connexin 40
D	Aspartat (Aminosäure Ein-Buchstaben Code)
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	desoxyribonucleic acid (engl. Desoxyribonukleinsäure)
d.h.	das heißt
Diab.	Diabetes mellitus
dTTP	Desoxytymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuraciltriphosphat
E	Glutamat (Aminosäure Ein-Buchstaben Code)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDRF	endothelium derived relaxing factor (engl. endothelialer Relaxationsfaktor)
EKG	Elektrokardiogramm
engl.	Englisch
eNOS	endotheliale nitric oxide Synthetase
et al.	et altri
FA	Familienanamnese
FAM	6-carboxyfluorescein

FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
FMN	Flavin-Mononucleotid
FRET	fluorescence resonance energy transfer (engl. Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer)
g	Gramm / g-Zahl (Erdbeschleunigung) bei Angabe von Zentrifugationsgeschwindigkeiten
G	Guanin
HTN	Hypertension (engl. Hypertonus)
htSNP	haplotype tagging SNP (engl., sinngemäß SNPs, die Haplotypen, repräsentieren)
iNOS	induzierbare nitric oxide Synthase
K	Kalium
kb	Kilobasen
kDA	Kilodalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
KI	Konfidenzintervall
LD	Linkage Disequilibrium (engl. Kopplungsungleichgewicht)
mean	Mittelwert
x-mer	gibt die Anzahl der bp an
min	Minute(n)
µg	Mikrogramm
MGB	Minor Groove Binder
mittl.	mittlerer, -e, -es
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	millimolar = Millimol / Liter
µM	mikromolar = Mikromol / Liter
mmHg	Millimeter Quecksilber
µmol	Mikromol
mRNA	messenger RNA (engl. Boten-RNS)
n	Anzahl
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
neg.	negativ
ng	Nanogramm
nM	nanomolar = Nanomol / Liter
nNOS	neuronale nitric oxide Synthase
NO	nitric oxide (engl. Stickoxid)
NOS	nitric oxide Synthase
NOS1	Gen, das für die nNOS kodiert
NOS2	Gen, das für die iNOS kodiert
NOS3	Gen, das für die eNOS kodiert
NO-Synthase	nitric oxide Synthase
nt	Nucleotid(e)

NYHA	New York Heart Association (übliche klinische Einteilung der Herzinsuffizienz in Schweregrade)
OR	odds ratio
p.	Protein
p	p-Wert
PCR	polmerase-chain-reaction (engl. Polymerase-Ketten-Reaktion)
PDE2	Phosphodiesterase 2
PDE3	Phosphodiesterase 3
pH	Abkürzung für den negativ dekadischen Logarithmus der Konzentration an Wasserstoffionen
PKA	Phosphatkinase A
PKG	cGMP-abhängige Kinase
pos.	positiv
RNA	Ribonucleic acid (engl. Ribonukleinsäure)
rpm	rounds per minute (engl. Umdrehungen pro Minute)
RyR2	Ryanodin Rezeptor 2
SBE	single base extension (engl. Einzelbasenextension)
SD	Standard deviation (engl. Standardabweichung)
SDS	Sequence Detection System
sek	Sekunde(n)
SERCA	Calcium ATPase des Sarkoplasmatischen Retikulums
SNP	single nucleotide polymorphism (engl. Einzelbasen Polymorphismus)
s.o.	siehe oben
sog.	sogenannter, -e, -es
SR	Sinusrhythmus
Std.	Stunde(n)
Std. Dev	Standard deviation (engl. Standardabweichung)
s.u.	siehe unten
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAMRA	carboxytetramethylrhodamin
THB4	Tetrahydrobiopterin
TGF- β	transforming growth factor β
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Uracil
u.a.	unter anderem
usw.	und so weiter
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
VIC	(patentgeschützter Fluoreszenzfarbstoff)
VNS	vagal nerve stimulation (engl. vagale Nervenstimulation)
vs.	versus

z.B.
z.T.

zum Beispiel
zum Teil

2. Einleitung

Die Beschreibung von Rhythmusstörungen hat in der Medizingeschichte eine lange Tradition; besonders unregelmäßiger Puls fiel bereits in der Antike auf. In Anlehnung an die medizinhistorische Abhandlung über das Vorhofflimmern (oder atrial fibrillation, AF) von Fazekas [49] soll hier ein kurzer Abriss der Geschichte der Erkrankung wiedergegeben werden. Erstbeschreiber der Erkrankung war vermutlich William Harvey im Jahre 1628 [68], der durch genaue Beobachtung die Vorhöfe als Ausgangspunkt der kardialen Erregung identifizierte und dabei dem rechten Herzohr besondere Bedeutung beimaß. Erst über 100 Jahre später, 1749, stellte der Franzose de Sénac eine kausale Beziehung zwischen einer „palpitatio rebellis“, also einem unregelmäßigen Herzschlag, und kardiologischen Krankheitsbildern wie v.a. der Mitralstenose her [118]. Durch die Therapie mit Chinin läutete er auch die antiarrhythmische Therapie ein. Der technische Fortschritt ermöglichte im Laufe der Jahre nähere klinische Charakterisierungen: Vor allem fielen Cushny, Edmunds [36] und Mackenzie [162] in Blutdruck- und Pulskurven das Fehlen einer sog. a-Welle auf. Den Durchbruch aber erbrachte im Jahre 1906 Einthovens EKG [46], das zum ersten Mal AF selbst nachweisen konnte. Es vergingen jedoch noch einige Jahre, bis Hering [69; 70] sowie Rothberger und Winterberg [146] den Zusammenhang zwischen der klinischen „arrhythmia absoluta“, der im EKG fehlenden P-Welle und Vorhofflimmern herstellten. Als Begründer der modernen Elektrophysiologie im heutigen Sinne darf Lewis, Gründer der Fachzeitschrift Heart, gelten, der zwischen 1909 und 1921 [108] aufgrund anatomischer Veränderungen Reentry-Mechanismen als Ursache für AF bezeichnete. Die Weltkriege warfen die Forschung auf diesem Gebiet weit zurück. Erst Moe [122] und Allessie [4] verfeinerten 1962 bzw. 1977 die alte Reentry-Theorie an Tieren und Menschen und bereiteten so den Weg für das heutige Verständnis.

Heute gilt Vorhofflimmern als die bei weitem häufigste Rhythmusstörung des Menschen. Allein in den USA leben geschätzte 2,2 Millionen Menschen mit AF [50], in Europa sind es geschätzte 4,5 Millionen [54] und allein in Deutschland ca. 800000 Betroffene [94]. Da die Erkrankung überdurchschnittlich viele Patienten höheren Alters betrifft, wird sich diese Zahl in einer stetig älter werdenden Bevölkerung im Laufe der nächsten Jahre noch drastisch erhöhen. Die Folgen der Arrhythmie sind beträchtlich. Während Müdigkeit, Atemnot, Palpitationen, thorakale Schmerzen oder Schwindelgefühle noch zu den leichteren Symptomen zählen, geht von der Thrombenbildung in den Vorhöfen des Herzens quoad

vitam eine weitaus höhere Gefahr aus. Aufgrund der mangelnden Kontraktion des flimmernden Atriums kommt es dort zur Stase und Koagelbildung des Blutes und damit zur Gefahr von thrombembolischen Ereignissen im gesamten Bereich des großen Kreislaufes. Bei kontinuierlich steigender Tendenz nimmt die Behandlung der Erkrankung selbst und deren Folgen schon heute einen großen Teil des Gesundheitsbudgets in Anspruch und verdient deshalb nicht zuletzt aufgrund der hohen sozioökonomischen Relevanz, dass die Erkrankungsursachen und Behandlungsmöglichkeiten wissenschaftlich erforscht werden.

Mit Stickoxid (NO), früher auch als endothelium derived relaxing factor (EDRF) bezeichnet, konnte ein Zellmediator identifiziert werden, der eine massgebliche Rolle in der Regulation der kardiovaskulären Physiologie und Pathophysiologie spielt. In der Literatur existieren zahlreiche Hinweise, dass NO auch in der Genese und Aufrechterhaltung von Rhythmusstörungen eine tragende Rolle spielt [39; 117].

Im Rahmen der vorliegenden Studie soll mittels einer genetischen Assoziationsstudie der Zusammenhang zwischen Vorhofflimmern und NO untersucht werden. Dieses Einleitungskapitel liefert zunächst einige Hintergrundinformationen über Vorhofflimmern und den Mediator.

2.1 Klassifikation und Nomenklatur von Vorhofflimmern

Die früher oft gebräuchliche Einteilung der Erkrankung in paroxysmales, intermittierendes und chronisches Vorhofflimmern wurde offiziell verlassen, ist jedoch aus dem klinischen Sprachgebrauch häufig noch nicht wegzudenken. Im Rahmen der aktuellen Version der gemeinsamen Leitlinien des American College of Cardiology, der American Heart Association und der European Society of Cardiology aus dem Jahre 2001 wurde eine neue, einfache und an klinischen Gesichtspunkten orientierte Klassifikation vereinbart [54]. Darin wird Vorhofflimmern wie folgt eingeteilt:

- Paroxysmales Vorhofflimmern ist selbstterminierend und hält nicht länger als sieben Tage an. Häufig beträgt die Dauer einer Episode weniger als 24 Std.
- Persistierendes Vorhofflimmern dauert dementsprechend länger als sieben Tage an und sistiert nicht spontan. Es kann jedoch durch medikamentöse oder elektrische Kardioversion beendet werden.

- Permanentes Vorhofflimmern liegt vor, wenn eine Episode länger als ein Jahr andauert und nicht durch eine Kardioversion beendet werden kann, bzw. dies nicht versucht wurde.
- Die Erstdiagnose von AF sollte immer unabhängig von dieser Einteilung gestellt werden. Erst wenn anhand der genannten Richtlinien eine genauere Einteilung erfolgen kann, sollte diese vorgenommen werden. Kommt es nach Selbstlimitation oder iatrogener Beendigung einer Episode von paroxysmalem oder persistierendem AF zum erneuten Auftreten, spricht man von rekurrentem bzw. rezidivierendem Vorhofflimmern.

Unabhängig von dieser Klassifikation findet sich oftmals eine Nomenklatur, die sich an einer erkennbaren, zugrunde liegenden Erkrankungsursache orientiert. Dabei steht die Entität des idiopathischen Vorhofflimmerns bzw. des sog. „Lone AF“ der auf einem prädisponierenden Zustand basierenden Rhythmusstörung gegenüber. Häufig werden dabei idiopathisches Vorhofflimmern und „Lone AF“ parallel verwendet; strenggenommen bezeichnet aber nur „Lone AF“ eine Form, die spontan und ohne nachweisbare Risikofaktoren auftritt, meist jüngere Patienten unter 60 Jahren betrifft und dementsprechend eine geringere klinische Relevanz in punkto Morbidität und Mortalität besitzt. Demgegenüber meint idiopathisches Vorhofflimmern lediglich, dass ein auslösender Faktor noch nicht untersucht oder gefunden wurde.

2.2 Epidemiologie von Vorhofflimmern

Vorhofflimmern ist die häufigste Rhythmusstörung des Menschen. Allerdings sind Auftreten und Vorkommen stark von verschiedenen Faktoren abhängig. So besteht v.a. eine starke Altersabhängigkeit. Während AF bei Jugendlichen äußerst selten auftritt – Hiss et al. fanden Vorhofflimmern lediglich bei fünf von über 122000 untersuchten Air Force Mitarbeitern [72] - , steigen Inzidenz und Prävalenz im höheren Alter deutlich an. In der ATRIA-Studie [57] mit knapp 1,9 Millionen untersuchten Personen liegt die Prävalenz der erwachsenen Allgemeinbevölkerung bei ca. 1%. Die unter 55-Jährigen sind dabei nur mit einer Häufigkeit von 0,1% betroffen. Danach erhöht sich die Prävalenz stetig bis auf 9,0% bei über 80-Jährigen. Männer sind dabei sowohl im Allgemeinen (1,1% vs. 0,8%) als auch in jeder Altersgruppe separat betrachtet häufiger betroffen als Frauen: Man findet einen Anstieg von 0,1% bei unter 55-jährigen Frauen bis auf 9,1% bei den über 85-Jährigen im Gegensatz zu

0,2% bis 11% bei Männern des jeweils selben Alters. Das mittlere Alter der Patienten mit AF liegt um das 75. Lebensjahr. Andere Studien kommen zu ähnlichen Ergebnissen [50; 87]. Bezüglich der Inzidenzen findet man vergleichbare Ergebnisse: Jeweils bezogen auf 1000 Personenjahre liegt sie in der Gruppe der 65- bis 74-Jährigen bei 17,6% für Männer bzw. 10,1% für Frauen, im Alter zwischen 75 und 85 Jahren bei 42,7% bzw. 21,6% [141].

2.3 Risikofaktoren für die Entstehung von Vorhofflimmern

An der Entstehung bzw. dem Auslösen von AF sind eine Vielzahl von Faktoren ursächlich beteiligt. Die Manitoba Follow-Up Studie von Krahn et al. [96] listet weit über 20 verschiedene Krankheitsbilder und Zustände auf, die für die Entstehung von Vorhofflimmern verantwortlich sind. So erhöht beispielsweise das Vorliegen einer Kardiomyopathie das relative Risiko für das Auftreten von AF um den Faktor 14,02. Die Erkrankung selbst ist jedoch relativ selten (1,7% der untersuchten Personen). Im Gegensatz dazu erhöhen die arterielle Hypertonie oder hypertensive Herzerkrankung die Auftretenswahrscheinlichkeit nur relativ gering um das 2,32-fache. Diese Erkrankung ist allerdings selbst eine Volkskrankheit, so dass die Häufigkeit von AF bei dieser Patientengruppe dadurch erzielt wird, dass bei vielen der pathogenetisch relevante Hochdruck vorliegt (53,0% der untersuchten Personen). Hochassoziiert sind weiterhin die Herzinsuffizienz sowie die ischämische und valvuläre Herzerkrankung [17; 140; 189].

Dabei sind es im Wesentlichen immer dieselben pathogenetisch relevanten Mechanismen, die für die Entstehung von Vorhofflimmern von Bedeutung sind. So wurde nachgewiesen, dass dem Einsetzen von AF regelmäßig eine Dilatation der Vorhöfe vorausgeht [173], ein Zustand, der durch alle der eben erwähnten Krankheitsbilder hervorgerufen werden kann. Im akuten Myokardinfarkt, der zu einer Ischämie der Vorhofmuskulatur und damit zu Narbenbildung führt, aber auch durch die chronische Gewebedehnung kommt es zu Veränderungen der elektrischen Erregungsausbreitung, so dass eine gerichtete, gleichmäßige Reizweiterleitung vom Sinusknoten nicht mehr gewährleistet ist. Auf dieser Basis kann sich der Ausgang der Erregung von sog. ektopen Foci etablieren. Von ihnen geht über die Entstehung von multiplen Erregungswellen, die immer wieder in den Bereich des auslösenden Focus eintreten (sog. Reentry-Mechanismus), die schnelle Frequenz des flimmernden Vorhofs aus. Typische Lokalisationen für die Genese dieser Foci sind die Einmündungen der Pulmonalvenen in den linken Vorhof [25; 65; 93].

Zu den weiteren Risikofaktoren für die Genese von AF zählen, bei z.T. ähnlichem, z.T. unterschiedlichem Pathomechanismus, die Adipositas [178] und die sowohl manifeste als auch latente Hyperthyreose [53]. Operative Eingriffe prädisponieren ebenfalls; dabei tritt die Rhythmusstörung jedoch wesentlich häufiger bei Patienten auf, die sich einer kardialen Operation unterziehen müssen als bei solchen, die aus nicht kardialen Gründen heraus operiert wurden [113; 176].

Eine Ursache für die Entstehung des Vorhofflimmerns, die in den letzten Jahren immer deutlicher in den Vordergrund trat, ist die genetisch fixierte Prädisposition. Dass eine solche besteht, legt schon die Tatsache nahe, dass es eine Vielzahl von Patienten mit AF gibt, bei denen sich keine der üblichen Risikofaktoren finden. Bis heute ist es jedoch nicht gelungen, ein einzelnes Gen für den Entstehungsmechanismus verantwortlich zu machen. Vielmehr wurde AF wiederholt als genetisch heterogene Erkrankung beschrieben [40]. Das folgende Kapitel soll die bisher durchgeführten Untersuchungen zur Klärung des genetischen Hintergrundes näher beleuchten.

2.4 Genetisch fixierte Ursachen der Entstehung von Vorhofflimmern

Hinsichtlich der molekulargenetischen Ursachen der Entstehung von Vorhofflimmern kann man im wesentlichen drei verschiedene Studienansätze unterscheiden.

Der erste Typ befasst sich hauptsächlich mit der Untersuchung von familiär gehäuft auftretendem AF. Dabei geht man davon aus, dass die Erkrankung monogen vererbt wird und, ggf. mit unvollständiger Penetranz, gemäß den Mendelschen Regeln weitergegeben wird [99]. So identifizierten 1997 Brugada et al. erstmalig bei drei katalonischen Familien mit autosomal dominant vererbtem Vorhofflimmern den chromosomalen Locus 10q22-24 [20]. Ein konkretes Gen konnte bisher aber noch nicht isoliert werden. Ähnliches gilt für eine Untersuchung von Ellinor et al. aus 2003, in der die Autoren im Bereich von 6q14-16 einen neuen Locus ausmachten, aber auch hier kein verantwortliches Gen nachweisen konnten [47]. Ein Locus, an dem AF einem autosomal-rezessiven Erbgang folgt, wurde von Oberti et al. 2004 nachgewiesen [133]. Bisher gelang es lediglich in chinesischen Familien, auch konkrete verantwortliche Gene und die entsprechenden Mutationen aufzuklären. Im Jahr 2003 fanden Chen et al. in vier Generationen einer chinesischen Familie mit autosomal dominant vererbtem Vorhofflimmern das KCNQ1-Gen am Locus 11p15.5 als ursächlich heraus [27; 177]. Dieses Gen kodiert die α -Untereinheit des kardialen I_{Ks} -Kanals und ist damit

maßgeblich an der Regulation des Aktionspotentials am Herzen beteiligt. Die verantwortliche Mutation, der Aminosäureaustausch p.S140G, führt zu einer Funktionszunahme (gain of function) des Kanals mit konsekutiver Verkürzung des kardialen Aktionspotentials. Dies begünstigt die Entstehung von Reentry-Mechanismen und damit die Entstehung von Vorhofflimmern. Zwei weitere Gene, KCNE2 und KCNJ2, die ebenfalls kardiale Kaliumkanäle kodieren, konnten in den darauf folgenden Jahren von Yang et al. [196] sowie Xia et al. [191] für die Entstehung von monogen vererbtem Vorhofflimmern verantwortlich gemacht werden. Auch hier wurden entsprechende Mutationen gefunden, die zur Funktionszunahme des jeweiligen Kanals führen. In der folgenden Tabelle 2.1 findet sich eine Übersicht über bisher identifizierte Gene und Loci bei monogenem AF.

Autor (Jahr)	Locus	Mutation	n	Alter	Funktion
	Unbekannt				
Darbar [40] (2003)	Fam. AF 1-4	?	25	27-60	
	Bekannt				
Brugada [20] (1997)	10q22-24	?	19	2-46	
Ellinor [47] (2003)	6q14-16	?	8	21-72	
Oberti [133] (2004)	5p13	?	5	<2	
Chen [27] (2003)	11p15.5	KCNQ1: S140G	16	> 5	Gain of function
Yang [196] (2004)	21q22.1-2	KCNE2: R27C	9	46-62	Gain of function
Xia [191] (2005)	17q23.1-24.2	KCNJ2: V92I	5	?	Gain of function
Hong [76] (2005)	11p15.5	KCNQ1: V141M	1	0	Gain of function

Tab 2.1: Übersicht über die bisher identifizierten chromosomalen Loci und Gene für monogene Formen von Vorhofflimmern. Neben Autor, Jahr der Veröffentlichung, chromosomalem Locus und ggf. der kausalen Mutation bezeichnet „n“ die Zahl der Betroffenen, „Alter“ das Alter der Betroffenen bei Diagnosestellung und „Funktion“ den zurechenbaren Effekt der gefundenen Mutation auf das kodierte Protein.

Versuche an transgenen und knockout-Mäusen stellen einen weiteren Untersuchungsansatz dar [134]. Jedoch lassen auch hier die Ergebnisse noch viele Fragen offen. Besonders die Tatsache, dass die genetisch veränderten Mäuse häufig keine normale Entwicklung des Herzens durchlaufen, stellt einen limitierenden Faktor dar. Berichtenswert sind deshalb v.a. zwei Modelle mit unterschiedlichen Ansätzen: Zwei Gruppen beschäftigten sich mit Connexin40 defizienten Mäusen ($Cx40^{-/-}$), bei denen keine kardialen Entwicklungsschäden festgestellt wurden [64; 175]. Connexin40 ist eines von mehreren bekannten Proteinen, die die sog. Gap-junctions, die elektrischen Verbindungskanäle zur Aktionspotential-Fortleitung am Herzmuskel, bilden. Beide Untersuchungen fanden übereinstimmend signifikant längere P-Wellen sowie ca. 30% langsamere Vorhoferregungszeiten und eine deutlich erhöhte Empfänglichkeit für atriale Arrhythmien. Der zweite interessante Ansatz befasst sich mit der Fibrosierung der Vorhöfe in einem Mausmodell, das eine Überexpression der konstitutionellen Form des transforming growth factor β (TGF- β) aufweist. Nakajima et al. [131; 174] zeigten bei den Tieren eine auffallend niedrige P-Welle und konnten – im Gegensatz zu den Kontrollen – in einem hohen Prozentsatz Vorhofflimmern auslösen. Hintergrund soll die Tatsache sein, dass durch die Fibrosierung die Erregungsfortleitung über das Vorhofmyokard behindert wird und so die Entstehung von Reentry-Mechanismen begünstigt wird.

Den dritten Ansatz, die Hintergründe von Vorhofflimmern zu entschlüsseln, bilden genetische Assoziationsstudien, denen auch die vorliegende Studie zuzuordnen ist [99; 186]. Diese kommen seit der Entschlüsselung der menschlichen DNA durch das Human Genome Project und der Optimierung von Methoden zur einfachen Genotypisierung von Blut- und Gewebeproben immer häufiger zur Anwendung. Die erwähnte Entschlüsselung sowie die Ergebnisse aus dem HapMap-Projekt brachten die Erkenntnis, dass das menschliche Genom eine interindividuelle Homologie von 99,9% aufweist [5; 33; 120]. Der verbleibende Unterschied besteht zu einem großen Teil in sog. single nucleotide Polymorphisms (SNPs). Bei diesen handelt es sich im Wesentlichen um Punktmutationen, die vor Jahrtausenden entstanden und über die Generationen weitergegeben wurden. Aus diesem Grund liegt der entscheidende Unterschied zwischen Punktmutationen und SNPs in der Häufigkeit des Auftretens, der sog. Allelfrequenz. Üblicherweise spricht man ab einer Allelfrequenz von 1% von einem SNP [5].

Dabei sind Mutationen rare variants, seltene Vorkommnisse, die für ebenso seltene monogene Erkrankungen verantwortlich sind. Bei der überwiegenden Mehrzahl aller anderen Fälle liegt

jedoch kein solch monogener Erbgang vor. Hier handelt es sich um sog. komplexe Phänotypen. Letztere kommen ungleich häufiger vor; man spricht deshalb auch von common diseases. Folgt man der common disease – common variant Hypothese, so werden diese häufig vorkommenden, komplexen Phänotypen von solch häufig vorkommenden Genvarianten verursacht, zu denen u.a. auch die angesprochenen SNPs zählen [132]. Dabei ist jedoch die Genetik nicht allein verantwortlich für die Erkrankungsentstehung. Vielmehr wirken die Polymorphismen als modifier, kleine Modifikatoren, die eine gewisse Anfälligkeit, man spricht auch von Suszeptibilität oder susceptibility, für die Erkrankungsentstehung vererben [43; 86]. Erst wenn zusätzliche Faktoren, beispielsweise aus der Umwelt, hinzukommen, wird die Erkrankung ausgelöst.

Unter der Annahme, dass die entscheidenden Genvarianten bei Gesunden und Betroffenen unterschiedlich häufig verteilt sind, lassen sich diese im Rahmen von sog. Fall-Kontroll-Studien untersuchen. Dabei wird der verdächtige Polymorphismus in beiden Gruppen genotypisiert und die gefundenen Allelfrequenzen miteinander verglichen. Als Ergebnis kann man feststellen, ob und wie stark der betreffende SNP mit der Erkrankung, hier Vorhofflimmern, assoziiert ist [43].

Bisher folgten alle vergleichbaren Studien dem beschriebenen Konzept, stellten also bei unterschiedlichen zu untersuchenden Kandidatengenen eine Gruppe von Patienten mit Vorhofflimmern einer Kontrollgruppe ohne AF gegenüber. Dabei waren die untersuchten Patientengruppen bisweilen recht heterogen, d.h. teils lagen prädisponierende Risikofaktoren vor, teils nicht, und die Zahl der untersuchten Patienten war oft sehr gering. Auch die Altersstruktur der untersuchten Kollektive unterschied sich von Studie zu Studie erheblich. Außerdem wurden die Kontrollpopulationen sehr unterschiedlich rekrutiert. Es folgt ein kurzer Überblick über die bisher veröffentlichten Ergebnisse zu SNP-Assoziationsstudien bei Vorhofflimmern:

Im Jahre 1997 war es die Gruppe um Yamashita, die erstmals eine solche Assoziationsstudie mit Vorhofflimmern als Phänotyp veröffentlichte. Untersucht wurde der vielbeschriebene 250bp Insertion- / Deletionpolymorphismus im Gen für das Angiotensin-Converting Enzym (ACE) [195]. Es konnte jedoch keine signifikante Assoziation mit AF nachgewiesen werden.

Zu diesem Ergebnis kamen auch Tsai et al., die 2004 intensive Studien am Renin-Angiotensin-Aldosteron-System vornahmen [172]. Für die drei SNPs (p.M235T, c.217G>A, c.6G>A) im Gen für Angiotensinogen konnten jedoch entsprechende Zusammenhänge

gezeigt werden. Es konnten odds ratios von 2,5, 3,3 und 2,0 für die Entstehung von Vorhofflimmern errechnet werden.

Eine dritte Gruppe befasste sich 2003 ebenfalls mit dem ACE-Gen. Gensini et al. zeigten dabei, dass der oben erwähnte 250bp Insertions- / Deletionspolymorphismus mit AF assoziiert ist und errechneten eine odds ratio von 3,24 für die Entstehung von AF [56]. Die widersprüchlichen Ergebnisse interpretierte die Gruppe im Sinne ethnischer Unterschiede bei den untersuchten Probanden. Während Yamashita asiatische Patienten rekrutierte [Yamashita et al. 1997 637], führte die Gruppe um Gensini die Untersuchungen an kaukasischen Teilnehmern durch. Ein weiterer Punkt macht diese Studie interessant, da neben dem ACE-Gen auch drei Polymorphismen (c.786T>C, c.894G>T, 4a/4b) im Gen für eNOS genotypisiert wurden. Allerdings zeigte sich keine Assoziation mit der Rhythmusstörung. Die c.894G>T-Variante wurde auch in der hier vorliegenden Studie untersucht.

Lai et al. befassten sich 2002 mit dem bereits erwähnten I_{Ks} -Kalium-Kanal [100]. Im Gen KCNE1, welches die β -Untereinheit des Kanals kodiert, zeigten sie eine Assoziation von AF mit dem p.S38G-SNP. Für Hetero- bzw. Homozygotie bezüglich des 38G-Allels errechnete sich eine odds-ratio von 2,16 bzw. 3,58. Ehrlich und Kollegen konnten in einer weiteren Untersuchung die funktionelle Relevanz der Genvariante nachweisen: Das 38G-Allel geht dabei mit einem reduzierten Ionenfluß einher, wodurch das Auftreten tachykarder Rhythmusstörungen begünstigt wird [45].

Mit dem Gen KCNE5, welches für die β -Untereinheit des von KCNQ1 kodierten Kalium-Kanals kodiert, befassten sich Ravn et al. im Jahr 2005 [144]. Untersucht wurde die p.P33S-Variante. Da dieses Gen auf dem X-Chromosom liegt, ergaben sich erwartungsgemäß deutliche Unterschiede zwischen Männern und Frauen. Lag kein Wildtyp-Allel vor, lag die odds ratio für Männer bei 2,17, für Frauen bei 1,80.

In der Studie von Schreieck et al. 2004 zeigte sich, dass das seltenere Allel des untersuchten Polymorphismus c.825C>T im Gen für das G-Protein β_3 einen protektiven Effekt auf Vorhofflimmern hat. Die odds ratio des T-Allels lag bei 0,46 [156].

Die beschriebenen Untersuchungen sind in der folgenden Tabelle 2.2 nochmals zusammengefasst.

Autor (Jahr)	Gen	SNP	OR (95% KI)	n	Alter	Herkunft
Yamashita [195] (1997)	ACE	250 bp del/del	n.s.	77	?	Asiatisch
Gensini [56] (2003)	ACE	250 bp ins/del	3,24 (1,82-5,74)	148	67 ± 11	Kaukasisch
Tsai [172] (2004)	Angio- tensinogen	p.M235T p.G217A p.G6A	2,5 (1,7-3,3) 3,3 (1,3-10,0) 2,0 (1,3-2,5)	250	67,6 ± 12,7	Chinesisch
Lai [100] (2002)	KCNE1	p.S38G	2,16 (0,81-5,74) 3,58 (1,38-9,27)	108	63,4 ± 11,5	Chinesisch
Schreieck [156] (2004)	G-Protein β ₃	c.825C>T	0,46 (0,24-0,87)	291	57,9 ± 9,8	Kaukasisch
Ravn [144] (2005)	KCNE5	p.P33S	2,17 (0,89-5,28)	158	66,2	Kaukasisch

Tab. 2.2: Übersicht über wesentliche Fall-Kontroll-Studien, die eine Assoziation von Vorhofflimmern mit SNPs in verschiedenen Genen zeigen. Die Tabelle beinhaltet Angaben zu Autor, Jahr der Veröffentlichung, dem untersuchten Gen und den Polymorphismen, die mit der Erkrankung assoziiert waren. „OR“ bezeichnet die errechnete odds ratio mit Angabe des 95% Konfidenzintervalls und „n“ die Anzahl der typisierten Patienten der Fallgruppe. „Alter“ beziffert das mittlere Alter dieser Gruppe inklusive der entsprechenden Standardabweichung, „Herkunft“ bezieht sich auf deren ethnischen Hintergrund.

3. Die Bedeutung von nitric oxide und der neuronalen sowie endothelialen NO-Synthasen in Bezug auf Rhythmusstörungen

Spätestens seit Nitric Oxide (= Stickoxid = NO) im Jahr 1992 von der Zeitschrift Science zum Molekül des Jahres gekürt wurde, ist es Teil eines der am intensivsten beforschten Themengebiete der Molekularbiologie [95]. In der Atmosphäre leistet es als gasförmiger Verbrennungsrückstand einen beträchtlichen Beitrag zur Luftverschmutzung, im Körper jedoch funktioniert es als auto- und parakriner Zellmediator. Produziert wird NO von der Nitric Oxide Synthase (NO-Synthase oder NOS). Drei verschiedene Isoformen sind bisher bekannt: Diese sind in der Reihenfolge ihrer Beschreibung die neuronale NO-Synthase (nNOS) [18], kodiert vom Gen NOS1, die induzierbare NO-Synthase (iNOS) [192], kodiert durch das Gen NOS2 und die endotheliale NO-Synthase (eNOS) [101], die vom Gen NOS3 kodiert wird. Trotz unterschiedlichen Verteilungsmusters im Körper und teils uneinheitlicher Regulierung bestehen zwischen den drei Typen etliche Gemeinsamkeiten [1; 14; 26; 62; 63; 138; 139; 166]. So setzen sie sich aus zwei sich funktionell ergänzenden Untereinheiten zusammen und besitzen am Carboxyl-Ende eine Reduktase-Domäne, die Homologien mit der Cytochrom-P450-Reduktase aufweist. Amino-terminal liegt eine Oxygenase-Domäne mit Bindungsstellen für Häm, L-Arginin und Tetrahydrobiopterin (THB4). Letzteres ist dabei essentielles Coenzym. In der Mitte sind die beiden funktionellen Einheiten über eine Calmodulin-Bindungs-Domäne verbunden. Auch die NO-Bildung funktioniert identisch: Mittels Transfer von Elektronen, die von NADPH zur Verfügung gestellt werden und über die Flavine FAD und FMN weitergeleitet werden, wird die Verarbeitung des Substrats L-Arginin katalysiert. Dabei entstehen NO und L-Citrullin. Bei Mangel an L-Arginin kommt es zur Elektronenübertragung auf Sauerstoff, wodurch es zur Bildung von Sauerstoffradikalen und Wasserstoffperoxid kommt. Dies ist hauptsächlich bei der iNOS und im Rahmen von pathophysiologischen Zuständen von Bedeutung. Die entscheidende chemische Reaktion ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

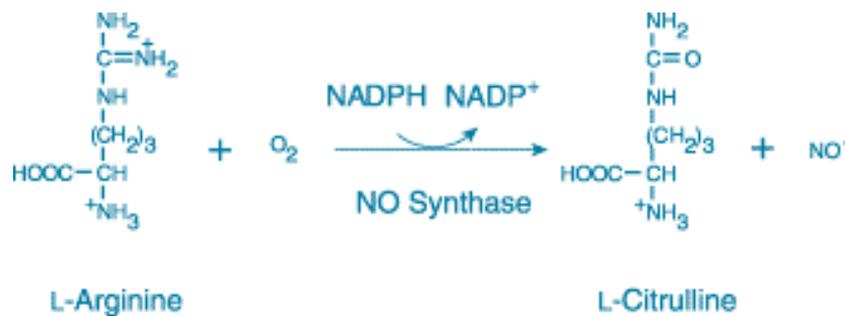


Abb. 3.1: Darstellung der chemischen Reaktion der Bildung von NO durch die NO-Synthasen im menschlichen Körper. Eine genauere Beschreibung erfolgt im Text.

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden die beiden Isoformen eNOS und nNOS aufgrund ihres erwiesenen Einflusses auf das kardiovaskuläre System untersucht:

Mehrere Untersuchungen konnten nachweisen, dass die endotheliale NO-Synthase sowohl in ventrikulären als auch atrialen myokardialen Zellen exprimiert wird [15; 183]. Dies bildet die Voraussetzung dafür, dass Veränderungen des Gens die kardialen Erregungs- und Repolarisationsabläufe beeinflussen und so arrhythmogenes Potential entwickeln können. Die meisten Erkenntnisse, auf welche Art und Weise von eNOS produziertes NO die kardialen Funktionsabläufe reguliert, stammen aus Tierversuchen an eNOS-knockout-Mäusen. Ein im Jahr 2003 veröffentlichtes Review von Massion und Balligand fasst die wichtigen Ergebnisse zusammen [116]:

Der Vergleich von eNOS-knockout-Tieren mit Wildtyp-Kontrollen zeigte, dass NO im Wesentlichen die Ino-, Lusi- und Chronotropie des Herzens beeinflusst. Besonders stark ist dieser Einfluss am unbelasteten Herz, wenn gleichzeitig β -adrenerg stimulierende Komponenten hinzukommen. Dann ist sowohl die Inotropie als auch die Lusitropie des Herzens bei knockout-Mäusen verstärkt. Liegt kein β -adrenerger Stimulus vor, bleiben diese beiden Parameter im Wesentlichen unbeeinflusst. Anders verhält es sich mit der Chronotropie. Diese ist bei den veränderten Tieren schon ohne pharmakologische Stimulation erhöht, bei zusätzlicher Gabe β -adrenerger Substanzen ist aber, ähnlich wie bei den Kontrolltieren, keine wesentliche weitere Steigerung der Chronotropie zu verzeichnen. Allerdings konnten diese Ergebnisse nicht in allen im Review zitierten Studien repliziert werden. Einige Arbeiten gelangten dabei zu gegensätzlichen Resultaten. Die Autoren des Reviews führen dies darauf zurück, dass die Versuchsbedingungen bei den einzelnen Studien nicht identisch waren.

Vergleichbare Resultate fanden sich gemäß der Zusammenstellung des Reviews [116] für Herzen unter Belastung, dann aber ohne zusätzliche Stimulation durch β -adrenerge Substanzen. Hier wurde deutlich, dass eNOS-defiziente Mäuse erhöhte Inotropie und Lusitropie zeigen, auch hier die Chronotropie im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen aber ähnlich war. Interessanterweise war bei einem Teil der Knockout-Tiere die Größe eines induzierten Myokardinfarktes ausgedehnter und die Mortalität nach Myokardinfarkt erhöht. Auch bezüglich dieser Effekte unter Belastung kamen verschiedentlich andere Autoren zu abweichenden Ergebnissen.

Zusammenfassend kann man aus dieser Übersichtsarbeit schlussfolgern, dass von eNOS produziertes NO einen protektiven und in gewisser Hinsicht „bremsenden“ Effekt auf das Herz hat. Ein Grund der z.T. widersprüchlichen Ergebnisse der verschiedenen Studien könnte darin liegen, dass zwar immer eNOS-knockout-Mäuse untersucht wurden, aber nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die gefundenen Effekte auch ausschließlich auf das Fehlen des kardial lokalisierten Enzyms zurückzuführen waren. Vielmehr wurden auch Effekte nichtkardialer NO-Quellen mitgemessen und dadurch klare Ergebnisse „verwässert“. Gödecke et al. konnten in ihren Untersuchungen u.a. zeigen, dass der Anteil des von der kardialen eNOS produzierten NO in etwa 20% der von eNOS produzierten Gesamtmenge entspricht [58].

Aus diesem Grund führten Champion et al. 2004 eine Untersuchung durch, um den Einfluss der spezifisch kardialen Form der endothelialen NO-Synthase zu beleuchten [24]. Dazu wurden die Herzen von eNOS-knockout Mäusen spezifisch mit Adenoviren transfiziert, die eine normale eNOS exprimierten. So konnte im Bereich der Herzen eine normale Enzymfunktion und die physiologische Co-Lokalisation mit Caveolin-3 restituiert werden, während im restlichen Körper nach wie vor der knockout-Genotyp vorlag. Im Ergebnis zeigte sich der erwähnte kardioprotektive, „bremsende“ Effekt myokardialer eNOS bestätigt. Während knockout-, restituierte und Wildtyp-Tiere in Ruhe vergleichbare kardiovaskuläre Parameter wie Herzfrequenz, Blutdruck und kardiale Auswurfleistung zeigten, führte die Gabe von Isoproterenol zu einem signifikanten, überproportionalen Anstieg der systolischen und diastolischen Funktion bei eNOS^{-/-}-Mäusen. In adenoviral eNOS-retransfizierten Tieren waren mit dem Wildtyp vergleichbare Ergebnisse zu messen. Die durch die β -adrenerge Stimulation gesteigerte kardiale Funktion konnte durch Gabe des muscarinergen Wirkstoffs Carbachol in Wildtyp- und transfizierten Mäusen um ca. 35% abgemildert werden, bzw. die Funktionsteigerung durch Carbacholgabe vor Isoproterenolgabe nahezu verhindert werden. In Tieren ohne eNOS war dies nicht möglich: Weder kam es zur Abminderung der Funktion bei

Carbacholgabe unter β -Stimulation, noch konnte die β -Stimulation durch vorherige Applikation der muscarinergen Substanz verhindert werden.

Neben diesen Einflüssen der endothelialen NO-Synthase auf die allgemeine kardiovaskuläre Funktion konnte in mehreren Untersuchungen an Myozyten und Mäusen auch eine erhöhte Suszeptibilität für die Entwicklung kardialer Arrhythmien nachgewiesen werden.

Kubota et al. untersuchten zu diesem Thema Myozyten von Wildtyp- und eNOS^{-/-}-Mäusen [97]. Als Arrhythmieäquivalente wurden dabei arrhythmische Kontraktionen gewertet, die zusätzlich zu regelmäßigen, durch Schrittmacher-Stimulation hervorgerufenen Kontraktionen auftraten. Es zeigte sich, dass nach Stimulation mit Quabain nur ca. 20% der Wildtypzellen, aber ca. 90% der Zellen mit zerstörter eNOS solche arrhythmischen Kontraktionen aufwiesen. Um diesen Effekt auf den Mangel an NO zurückzuführen, wurde in Wildtypzellen der physiologische NO-Signalweg unterbrochen, indem medikamentös die Produktion von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) inhibiert wurde. Daraufhin waren bei 77,8% der so behandelten Wildtypzellen ebenfalls arrhythmische Kontraktionen zu beobachten. Das Gegenexperiment sollte versuchen, in eNOS^{-/-}-Zellen die NO-Versorgung wieder zu restituieren. Dazu wurde der NO-Donor S-nitroso-Acetylcystein appliziert. Die Rate an Kontraktionen sank so von 71,4% auf 11,1%. Die Ergebnisse dieser Studien wiesen nach, dass eine Unterversorgung mit eNOS-produziertem NO im Bereich des Myokards mit einem erhöhten arrhythmogenen Potential einhergeht.

Die Ergebnisse aus der Zellphysiologie konnten von Rakhit et al. 2001 am in-vivo Maus-Modell im Wesentlichen bestätigt werden [143]. Es wurden ebenfalls eNOS-knockout Mäuse untersucht und mit Wildtypkontrollen verglichen. Die Arrhythmieauslösung erfolgte durch Behandlung mit Digoxin. Dabei konnten bei den knockout-Tieren signifikant häufiger verschiedene Arten von Arrhythmien ausgelöst werden (11/17 vs. 4/11). Interessanterweise, und maßgeblich für die Initiation der vorliegenden Studie, war an eNOS^{-/-}-Mäusen auch Vorhofflimmern auslösbar.

Seit 1999 ist bekannt, dass auch die neuronale Isoform der NO-Synthase im humanen Herzen vorkommt und dort im Bereich des sarkoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist [193]. Daneben konnte an Maus, Ratte und Meerschweinchen gezeigt werden, dass nNOS in intrinsischen kardialen, cholinergen Nervenendigungen exprimiert wird, und so, wenn auch nicht in Kardiomyozyten selbst, unmittelbar Einfluss auf kardiale Steuerungsprozesse nehmen kann [28; 164].

Um den Einfluss der nNOS auf das Herz und dessen Funktionsabläufe zu untersuchen, dienten auch für dieses Enzym vorwiegend Mausmodelle mit nNOS-knockout Tieren. Zwar liegt die Anzahl der durchgeführten Untersuchungen im Vergleich zur eNOS noch deutlich niedriger, doch wurden auch hier bereits wichtige und aufschlussreiche Erkenntnisse gefunden.

Bereits 1998, vor der Entdeckung der myokardialen Expression der nNOS, waren Jumrussirikul et al. in der Lage, den Einfluss des Enzyms auf die murine Herzfrequenz und deren Regulation zu zeigen [82]. An wachen nNOS^{-/-}-Mäusen fand sich ein hochsignifikanter Unterschied in der Ruheherzfrequenz. Während die Herzfrequenz bei Wildtyptieren im Mittel bei 650±8 min⁻¹ lag, betrug sie bei knockout-Mäusen 711±8 min⁻¹. Blockade der parasympathischen Funktionen mittels Atropin führte zu einem deutlichen Anstieg bei Wildtyptieren, jedoch zu keiner wesentlichen Änderung der Herzfrequenz bei den Mutanten. Im Gegensatz dazu führte die Applikation von Propranolol zu ähnlichen Änderungen in beiden Gruppen. Die Autoren führten dies darauf zurück, dass die parasympathische Regulation der Herzfrequenz z.T. durch von nNOS produziertes NO vermittelt wird.

Zu identischen Ergebnissen kam eine Untersuchung von Choate et al aus dem Jahr 2001 [28]. Auch hier wurden nNOS-knockout-Mäuse untersucht. Zusätzlich zur Studie von Jumrussirikul wurde der sinuatriale Ast des Nervus Vagus mittels vagaler Nervenstimulation (VNS) gereizt und so der herzspezifisch parasympathische Einfluss gewährleistet. Der Abfall der Herzfrequenz als Reaktion auf die VNS trat für alle Stimulationsfrequenzen bei nNOS^{-/-}-Tieren langsamer ein als bei Wildtypkontrollen.

Einem gewissermaßen umgekehrten Ansatz folgte eine tierexperimentelle Studie von Mohan et al., die 2002 publiziert wurde [123]. Mittels adenoviralen Gentransfers wurde das für die neuronale NO-Synthase kodierende Gen NOS1 in die rechten Vorhöfe von Meerschweinchen transferiert. Die Ergebnisse waren konsistent mit den oben beschriebenen Befunden: Die Reaktion der Herzfrequenz auf VNS war im transfizierten Kollektiv sowohl in vivo als auch in vitro verstärkt. Diese Ergebnisse wurden dahingehend interpretiert, dass der vagale Einfluss auf die Herzfrequenz verstärkt wird, je mehr nNOS und damit NO zur Verfügung steht.

Schließlich konnten Danson et al. 2004 nachweisen, dass bereits der Ausfall eines einzelnen Allels ausreicht, um bei Mäusen die Regulation der neuronalen NO-Synthase und die Herzfrequenz zu beeinflussen [38]. Dazu wurden Wildtyp-Tiere und solche mit heterozygotem Verlust des Gens NOS1 untersucht. Zusammenfassend konnten die Autoren zeigen, dass Tiere, die durch Laufrad-Benutzung trainiert wurden, stärker auf vagale Reize

reagierten. Diese Reaktion war stark abgeschwächt, wenn heterozygote Tiere untersucht wurden. Ähnliche Ergebnisse wurden für die VNS erzielt. Adenoviraler Gentransfer konnte in heterozygoten Mäusen Wildtyp-Zustände wiederherstellen. In diesen transfizierten Tieren war auch die Reaktion auf VNS mit der von normalen Mäusen vergleichbar.

Neben den vorgenannten Untersuchungen zum Einfluss der nNOS auf die Herzfrequenz durch Regulation des parasymphatischen Tonus liegen auch eine Reihe von Studien von der Oxford University vor, die sich mit dem Einfluss des Enzyms auf die kardiale Kontraktilität sowie den Calcium-Haushalt befassen.

Ashley et al. publizierten 2002 eine Studie an aus nNOS^{-/-}-Mäusen isolierten Kardiomyozyten [11]. Es zeigte sich, dass, gemessen an der Zellverkürzung, nNOS^{-/-}-Kardiomyozyten im Vergleich zu Wildtypzellen eine deutlich erhöhte Kontraktilität in Ruhe aufweisen. Die unspezifische, pharmakologische Ausschaltung von nNOS in Wildtyp-Kardiomyozyten führte zu vergleichbaren Werten der Zellverkürzung wie in knockout-Zellen, in letzteren konnte jedoch keine zusätzliche Zellverkürzung gemessen werden. Nach β -adrenerger Stimulation mit Isoproterenol nahm die Zellverkürzung in nNOS^{-/-}-Zellen und in pharmakologisch inhibierten Wildtypzellen hochsignifikant zu, während in unbehandelten Wildtypzellen lediglich ein geringer Zuwachs zu messen war.

Sears et al. aus derselben Arbeitsgruppe veröffentlichten zu diesem Thema 2003 eine Arbeit, die die nNOS-abhängige myokardiale Kontraktion und den Calcium-Haushalt an nNOS^{-/-}-Mäusen in vivo und in vitro untersuchte [157]. So war die Kontraktilität, gemessen mittels linksventrikulärer Ejektionsfraktion, bei nNOS^{-/-}-Tieren deutlich höher als bei Kontrollen. Diese Ergebnisse konnten an isolierten Kardiomyozyten durch Messung der Zellverkürzung bestätigt werden. Pharmakologische Inhibition der nNOS in Kontrollen ließ die Kontraktilitätsparameter auf ähnliche Werte ansteigen, wie in knockout-Mäusen bzw. -Kardiomyozyten. Weiterhin konnte die Gruppe zeigen, dass die sarkoplasmatischen Calciumströme bei nNOS^{-/-}-Myozyten erhöht und die Konstante für die langsame Kanalaktivierung verlängert ist. Dies führte zu verstärktem Calciumeinstrom in das sarkoplasmatische Retikulum und dort konsekutiv zu erhöhter Calciumbelastung. In Übereinstimmung mit diesen Daten waren bei nNOS^{-/-}-Mäusen die Calcium-Spitzenströme erhöht.

Bis heute finden sich in der Literatur keine Veröffentlichungen, die einen möglichen Zusammenhang zwischen nNOS und dem Auftreten von Arrhythmien untersuchen.

Die vorstehend beschriebenen Studien zur neuronalen NO-Synthese im Herzen konnten jedoch übereinstimmend nachweisen, dass ein Ausfall des Enzyms mit einer deutlichen

Beeinträchtigung der vagalen Regulation der Herzfrequenz und der kardialen Kontraktilität einhergeht. Sowohl Cogliati et al. [29] am Mausmodell als auch Cole et al. [32] an Menschen legten dar, dass eine gestörte vagale Regulation der Herzfunktion ein starker Prädiktor für die Entstehung von Arrhythmien ist und mit erhöhter Mortalität gekoppelt ist. Aus diesem Grund erschien es sinnvoll, in der vorliegenden Untersuchung auch das Gen für die neuronale NO-Synthase hinsichtlich der Relevanz für die Entstehung von Vorhofflimmern zu untersuchen.

Um den Einfluss der beiden Gene NOS1 und NOS3 auf AF zu untersuchen, wurde eine genetische Assoziationsstudie durchgeführt, in der drei verschiedene SNPs der beiden Gene untersucht wurden. Diese sollen in den folgenden Abschnitten näher beschrieben werden.

4. Hintergrund der untersuchten Genpolymorphismen

4.1 c.894G>T / p.Glu298Asp/ p.E298D-Variante in Exon 7 des NOS3-Gens

Das NOS3-Gen, welches die endotheliale NO-Synthase kodiert, befindet sich im menschlichen Genom auf Chromosom sieben und wurde dem Locus 7q35-36 zugeordnet (NM_000603). Das Gen wurde in seiner Struktur und chromosomalen Lokalisation erstmals 1993 von Marsden et al. ausführlich beschrieben [115]. In der aktuellen Version des Human Genome Browsers der University of California in Santa Cruz (Human Genome Assembly März 2006 (hg18)) erstreckt sich das Gen über eine Länge von 23.530 kb (chr7:150.319.079-150.342.608) [90]. Es enthält 26 Exons, die zu einer mRNA aus 4032 Nukleotiden ohne Poly-A-Schwanz transkribiert werden. Nach der Translation entsteht hieraus das 1203 Aminosäuren lange und 135 kDa schwere Protein eNOS [115]. Die Datenbank SNPper benutzt eine im Vergleich zu Marsden aktuellere Version des Human Genome Assembly (hg17) und listet für das NOS3-Gen eine 3612 bp lange mRNA auf, die für 1204 Aminosäuren inkl. Stopkodon kodiert [145]. 22 bp in 5'-Richtung vom Methionin-Startkodon ausgehend konnte eine sog. TATA-less Promotor-Sequenz lokalisiert werden, was anstelle einer TATA-Box als Transkriptionsstartpunkt auf mehrere untergeordnete Initiierungs-Sequenzen hinweist [158].

Im Bereich des Exons 7 existiert an der Position 894 der cDNA ein üblicher SNP, der bereits von Marsden [115] und mehreren weiteren Gruppen beschrieben wurde. Dieser Polymorphismus führt zu einem Basenaustausch von Guanin zu Thymin, was posttranslational in einem Aminosäureaustausch an der Position 298 von Glutamat zu Aspartat resultiert (c.894G>T bzw. p.Glu298Asp bzw p.E298D). Dieser SNP ist mit der Nummer rs1799983 in den gängigen Datenbanken gelistet. Laut HapMap-Genomdatenbank sind die beiden Allele in der Bevölkerung mit ethnisch nord- und westeuropäischem Hintergrund wie folgt verteilt: G: 0,658 vs. T: 0,342 [171].

Xing und Kollegen [179] wiesen nach, dass die Plasma-NO-Nüchternspiegel in etwa zu 30% von der NO-Produktion der eNOS abhängen. Der erwähnte p.E298D-SNP führt dabei auch bei homozygotem Vorliegen nicht zu einer direkten Veränderung der Plasmaspiegel. Diskutiert wird jedoch, dass das Vorliegen der 298D-Variante zu einem verstärkten Abbau der endothelialen NO-Synthase führt, da die allelische Proteinvariante zu saurer Hydrolyse prädisponiert. Dadurch kommt es zu einer signifikanten Erniedrigung der Bioverfügbarkeit von NO [48; 169].

Genetische Assoziationsstudien der Vergangenheit konnten einen Einfluss des p.E298D-SNPs auf die Entstehung und Prognose einer Vielzahl von Krankheitsbildern nachweisen. Darunter finden sich sowohl die ischämische [23] als auch die nicht-ischämische [119] Herzinsuffizienz, die koronare Herzerkrankung [34; 71], die Atherosklerose [104], das Höhenlungenödem [44], Adipositas [114], die diabetische Retinopathie [12] und die essentielle Hypertonie [121; 135]. Insbesondere für letzteres Krankheitsbild existieren jedoch widersprüchliche Ergebnisse, wobei vor allem ethnische Unterschiede eine Rolle zu spielen scheinen [92; 188].

4.2 c.3391C>T-Variante in Exon 18 des NOS1-Gens

Die neuronale NO-Synthase wird durch das Gen NOS1 kodiert. Es liegt auf Chromosom 12 des menschlichen Genoms im Bereich der Banden 12q24.2 bis 12q24.3. Eine umfassende Betrachtung des Gens findet sich bei Wang et al. [180] aus dem Jahr 1999. In voller Länge besteht NOS1 aus 29 Exons. Das Transkript misst im open reading frame 4302 nt. Der Transkriptions-Start- bzw. Endpunkt liegt im Bereich von Exon 2 bzw. Exon 29. Exon 1 dient der Transkriptionsregulierung und wird dementsprechend nicht translatiert. Auch bei NOS1 ist kein Promotor im klassischen Sinn vorhanden, sondern es liegt ein kompliziertes System vor, das u.a. allelic variation, alternative promotor usage und alternative splicing einschließt (s.u.). Der Genombereich, der die nNOS kodiert, umspannt die im Vergleich zu iNOS und eNOS große Weite von mehr als 240 kb. Das Genprodukt besteht bei maximaler Länge aus 1434 Aminosäuren und bildet ein ca. 160 kDa schweres Enzym.

Im Bereich von Exon 18, an Position 3391 der cDNA befindet sich ein bekannter Polymorphismus, der zu einem Basenaustausch von Cytosin zu Thyrosin führt (c.3391C>T). Dieser SNP ist mit der Nummer rs1047735 gelistet, liegt an Codon-Position drei und resultiert aufgrund des redundanten genetischen Codes nicht in einer Veränderung der hier kodierten Aminosäure Histidin. Die Allelfrequenzen für die Populationen, in denen der Polymorphismus bereits genotypisiert wurde, sind in der Datenbank dbSNP veröffentlicht [160]. Für europäisch-kaukasische Populationen werden diese folgendermaßen beziffert: C: 0,521 vs. T: 0,479. Ob und in welchem Ausmaß die vorliegende Mutation das Genprodukt beeinflusst, ist der aktuellen Studienlage nicht zu entnehmen.

SNPs der nNOS sind bisher nicht in dem Maße untersucht wie bei der eNOS, jedoch findet sich auch hier eine Reihe an Studien. Insbesondere konnte eine Assoziation zwischen einer Mutation im Bereich des Exons 29 und den Erkrankungen Hypertonie [79], Schizophrenie

[161], Atopie [73], Asthma [77; 105] und Morbus Parkinson [106] nachgewiesen werden. Eine Studiengruppe um Grasemann et al. [59; 60; 61] beschäftigte sich mit verschiedenen Repeatpolymorphismen in den Exons 20 und 29 und stellte einen Zusammenhang zwischen zwischen NO-Spiegeln in der Expirationsluft von Patienten mit zystischer Fibrose und Asthma her. Allerdings zeigten sich auch signifikante Unterschiede in der Allelhäufigkeit bei verschiedenen ethnischen Gruppen.

Arbeitsgruppen, die sich mit dem hier untersuchten Polymorphismus c.3391C>T in Exon 18 befassten, konnten dabei eine Korrelation zur Anzahl eosinophiler Leukozyten bei Asthmatikern nachweisen [77]; eine Verbindung zu Morbus Parkinson herzustellen, gelang jedoch nicht [106].

4.3 c.-84G>A-Variante im Exon 1c Promotor des NOS1-Gens

Die Verhältnisse bei der Regulation der Transkription von NOS1 sind sehr komplex. Für das Exon 1 liegen neun verschiedene bisher bekannte Varianten vor, die als Exon 1a – 1i bezeichnet werden [181]. Durch das sog. alternative splicing wird, abhängig von verschiedenen, bisher nur z.T. bekannten, physiologischen und pathophysiologischen Umständen jeweils nur eine Variante transkribiert, was zu unterschiedlichen mRNAs führt. Die Unterschiede in der Exon-1-Konfiguration befinden sich im Bereich des nicht translatierten 5'-Endes der mRNA. Die Folgen für das entstehende Protein sind verschiedenster Art. Einerseits resultiert eine je nach Exon 1-Variante verschiedene Translationsrate, wodurch die Endmenge des Proteins beeinflusst wird. Andererseits kommt es in den noch zu transkribierenden Bereichen der mRNA teilweise zu Exon-Insertionen / -Deletionen und damit zu Unterschieden in der Proteinstruktur (nNOS α , nNOS β , nNOS γ). [152; 153; 154].

Die Studienlage bzgl. der Verteilung der Exon 1 Varianten in verschiedenen Körperzellen und die resultierende Bedeutung für die jeweiligen Zell- und Körperfunktionen ist insbesondere mit Blick auf Genpolymorphismen überschaubar. Im Jahr 2003 beschrieben Saur et al. erstmalig einen SNP im Bereich des Promotors für Exon 1c, der an Basenposition -84 bezüglich des Exon 1c-Transkriptionsstartpunktes für einen Austausch von Guanosin zu Adenin sorgt (c.-84G>A). Frühere Arbeiten dieser Gruppe ergaben, dass im menschlichen Gastrointestinaltrakt und insbesondere im Bereich des Pylorus die Exon-Variante 1c transkribiert wird. Für den beschriebenen SNP konnten sie eine hochsignifikante Assoziation mit der infantilen hypertrophen Pylorusstenose nachweisen [155].

Aus der Literatur ist nicht ersichtlich, ob Exon 1c auch im Bereich des Herzens transkribiert wird, und der Polymorphismus deshalb im Hinblick auf Vorhofflimmern relevant ist. Das Gen NOS1 darf aber, wie weiter unten in Abschnitt 10.1.2 der Diskussion ausgeführt wird, als interessantes Kandidatengen für pathophysiologische Assoziationen zu der Rhythmusstörung gelten. Die erwähnte, bei Saur et al. beschriebene Assoziation war sehr deutlich was eine erhöhte a priori Wahrscheinlichkeit bedeutet, auch bei anderen Erkrankungen eine Rolle zu spielen. Wir entschlossen uns deshalb, den SNP auch in der vorliegenden Untersuchung zu prüfen.

5. Zielsetzung der Arbeit

In der Literatur ergeben sich, wie beschrieben, eine Reihe von Hinweisen, dass NO maßgeblich an der Genese von Vorhofflimmern beteiligt ist. Dabei ist anzunehmen, dass durch SNPs die Expression und / oder Funktion der Gene verändert wird, die für die Produktion von NO verantwortlich sind. Man kann annehmen, dass bei verringerter Expression oder verminderter Funktion des zugehörigen Gens auch die NO-Spiegel als Genprodukt absinken und so an der Auslösung der Rhythmusstörung beteiligt sind.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, alle in die Studie eingeschlossenen Patienten hinsichtlich der drei ausgewählten SNPs zu genotypisieren. Anhand der gefundenen Allelfrequenzen soll für jeden Polymorphismus geklärt werden, ob, und wenn ja, welcher Genotyp mit dem Auftreten von Vorhofflimmern assoziiert ist.

Zwei weitere Hypothesen werden getestet: Der Einfluss genetischer Varianten auf die Entstehung von Erkrankungen ist in verschiedenen Alters- und Geschlechtsgruppen unterschiedlich. Um dieser Tatsache gerecht zu werden, wurde die gesamte Studienpopulation substratifiziert. Die zwei untersuchten Substrata wurden vor der Erhebung definiert:

- Weibliche Studienteilnehmer (ohne weitere Beachtung möglicher Altersunterschiede)
- Studienteilnehmer bis zum Alter von 60 Jahren (ohne weitere Betrachtung möglicher Geschlechtsunterschiede)

Eine Begründung der Stratifizierung und genaue Beschreibung der jeweiligen Subpopulationen erfolgt in Abschnitt 6.5. In beiden Untergruppen wurden dieselben Analysen durchgeführt wie in der Gesamtgruppe.

6. Patientenkollektiv

6.1 Erhebung der Patientendaten

Alle in diese Fall-Kontroll-Studie aufgenommenen Patienten wurden in den Jahren 2000 bis 2003 im Deutschen Herzzentrum München, Klinik für Herz- und Kreislaufkrankheiten im Erwachsenenalter, und in der I. und II. Medizinischen Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München rekrutiert. Die Aufnahme in die Studie erfolgte prospektiv in der Reihenfolge der Aufnahme in die genannten Kliniken, sobald alle Ein- und Ausschlusskriterien geprüft und erfüllt waren. Die Teilnehmer der Kontrollgruppe stammten aus denselben Kliniken.

6.2 Ethik-Kommission

Alle Patienten wurden bei Einschluß in die Studie über den Hintergrund und die Zielsetzungen der Untersuchung sowie die Blutentnahme zur DNA-Analyse unterrichtet. Jeder Teilnehmer gab nach Aufklärung sein Einverständnis zur Teilnahme in schriftlicher Form. Die Studie entspricht den Richtlinien der Deklaration von Helsinki und wurde von der Ethik-Kommission des Deutschen Herzzentrums München genehmigt.

6.3 Ein- und Ausschlusskriterien

Im Studienzeitraum wurde bei 1855 Patienten Vorhofflimmern diagnostiziert. Von insgesamt 903 Patienten lagen dabei sowohl eine entsprechende Einverständniserklärung als auch die benötigte Blutprobe vor. Die Diagnose der Rhythmusstörung wurde von einem Kardiologen aufgrund wenigstens eines 12-Kanal Ruhe-Elektrokardiogramms (EKG) gestellt.

Eine Reihe von Begleiterkrankungen wurden als starke Risikofaktoren für die Entwicklung von sekundärem Vorhofflimmern angesehen. Aus diesem Grund wurden Patienten, bei denen eine oder mehrere dieser Erkrankungen vorlagen von der Studie ausgeschlossen. Im Einzelnen waren dies:

- Mäßig- bis höhergradige Klappenvitien, entsprechend einem Schweregrad $> \text{I-II}^\circ$ auf einer Skala von 0-IV.
⇒ Ausschluss von 184 Patienten
- Mäßig- bis schwere Herzinsuffizienz entsprechend einem Schweregrad $\geq \text{III}$ gemäß der NYHA-Klassifikation.
⇒ Ausschluss von 91 Patienten
- Hyperthyreose.
⇒ Ausschluss von 83 Patienten

Insgesamt wurden so 246 Patienten mit Vorhofflimmern aus der Studie ausgeschlossen. 657 Patienten konnten in die Erhebung aufgenommen werden.

Die Kontrollgruppe wurde gebildet von insgesamt 672 Individuen. Diese durften keine vorhofflimmer-typische Anamnese mit Hinweisen auf Palpitationen, Synkopen, absolute Arrhythmie oder Thrombembolien kardialer Genese aufweisen. In wenigstens einem 12-Kanal Ruhe-EKG musste Sinusrhythmus nachgewiesen sein.

Aufgrund des breiten Verteilungsmusters in der Bevölkerung wurden Patienten mit koronarer Herzkrankheit, arterieller Hypertonie und anderen allgemeinen kardiovaskulären Risikofaktoren bewusst nicht von der Studienteilnahme ausgeschlossen. Bezüglich dieser Faktoren erfolgte keine spezielle Angleichung zwischen Fall- und Kontrollgruppe.

Einen Überblick über die Ausschlusskriterien gibt die Tabelle 6.1 im folgenden Abschnitt.

6.4 Verteilung klinischer Basischarakteristika in der unstratifizierten Fall- und Kontrollgruppe

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Verteilung klinischer Basischarakteristika in der unstratifizierten Fall- und Kontrollgruppe. Weiterhin ist zu ersehen, wie sich die von der Studie ausgeschlossenen Patienten auf die drei oben erwähnten Krankheitszustände verteilten.

	Vorhofflimmern	Sinusrhythmus	p-Wert
	n=903		
Männeranteil	571 (63,2%)		
Alter in Jahren (mean ± SD)	69,63 ± 11,52		
Patienten mit Ausschlusskriterien (≥ 1)	n=246		
Höhergradige Herzinsuffizienz	n=91		
Höhergradiges Klappenvitium	n=184		
Hyperthyreose	n=83		
Eingeschlossene Patienten	n=657	n=672	
Männeranteil	457 (69,6%)	473 (70,4%)	0,7419
Hypertonie	503 (76,7%)	556 (83,2%)	0,0029
KHK	335 (51,0%)	501 (74,6%)	<,0001
Diabetes	112 (17,0%)	131 (19,6%)	0,2230
Hypercholesterinämie	428 (65,2%)	575 (85,8%)	<,0001
Adipositas	387 (59,2%)	414 (62,2%)	0,2665
Familiäre Belastung (kardiale Erkrankungen)	133 (20,5%)	209 (31,5%)	<,0001
Nikotinabusus	143 (21,9%)	254 (38,0%)	<,0001
Herzinsuffizienz	82 (12,5%)	76 (11,4%)	0,5153
Alter in Jahren (mean ± SD)	69,07 ± 10,80	65,17 ± 11,56	<,0001
Mittl. Blutdruck in mmHg (mean ± SD)	96,27 ± 13,89	98,07 ± 13,40	0,0341
Body Mass Index (mean ± SD)	26,91 ± 3,95	27,35 ± 4,23	0,0710

Tab. 6.1: Verteilung klinischer Basischarakteristika zwischen den beiden Gruppen. Der obere Teil der Tabelle gibt Informationen über Ausschlusskriterien in der AF-Gruppe. Frauen waren innerhalb der Gruppe mit Hyperthyreose überrepräsentiert. Angegeben sind die absolute Anzahl der Personen in den Gruppen sowie der prozentuale Anteil. Stetige Daten sind dargestellt als Mittelwert (mean) ± Standardabweichung (SD).

6.4.1 Geschlechter- und Altersverteilung in der unstratifizierten Gesamtgruppe

Die Gruppe der Patienten mit Vorhofflimmern wurde gebildet von 457 Männern (69,9%) und 200 Frauen (30,4%). Demgegenüber fanden sich in der Kontrollgruppe 473 Männer (70,4%) und 199 Frauen (29,6%). Die Geschlechterverteilung unterschied sich damit nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen ($p=0,7419$) (vgl. Tab. 6.1; Abb. 6.1).

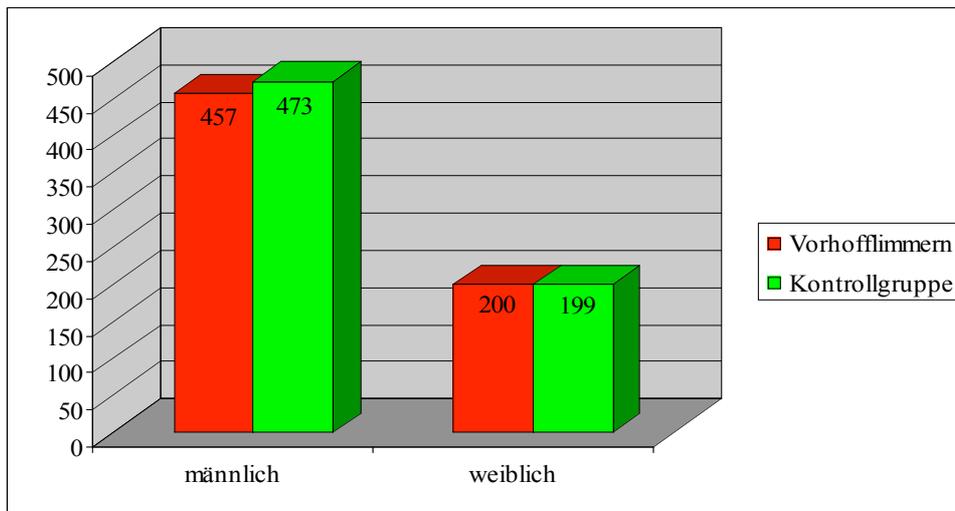


Abb.6.1: Geschlechterverteilung zwischen AF- und Kontrollgruppe in der unstratifizierten Population

Die Altersstruktur der beiden Gruppen unterschied sich signifikant voneinander ($p < 0,0001$). In der AF-Gruppe lag das mittlere Alter bei $69,07 \pm 10,80$ Jahren. Der jüngste Studienteilnehmer war dabei 33, der älteste 95 Jahre alt. Die Spannweite in der Kontrollgruppe reichte von 19 bis 93 Jahren, wobei der Mittelwert des Alters bei $65,17 \pm 11,56$ Jahren lag (vgl. Tab. 6.1; Abb. 6.2 und 6.3).

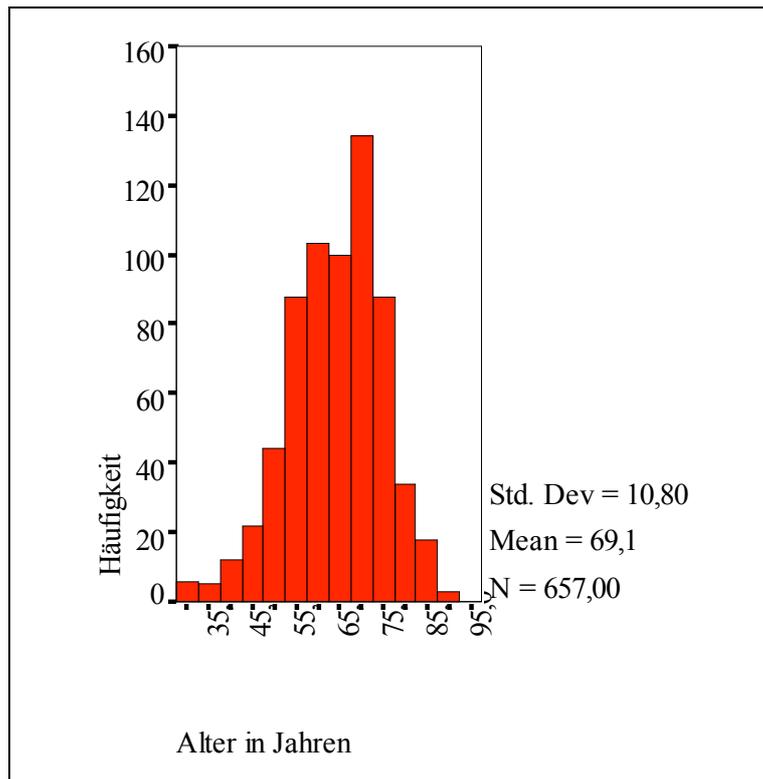


Abb.6.2: Altersverteilung in der AF-Gruppe der unstratifizierten Population. Mean = Mittelwert, Std. Dev = Standardabweichung.

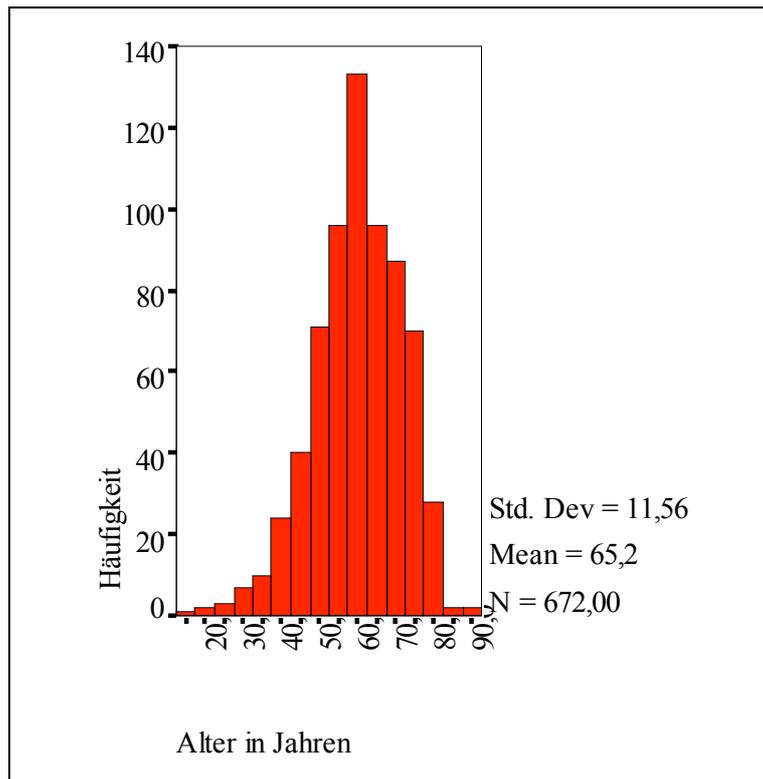


Abb.6.3: Altersverteilung in der Kontrollgruppe der unstratifizierten Population. Mean - Mittelwert, Std. Dev – Standardabweichung.

6.4.2 Häufigkeit kardiovaskulärer Risikofaktoren

Bedingt durch die vorwiegende Erhebung der Patienten in einer kardiologischen Klinik ergab sich zwischen den beiden Gruppen ein deutlicher Unterschied hinsichtlich der Häufigkeit der koronaren Herzkrankheit (KHK). Dabei wiesen Patienten mit Vorhofflimmern zu 51,0% der Fälle, entsprechend 335 Individuen, eine koronare Herzkrankheit auf. In der Kontrollgruppe waren dies 74,6% oder 501 Personen. Dieser Unterschied ist signifikant ($p < 0,0001$).

Die Untersuchung der üblichen kardiovaskulären Risikofaktoren ergab ein ähnliches Bild. Hierbei ergaben sich signifikante Unterschiede in der Häufigkeit der Hypertonie, der Hypercholesterinämie, des Nikotinabusus und der familiären Disposition zur Entwicklung einer KHK. Die Häufigkeiten von Diabetes mellitus und Adipositas zeigten sich hingegen nicht signifikant verschieden. Die folgende Abbildung gibt einen Überblick über die Verteilung der erwähnten Risikofaktoren (vgl. Abb. 6.4):

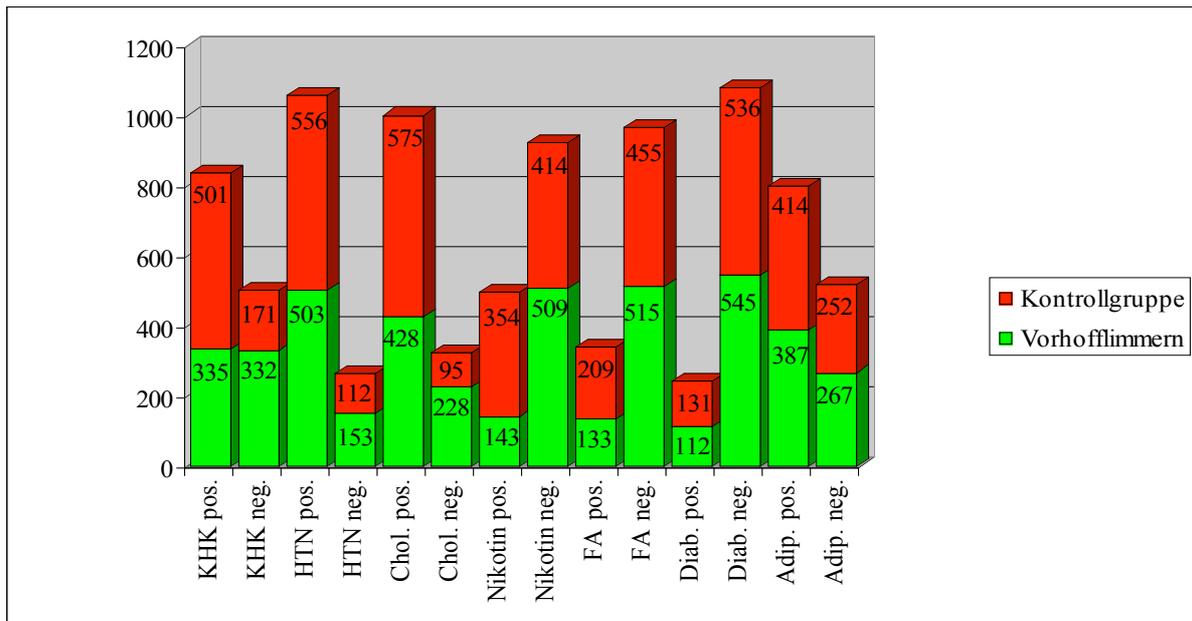


Abb. 6.4: Übersicht über die Verteilung der koronaren Herzerkrankung und wichtiger kardiovaskulärer Risikofaktoren in der unstratifizierten Gesamtpopulation. KHK – koronare Herzkrankheit; HTN – Hypertonie; Chol. – Hypercholesterinämie; Nikotin – Nikotinabusus; FA – Familienanamnese; Diab. – Diabetes mellitus; Adip. – Adipositas. Zur Gesamtzahl der Studienteilnehmer unterschiedliche Fallzahlsummen sind auf fehlende Daten in der Erhebung zurückzuführen.

Die Zahl der Hypertoniker unter den Patienten mit Vorhofflimmern betrug 503, was einem Anteil von 76,7% entspricht. Die Patienten ohne AF litten hingegen zu 83,2% an hypertonen Blutdruckwerten (556 Personen). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war mit $p=0,0029$ signifikant. Die Untersuchung des mittleren Blutdrucks konnte diese Verschiedenheit ebenfalls objektivieren. Dieser schwankte in der AF-Gruppe um einen Mittelwert von $96,27 \pm 13,89$ mmHg, in der Kontrollgruppe von $98,07 \pm 13,40$ mmHg (vgl. Abb. 6.5 und 6.6).

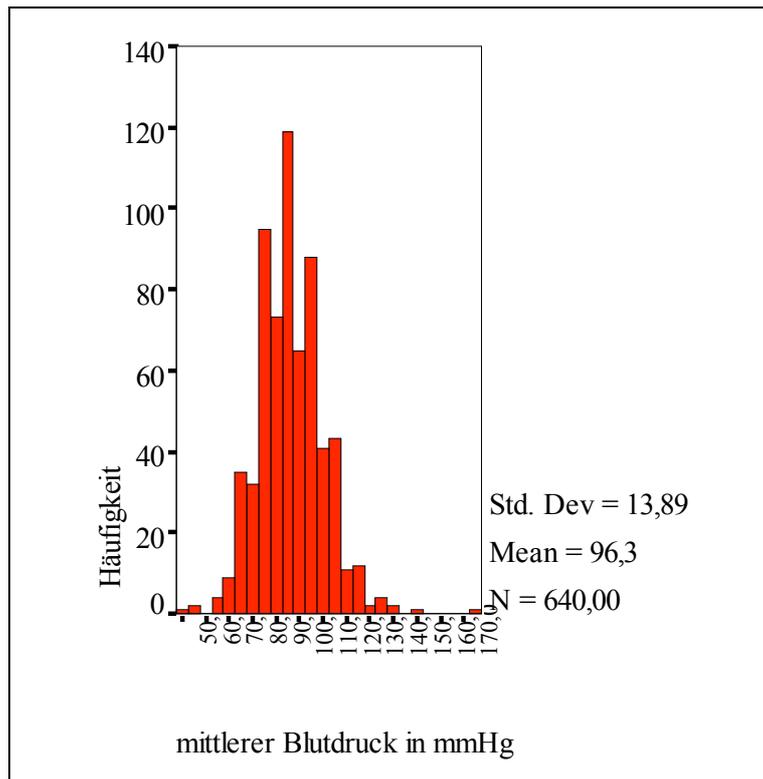


Abb. 6.5: Darstellung des mittleren Blutdrucks in der AF-Gruppe der unstratifizierten Gesamtpopulation. Mean – Mittelwert; Std. Dev – Standardabweichung.

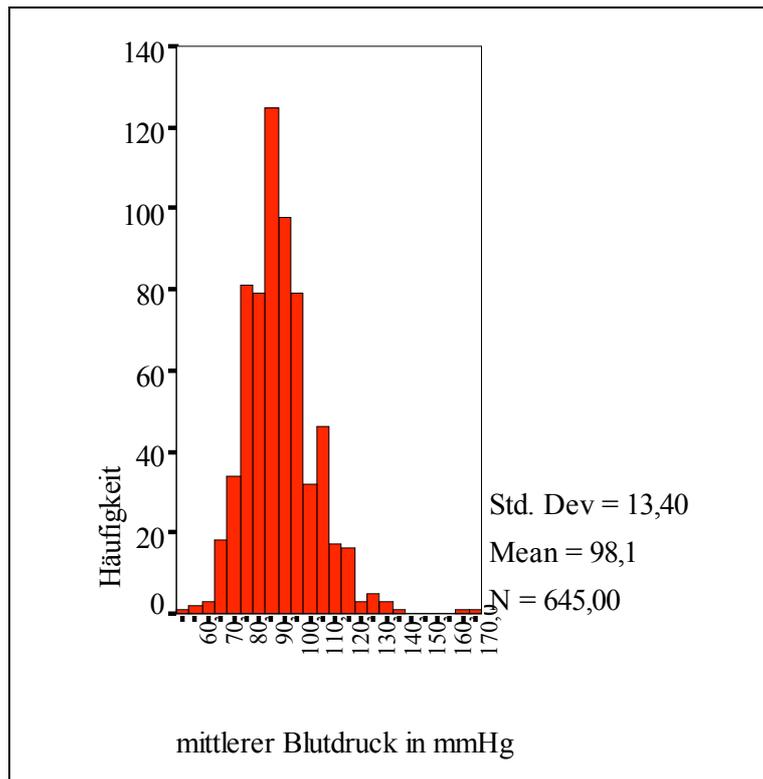


Abb. 6.6: Darstellung des mittleren Blutdrucks in der Kontrollgruppe der unstratifizierten Gesamtpopulation. Mean – Mittelwert; Std. Dev – Standardabweichung.

Die signifikanten Unterschiede ($p < 0,0001$) in den Gruppen bezüglich der Hypercholesterinämie stellten sich folgendermaßen dar: 428 Personen (65,2%) mit AF gegenüber 575 Personen (85,8%) ohne AF.

Ein Nikotinabusus fand sich bei 143 Probanden (21,9%) der Flimmergruppe, jedoch bei 254 Studienteilnehmern (38,0%) mit Sinusrhythmus.

133 Patienten mit Vorhofflimmern, 20,5%, wiesen eine positive Familienanamnese für die Entwicklung von Herzkranzgefäßverengungen auf. In der Kontrollgruppe lag der Anteil mit 31,5%, entsprechend 209 Personen, deutlich darüber. Sowohl hinsichtlich des Nikotinabusus, als auch hinsichtlich der familiären Belastung waren die Unterschiede mit $p < 0,0001$ signifikant.

Obwohl auch Diabetes mellitus und Adipositas zu den kardiovaskulären Risikofaktoren gezählt werden, war hier eine andere Verteilung auf die Gruppen zu verzeichnen. 112 Patienten (17,0%) mit Vorhofflimmern litten zusätzlich an Diabetes mellitus. Im Patientengut ohne AF waren dies 131 Individuen (19,6%). Mit $p = 0,2230$ konnte nicht auf eine unterschiedliche Verteilung zwischen den beiden Gruppen geschlossen werden. Ähnliches zeigte die Untersuchung auf Vorliegen von Übergewicht: Der Body Mass Index (BMI) betrug

bei Studienteilnehmern mit AF im Mittel $26,91 \pm 3,95$ Punkte. Es wurden dabei Werte zwischen 16,63 und 47,34 errechnet. Auf der Seite der Kontrollgruppe lag der Mittelwert bei $27,35 \pm 4,23$ (15,24 – 56,44). Damit war mit $p=0,0710$ kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen nachzuweisen (vgl. Abb. 6.7 und 6.8). Betrachtete man das qualitative Merkmal Adipositas, so bestätigte sich mit 387 (59,2%) übergewichtigen Patienten mit Vorhofflimmern und demgegenüber 414 (62,2%) mit Sinusrhythmus das Ergebnis der BMI-Untersuchung ($p=0,2665$).

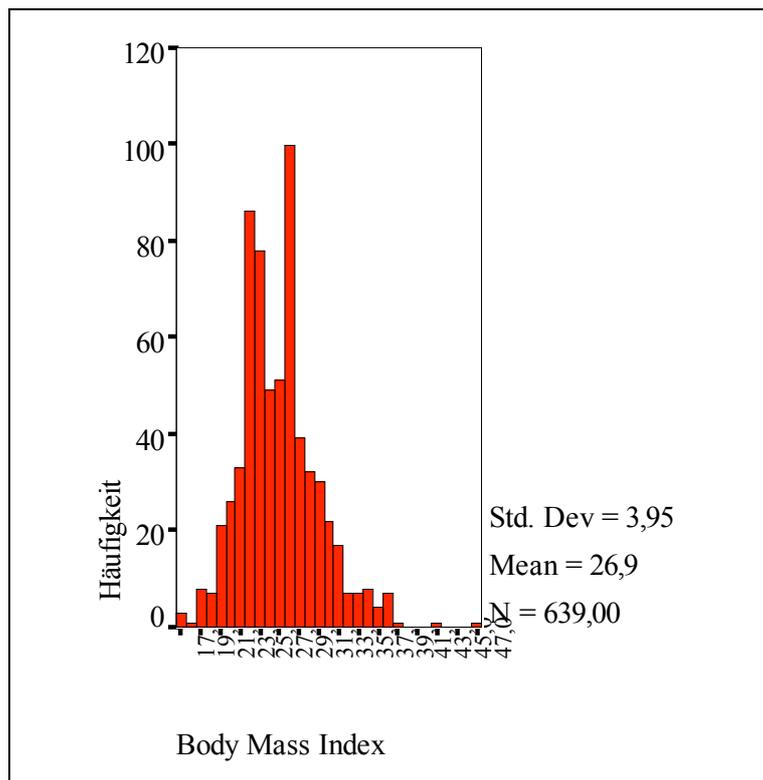


Abb. 6.7: Darstellung des BMI in der AF-Gruppe der unstratifizierten Gesamtpopulation. Mean – Mittelwert; Std. Dev – Standardabweichung.

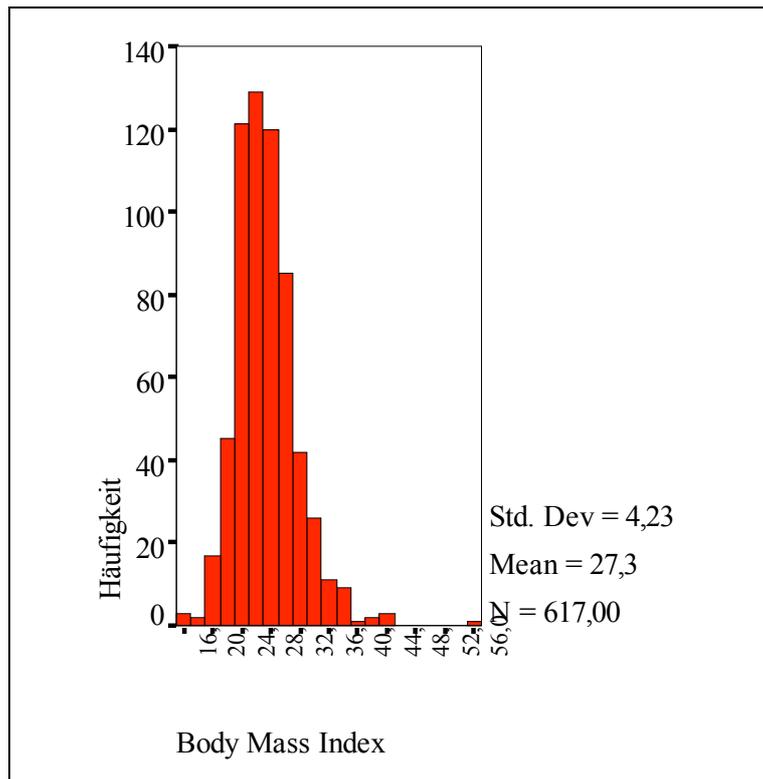


Abb. 6.8: Darstellung des BMI in der Kontrollgruppe der unstratifizierten Gesamtpopulation. Mean – Mittelwert; Std. Dev – Standardabweichung.

Herzinsuffizienz gleich welcher Genese zählt zu den bekannten Risikofaktoren für die Entwicklung von Vorhofflimmern (s.o.). Patienten mit klinischen Symptomen der Herzinsuffizienz vom Schweregrad NYHA III oder höher wurden daher von der Studienteilnahme ausgeschlossen. Die verbliebenen Patienten beider Gruppen, die Symptome der Schweregrade NYHA I-II zeigten, wurden miteinander verglichen. Dabei zeigte sich bei 82 (12,5%) AF-Patienten und 76 (11,6%) Kontrollpatienten kein signifikanter Unterschied ($p=0,5153$) (vgl. Abb. 6.9).

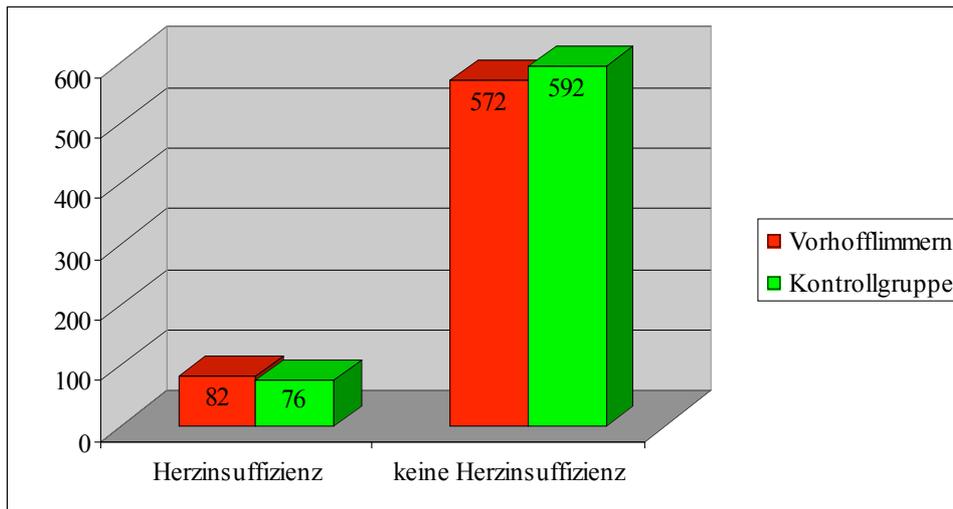


Abb. 6.9: Verteilung der Herzinsuffizienz mit klinischem Schweregrad NYHA I-II zwischen der AF- und der Kontrollgruppe in der unstratifizierten Gesamtpopulation.

6.5 Substratifizierung

Auf die Substratifizierung wurde bereits im Rahmen der Zielsetzung der Arbeit (Abschnitt 5) hingewiesen.

Epidemiologische Untersuchungen und die klinische Erfahrung zeigen deutlich, dass Vorhofflimmern bei Männern ungleich häufiger auftritt, als bei Frauen [50; 57; 87]. Das gleiche gilt für die Verteilung der Risikofaktoren für die Entstehung von sekundärem AF [96]. Zwar tritt Vorhofflimmern bei Frauen entsprechend seltener auf, allerdings nicht nur im Kontext vorliegender Risikofaktoren. Dies veranlasst zu der Annahme, dass bei Frauen der Einfluss genetischer Faktoren stärker ist, als bei Männern. Aus diesem Grund wurde vor der Erhebung von Daten eine Subgruppe definiert, in der nur weibliche Studienteilnehmer analysiert. Klinische Charakteristika dieser Gruppe folgen im Anschluss (Abschnitt 6.6).

Dieselben epidemiologischen Studien zeigen ebenfalls zweifelsfrei, dass die Prävalenz von Vorhofflimmern in höherem Alter unverhältnismäßig stark ansteigt. Jüngere Personen, namentlich solche bis zum 60. Lebensjahr, sind deutlich seltener von der Rhythmusstörung betroffen. Man kann daher davon ausgehen, dass bei Patienten, die in jungen Jahren Vorhofflimmern entwickeln, ebenfalls genetisch fixierte Einflussfaktoren eine größere Rolle spielen. Diese Hypothese wird gestützt durch zwei Veröffentlichungen, die an großen Populationen überprüften, ob eine familiäre Disposition zur Entstehung von AF bei Nachkommen vorliegt, wenn bereits deren Eltern erkrankt waren. Die Framingham Offspring Study wurde an den Nachkommen der Teilnehmer der Framingham Heart Study durchgeführt

[52]. Dabei erhöhte sich das Risiko für Kinder eines betroffenen Elternteils um eine odds ratio von 1,85 (95% KI 1,12-3,06; $p=0,02$), ebenfalls zu erkranken. Diese odds ratio stieg deutlich auf 3,23 (95% KI 1,87-5,58; $p<0,001$) an, wenn nur Nachkommen betrachtet wurden, deren Eltern vor dem 75. Lebensjahr erkrankten. Die zweite Studie stammt aus Island und wurde Anfang 2006 publiziert [10]. In Island besteht ein sehr umfangreiches genealogisches Register, mit dessen Hilfe weit mehr als 5000 Personen, die seit 1987 an Vorhofflimmern erkrankten, hinsichtlich einer familiären Häufung von AF untersucht wurden. Die Ergebnisse waren vergleichbar mit denen der oben zitierten Framingham Offspring Study: Verwandte 1. Grades von Patienten mit Vorhofflimmern trugen ein relatives Risiko von 1,77 (95% KI 1,67-1,88; $P<0,001$), selbst auch zu erkranken. Das relative Risiko stieg auf 4,67 (95% KI 3,57-6,08; $p<0,001$), wenn sich die Berechnung auf Eltern beschränkte, die vor ihrem 60. Lebensjahr an AF erkrankten. Aus diesen Gründen wurde die Gesamtgruppe nach Alter stratifiziert und eine Untergruppe aus Teilnehmern bis zum einschließlich 60. Lebensjahr gebildet. Auch hier folgen genauere Angaben zu Basischarakteristika im Anschluss (Abschnitt 6.6.1).

Weitere Strata wurden nicht definiert und nicht getestet, da sich zum einen das Verhältnis von Patienten mit und ohne Vorhofflimmern nachhaltig verändert hätte; zum anderen wäre die Fallzahl einzelner Gruppen so klein geworden, dass eine aussagekräftige statistische Analyse nicht mehr möglich gewesen wäre.

6.6 Substratifizierung nach Geschlecht (nur weibliche Studienteilnehmer)

In der ersten Untergruppe wurden altersübergreifend alle Studienteilnehmer weiblichen Geschlechts eingeschlossen. Von diesen litten 200 Frauen an Vorhofflimmern, 199 wiesen die Rhythmusstörung nicht auf. Die folgende Tabelle 6.2 weist wesentliche klinische Basisdaten der stratifizierten Studienpopulation aus.

	Vorhofflimmern	Sinusrhythmus	p-Wert
Hypertonie	158 (79,4%)	173 (87,4%)	0,0328
KHK	84 (42,0%)	120 (60,3%)	0,0003
Diabetes	38 (19,0%)	52 (26,3%)	0,0833
Hypercholesterinämie	126 (63,3%)	155 (78,3%)	0,0010
Adipositas	115 (57,5%)	122 (61,6%)	0,4028
Familiäre Belastung	37 (18,7%)	60 (30,6%)	0,0066
Nikotinabusus	21 (10,5%)	46 (23,2%)	0,0007
Herzinsuffizienz	22 (11,1%)	20 (10,2%)	0,7705
Alter in Jahren (mean ± SD)	71,93 ± 10,30	67,45 ± 12,16	0,0003
Mittl. Blutdruck in mmHg (mean ± SD)	97,54 ± 14,77	99,12 ± 13,83	0,1834
Body Mass Index (mean ± SD)	26,62 ± 4,55	27,31 ± 5,32	0,3481

Tab. 6.2: Substratifizierung nach Geschlecht: Einschluß aller weiblichen Teilnehmer mit Vorhofflimmern. Darstellung wesentlicher klinischer Basischarakteristika. Angegeben sind die absolute Anzahl der Personen in den Gruppen sowie der prozentuale Anteil. Stetige Daten sind dargestellt als Mittelwert (mean) ± Standardabweichung (SD).

6.6.1 Altersverteilung

In dieser Untergruppe fanden sich 200 Frauen mit und 199 ohne Vorhofflimmern. Auch innerhalb dieses Stratum unterschieden sich die Teilnehmerinnen signifikant hinsichtlich der Altersstruktur ($p=0,0003$). Während Frauen mit AF im Mittel $71,93 \pm 10,30$ Jahre alt waren, betrug das Durchschnittsalter der Kontrollen nur $67,45 \pm 12,16$ Jahre. Diese Verteilung ist in den Abbildungen 6.10 bzw. 6.11 graphisch dargestellt.

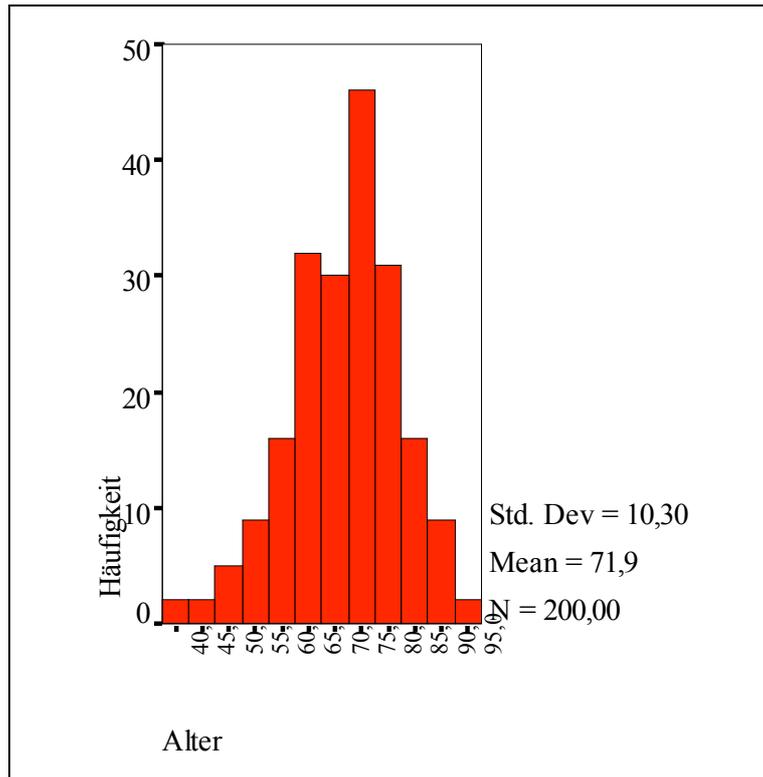


Abb. 6.10: Altersverteilung der Frauen in der AF-Gruppe nach Geschlechtsstratifizierung. Mean – Mittelwert; Std. Dev – Standardabweichung.

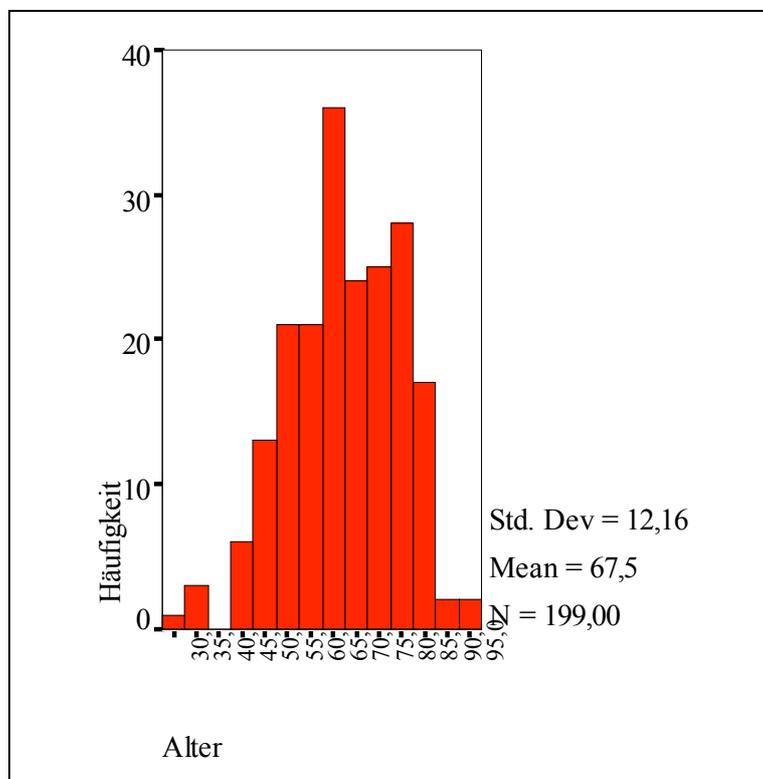


Abb. 6.11: Altersverteilung der Frauen in der Kontrollgruppe nach Geschlechtsstratifizierung. Mean – Mittelwert; Std. Dev – Standardabweichung.

6.6.2 Häufigkeit kardiovaskulärer Risikofaktoren

Männer sind, wie gezeigt, verstärkt durch kardiovaskuläre Risikofaktoren belastet. Jedoch waren auch in der hier betrachteten Subpopulation weiblicher Patienten diese Risikofaktoren in der Kontrollgruppe konsequent überrepräsentiert. Allerdings war über alle untersuchten Merkmale hinweg ein Trend feststellbar, gemäß dem Risikofaktoren in der Fall- und Kontrollgruppe ausgeglichener repräsentiert waren. Oft war dieser Trend aber nur ansatzweise zu erkennen. So lag eine KHK bei 84 (42,0%) Frauen mit AF vor, in der Kontrollgruppe waren es dagegen 120 (60,3%) Patientinnen. Dieser Unterschied war nach wie vor hochsignifikant ($p=0,0003$). Die Verteilung der koronaren Herzkrankheit sowie der kardiovaskulären Risikofaktoren ist in Abbildung 6.12 veranschaulicht.

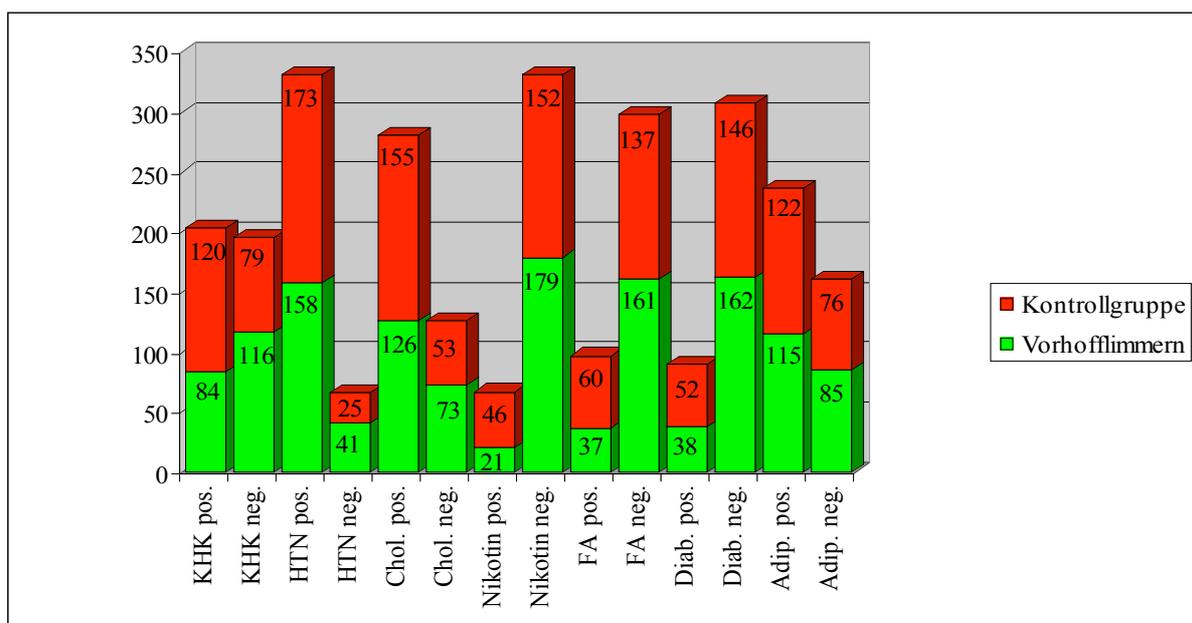


Abb. 6.12: Übersicht über die Verteilung der koronaren Herzkrankheit und wichtiger kardiovaskulärer Risikofaktoren in der nach weiblichem Geschlecht stratifizierten Population. KHK – koronare Herzkrankheit; HTN – Hypertonie; Chol. – Hypercholesterinämie; Nikotin – Nikotinabusus; FA – Familienanamnese; Diab. – Diabetes mellitus; Adip. – Adipositas. Zur Gesamtzahl der Studienteilnehmer unterschiedliche Fallzahlsummen sind auf fehlende Daten in der Erhebung zurückzuführen.

Die oben angesprochene Homogenisierung zwischen Fall- und Kontrollgruppe zeigte sich besonders deutlich am Beispiel der Hypertonie. Demnach litten 158 Frauen mit Vorhofflimmern an arteriellem Bluthochdruck, entsprechend 79,4% der Gruppe. In der Kontrollgruppe waren 173 (87,4%) Frauen betroffen. Damit lag ein Unterschied zwischen den

beiden Gruppen vor, der mit einem p-Wert von $p=0,0328$ schwach signifikant war. Dies ist eine deutliche Angleichung im Vergleich zur unstratifizierten Gesamtpopulation, wo dieser Wert mit $p=0,0029$ noch erheblich niedriger lag. Noch klarer wird dieser Umstand bei der Analyse des mittleren Blutdrucks. Dieser lag bei weiblichen AF-Patientinnen im Mittel bei $97,54 \pm 14,77$ mmHg, bei den entsprechenden Kontrollen schwankte er um einen Mittelwert von $99,12 \pm 13,83$ mmHg. Ein signifikanter Unterschied konnte mit $p=0,1834$ dabei nicht mehr festgestellt werden, während er in der Gesamtgruppe mit $p=0,0341$ noch vorhanden war. Die Darstellung des mittleren Blutdrucks erfolgt in den Abbildungen 6.13 und 6.14.

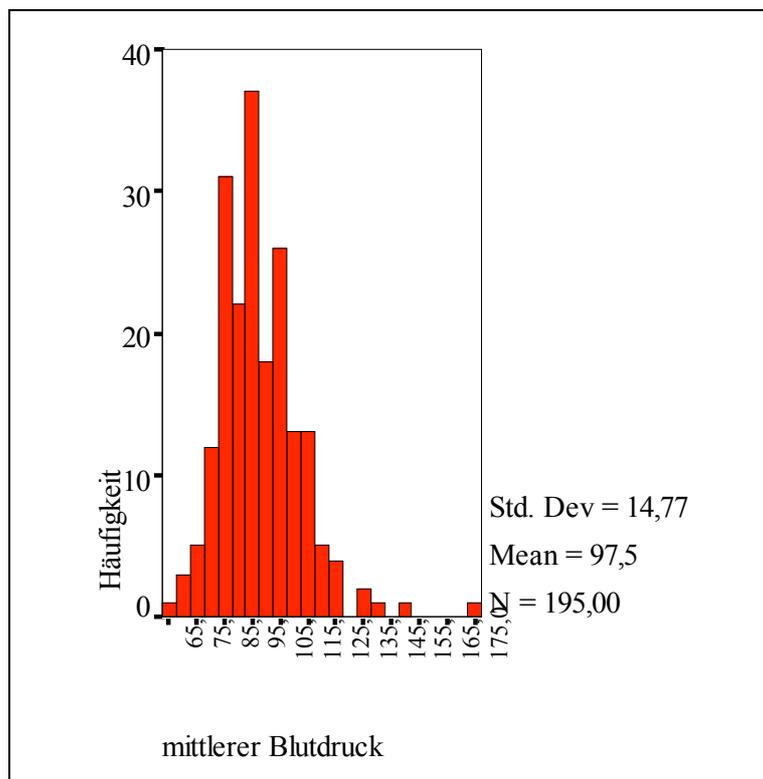


Abb. 6.13: Darstellung des mittleren Blutdrucks in der AF-Gruppe der nach weiblichem Geschlecht stratifizierten Subpopulation. Mean – Mittelwert; Std. Dev – Standardabweichung.

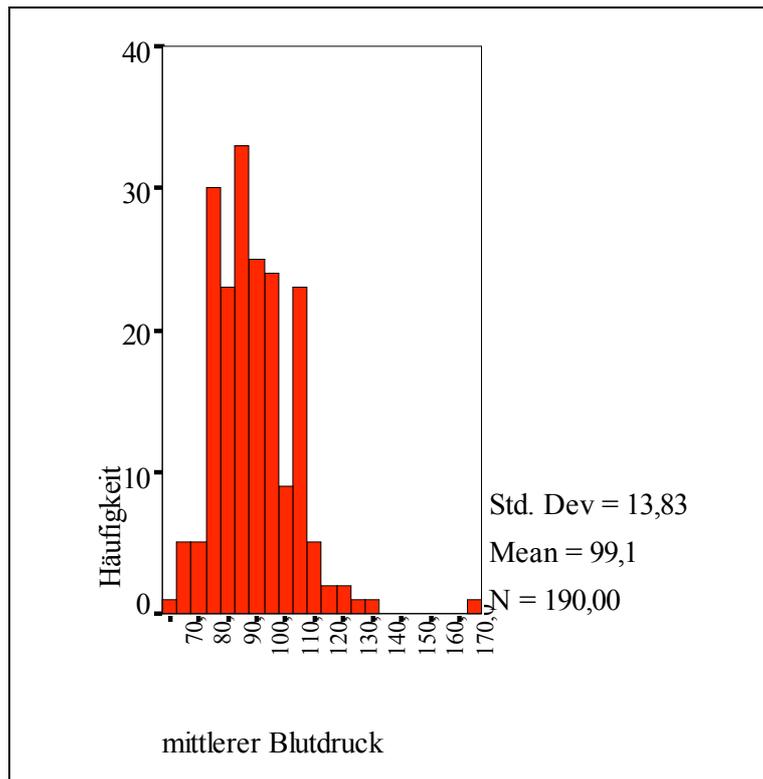


Abb. 6.14: Darstellung des mittleren Blutdrucks in der Kontrollgruppe der nach weiblichem Geschlecht stratifizierten Subpopulation. Mean – Mittelwert; Std. Dev – Standardabweichung.

In der nach weiblichem Geschlecht stratifizierten Subpopulation wiesen 126 (63,3%) Frauen mit AF und 155 (78,3%) ohne AF eine Hypercholesterinämie auf. Damit war der Unterschied zwischen Fällen und Kontrollen signifikant ($p=0,0010$).

Unter den Frauen mit AF fanden sich 21 (10,5%) Raucherinnen. In der Kontrollgruppe waren dies 46 (23,2%).

Eine positive Familienanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen wurde in der AF-Gruppe in 37 Fällen erhoben, entsprechend 18,7%. Dies traf für die Kontrollgruppe in 60 Fällen zu (30,6%). Auch hier lag ein signifikanter Unterschied vor ($p=0,0066$).

Wie in der unstratifizierten Population verteilte sich auch hier die Prävalenz des Diabetes mellitus statistisch gleich zwischen Patientinnen mit und ohne AF. Allerdings zeigte sich hier eine umgekehrte Entwicklung im Vergleich zu den anderen Risikofaktoren: Der p-Wert der statistischen Berechnungen wurde kleiner. So fanden sich in der AF-Gruppe 38 Diabetikerinnen (19,0%) und in der Kontrollgruppe 52 (26,3%). Der Unterschied zwischen beiden Gruppen vergrößerte sich damit von $p=0,2230$ in der Gesamtpopulation auf hier $p=0,0833$.

Hinsichtlich der Adipositas folgte die Verteilung wieder dem oben beschriebenen Trend. So fanden sich 115 (57,5%) übergewichtige Patientinnen mit Vorhofflimmern. In der Gruppe ohne Rhythmusstörung waren es 122 (61,6%). Die Verteilung war mit $p=0,4028$ statistisch gleich. Dies stimmte überein mit den Ergebnissen der BMI-Berechnung: Frauen mit AF wiesen einen Body Mass Index auf, der im Mittel bei $26,62 \pm 4,55$ lag. In der Kontrollgruppe betrug dieser Wert durchschnittlich $27,31 \pm 5,32$. Auch hier war die Verteilung mit $p=0,3481$ gleich. Dies ist graphisch in den Abbildungen 6.15 und 6.16 dargestellt.

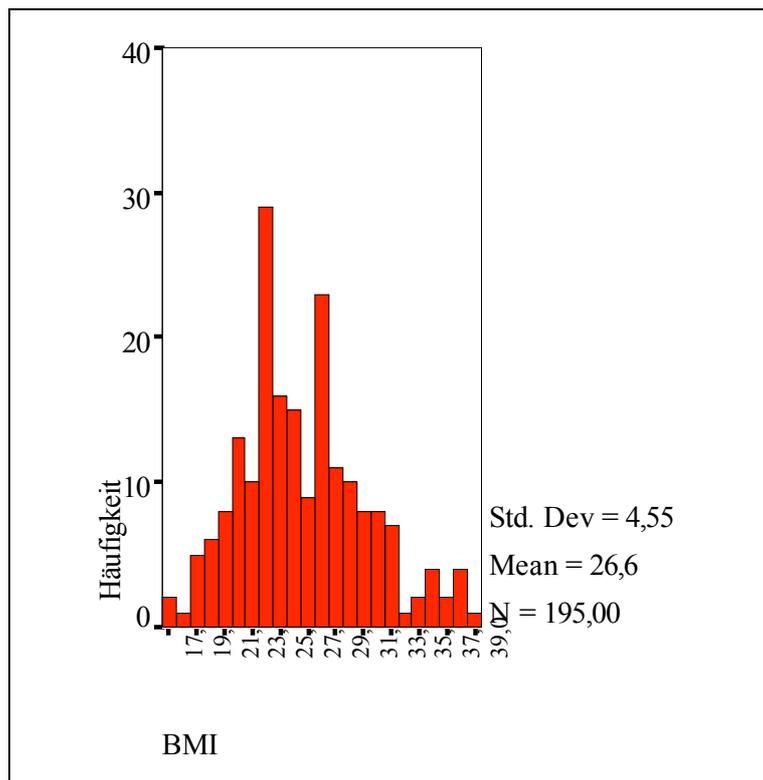


Abb. 6.15: Darstellung des BMI in der AF-Gruppe der nach weiblichem Geschlecht stratifizierten Population. Mean – Mittelwert; Std. Dev – Standardabweichung.

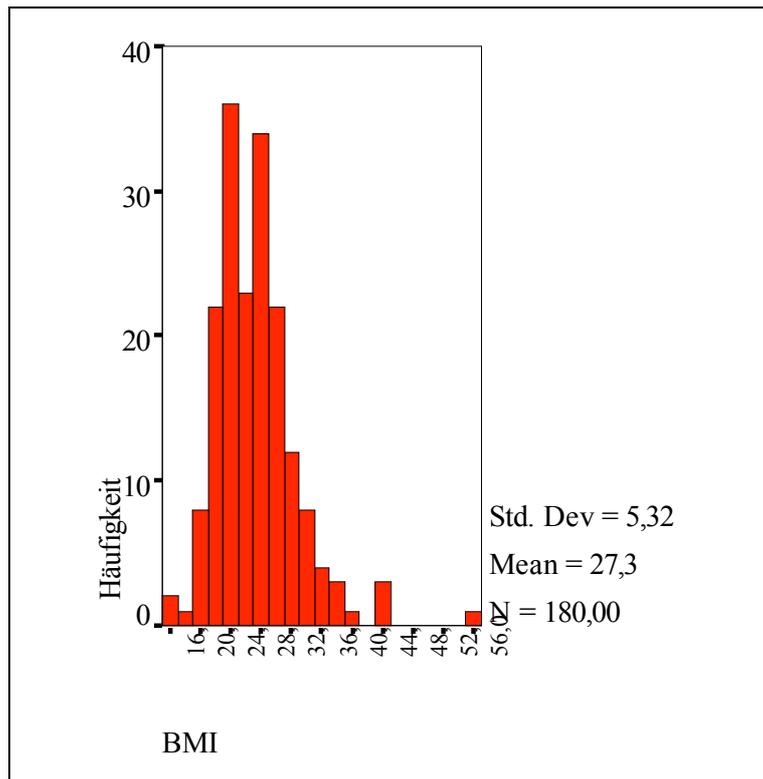


Abb. 6.16: Darstellung des BMI in der Kontrollgruppe der nach weiblichem Geschlecht stratifizierten Population. Mean – Mittelwert; Std. Dev – Standardabweichung.

Wie bereits in der Gesamtpopulation waren Patientinnen mit Zeichen der Herzinsuffizienz der klinischen Schweregrade NYHA I bis II mit $p=0,7705$ annähernd gleich verteilt. In der AF-Gruppe waren 22 (11,1%) betroffen, in der Vergleichsgruppe waren dies 20 (10,2%).

6.7 Substratifizierung nach Alter (Studienteilnehmer beides Geschlechts)

Die zweite Stratifizierung erfolgte nach dem Alter der Studienteilnehmer. Eingeschlossen wurden geschlechtsübergreifend alle Personen, die Vorhofflimmern bis einschließlich zu ihrem 60. Lebensjahr entwickelten. Entsprechende Kriterien wurden für die Kontrollen angewandt. Insgesamt fanden sich hier 138 Individuen mit AF und 220 mit Sinusrhythmus. Einen Überblick über die Verteilung der klinischen Basischarakteristika findet sich in Tabelle 6.3.

	Vorhofflimmern	Sinusrhythmus	p-Wert
Männeranteil	111 (80,4%)	163 (74,1%)	0,1680
Hypertonie	74 (53,6%)	157 (72,0%)	0,0004
KHK	29 (21,0%)	145 (65,9%)	<,0001
Diabetes	17 (12,3%)	30 (13,8%)	0,6832
Hypercholesterinämie	75 (54,3%)	177 (80,8%)	<,0001
Adipositas	92 (67,2%)	137 (62,8%)	0,4088
Familiäre Belastung	29 (21,6%)	85 (39,0%)	0,0007
Nikotinabusus	39 (29,1%)	108 (49,3%)	0,0002
Herzinsuffizienz	9 (6,5%)	24 (11,%)	0,1549
Alter in Jahren (mean ± SD)	53,70 ± 6,46	52,22 ± 7,56	0,0508
Mittl. Blutdruck in mmHg (mean ± SD)	92,42 ± 14,28	96,53 ± 13,46	0,0019
Body Mass Index (mean ± SD)	27,86 ± 4,06	28,07 ± 4,79	0,9850

Tab. 6.3: Substratifizierung nach Alter: Einschluß der Teilnehmer, die Vorhofflimmern bis zum 60.

Lebensjahr entwickelten. Darstellung wesentlicher klinischer Basischarakteristika. Angegeben sind die absolute Anzahl der Personen in den Gruppen sowie der prozentuale Anteil. Stetige Daten sind dargestellt als Mittelwert (mean) ± Standardabweichung (SD).

Der Vergleich der Teilnehmer bis 60 Jahre mit denen der unstratifizierten Gesamtpopulation zeigte, dass sich die Verteilung der erhobenen klinischen Parameter nicht wesentlich voneinander unterschied. V.a. bei den kardiovaskulären Risikofaktoren war ein Trend zu einer homogeneren Verteilung zwischen Patienten mit und ohne Vorhofflimmern zu erkennen. Jedoch blieb der Unterschied in den meisten Fällen signifikant. Aufgrund der im Vergleich zur Gesamtgruppe ähnlichen Verteilung soll hier auf eine zu detaillierte Darstellung aller Einzelergebnisse verzichtet werden. Einzelne wichtige Daten werden im Folgenden beschrieben.

Auffallend war die Tatsache, dass der Männeranteil bei jüngeren Patienten mit Vorhofflimmern prozentual höher lag, als in der Gesamtpopulation. In der stratifizierten Gruppe fanden sich 111 Männer mit AF, entsprechend 80,4% und 163 Männer mit Sinusrhythmus, entsprechend 74,1%. Damit unterschieden sich die Gruppen nicht signifikant ($p=0,1680$). Im Vergleich zur Gesamtgruppe stieg damit der Männeranteil um 10,8% bei Vorliegen von AF und um 3,7% bei Vorliegen von Sinusrhythmus. Die Verteilung ist in der folgenden Abbildung 6.17 dargestellt.

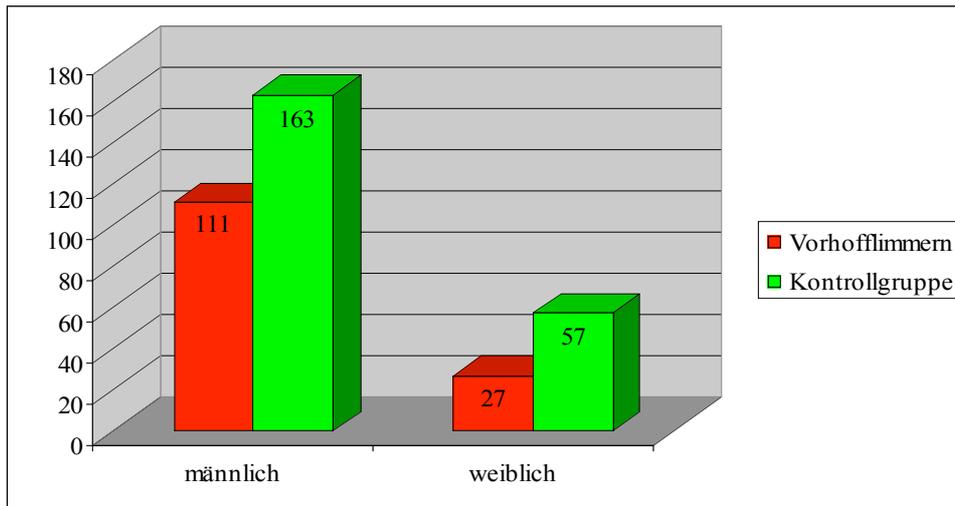


Abb. 6.17: Geschlechterverteilung in der AF- und Kontrollgruppe der nach Alter ≤ 60 stratifizierten Population.

Der Altersunterschied zwischen Patienten mit und ohne AF in der unstratifizierten Population war hochsignifikant ($p < 0,0001$) (s.o. Abschnitt 6.4.1). In der Gruppe junger Patienten lag dagegen mit $p = 0,0508$ ein statistisch nicht mehr signifikanter Unterschied vor. Allerdings wurde das Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ nur knapp verpasst. Bei den jüngeren Teilnehmern mit Vorhofflimmern lag das mittlere Alter bei $53,70 \pm 6,46$ Jahren. Jene ohne AF waren im Mittel $52,22 \pm 7,56$ Jahre alt. Die Altersverteilung für die beiden Gruppen ist aus den Abbildungen 6.18 und 6.19 ersichtlich.

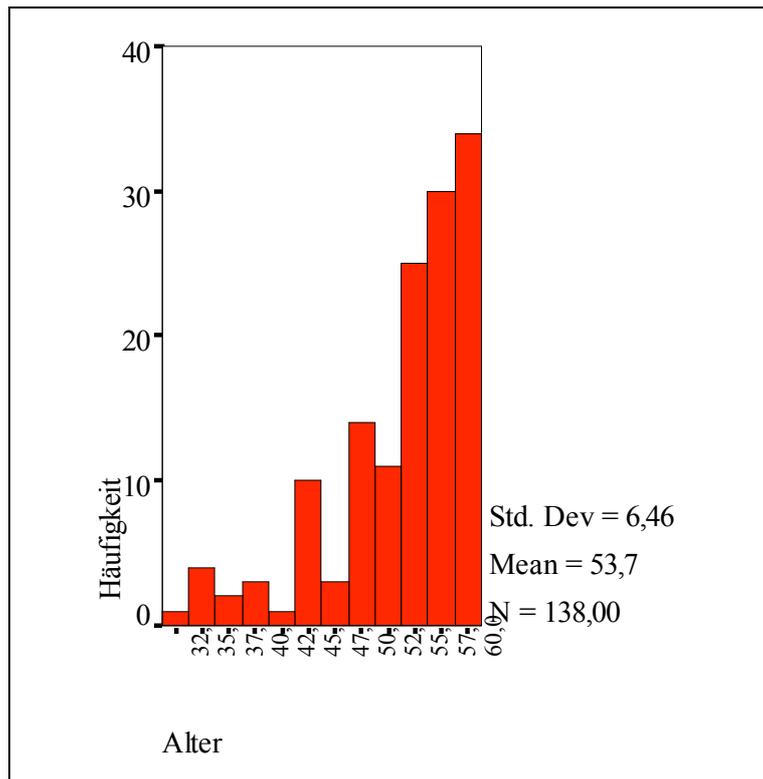


Abb. 6.18: Altersverteilung in der AF-Gruppe der nach Alter ≤ 60 stratifizierten Subpopulation. Mean – Mittelwert; Std. Dev - Standardabweichung

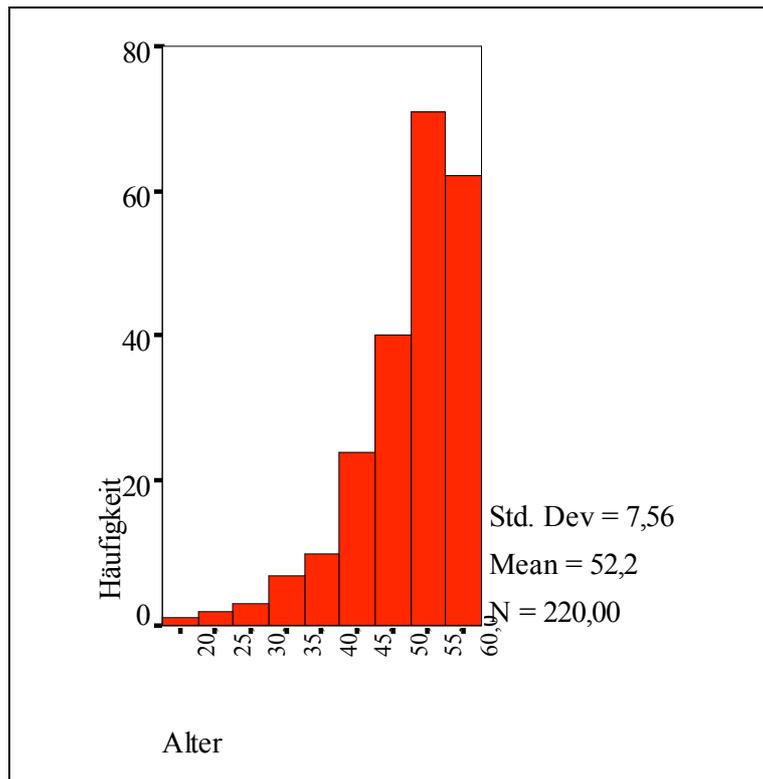


Abb. 6.19: Altersverteilung in der Kontrollgruppe der nach Alter ≤ 60 stratifizierten Subpopulation. Mean – Mittelwert; Std. Dev - Standardabweichung

Exemplarisch für die Angleichung der Verteilung der kardiovaskulären Risikofaktoren zwischen den Gruppen bietet sich das Merkmal Adipositas an. Auch in der Gesamtpopulation war mit $p=0,2665$ kein statistisch signifikanter Unterschied festzustellen. In der nach Alter ≤ 60 stratifizierten Subpopulation trat die Adipositas dagegen mit $p=0,4088$ deutlich homogener verteilt bei Patienten mit und ohne AF auf. 92 (67,2%) Personen mit Vorhofflimmern litten im Stratum Alter ≤ 60 an Adipositas; bei Individuen ohne AF waren es 137 (62,8%). Abbildung 6.20 veranschaulicht die Verteilung.

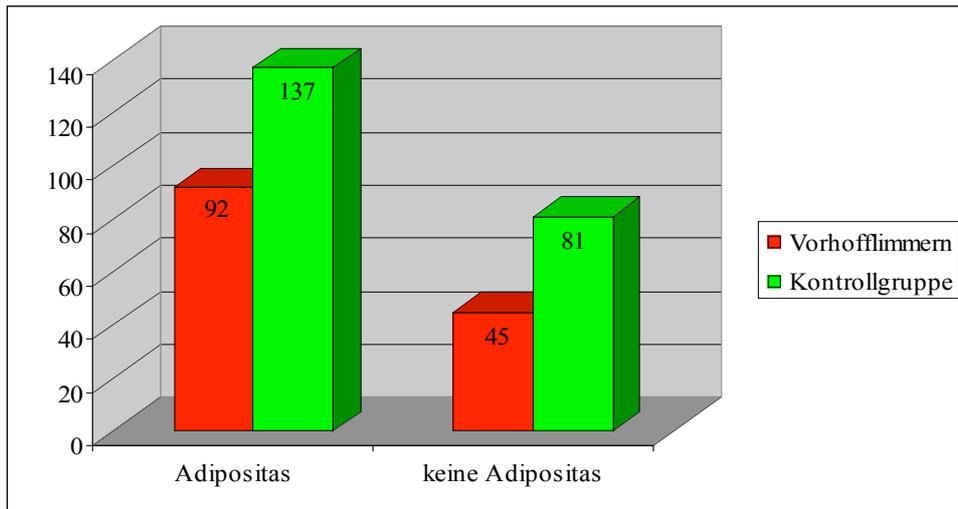


Abb 6.20: Verteilung der Adipositas in der AF- und Kontrollgruppe einer nach Alter ≤ 60 stratifizierten Subpopulation.

7. Methoden

7.1 Gewinnung des Untersuchungsmaterials

Das benötigte Vollblut wird bei den Patienten mittels peripher-venöser Blutabnahme gewonnen. Verwendet wurde ausschließlich die S-Monovette® EDTA K₂ Gel 2,7 ml (Firma Sarstedt AG & Co, Nürnberg, Deutschland), wobei das Blut durch das im Röhrchen vorhandene Kalium-Ethylendiamintetraacetat ungerinnbar gemacht wird. Anschließend werden die Proben bei -20°C eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

7.2 Extraktion der DNA

7.2.1 Beschreibung des Verfahrens

Aus dem wieder aufgetauten Vollblut wird mittels des kommerziell verfügbaren QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Firma Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) die für die Genotypisierung benötigte DNA extrahiert. Zur Anwendung kam dabei das Spin-Protokoll für Vollblut und Körperflüssigkeiten gemäß dem Handbuch der Firma Qiagen GmbH [126; 142], das weiter unten beschrieben wird.

Der Vorgang der Extraktion gliedert sich im Wesentlichen in die drei Schritte der Lyse, Waschung und Elution:

- Lyse: Durch das Einfrieren der Proben auf -20°C wird bereits eine Teillyse der Blutzellen erzielt. Die vollständige Lyse wird durch die Zugabe des speziellen QIAGEN® Buffer AL erreicht, der auf der Basis von Guanidinhydrochlorid Membranen zuverlässig auflöst. Die Freisetzung der DNA erfolgt durch die Verdauung mit der QIAGEN® Protease, einer vollständig DNase- und RNase-freien Serin-Protease einer rekombinanten Bacillus-Art.
- Waschung: Um die freigesetzte DNA vom Rest der Suspension abzutrennen, muss die DNA zunächst durch Zentrifugation an die Silicagel-Membran der mitgelieferten Spin-Säulen adsorbiert werden. Die Salz- und pH-Bedingungen der Suspension verhindern dabei größtenteils ein gleichzeitiges Anhaften von Proteinen oder anderen Kontaminationen an die Membran. Die vollständige Trennung von DNA und Kontaminationen erfolgt durch mehrmalige Waschung mit verschiedenen

Pufferlösungen: Zunächst durch QIAGEN® Buffer AW1, ähnlich wie der Lysepuffer auf Guanidinhydrochloridbasis, danach durch QIAGEN® Buffer AW2 auf Ethanolbasis.

- Elution: Die Elution der DNA von den Säulen in die Auffanggefäße geschieht durch Zentrifugieren mit QIAGEN® Buffer AE, einer basischen Pufferlösung, die sich auch für eine längerfristige Lagerung bei -20°C eignet. Laut Herstellerangaben setzt sich diese Lösung wie folgt zusammen: 10mM Tris-Cl, 0,5 mM EDTA, pH 9,0.

Die nachfolgende Abbildung 7.1 faßt die Abläufe noch einmal graphisch zusammen:

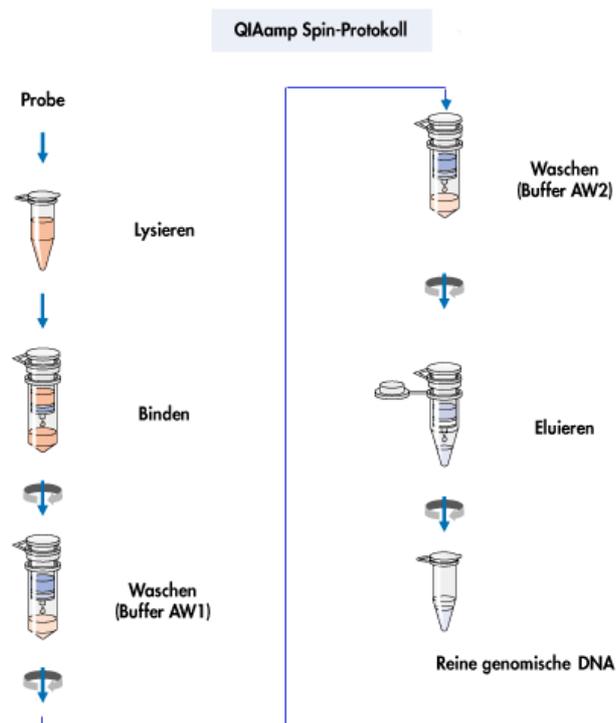


Abb. 7.1: Übersicht über die Abläufe der DNA-Extraktion mit Hilfe des QIAamp® DNA Blood Mini Kit. Die einzelnen Schritte sind im Text erläutert. (Abb. verändert nach [142]).

7.2.2 Protokoll der DNA-Extraktion

1. Äquilibrieren der Proben auf Raumtemperatur.
2. In bereitgestellte 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße werden je Probe die folgenden Reagenzien pipettiert:
 - 20 µl QIAGEN® Protease
 - 200 µl Vollblut (vorher gut durchschütteln)
 - 200 µl QIAGEN® Buffer AL.
3. Durchmischen des Ansatzes mittels Vortex für ca. 15 sek.
4. Inkubieren des Ansatzes in einem auf 56°C vorgeheizten Wärmeblock für 10 bis 15 min.
5. Zugabe von 200 µl Ethanol (96-100%) zu jeder Probe, anschließend erneut auf dem Vortex ca. 15 sek. mischen.
6. Transfer des Ansatzes auf die bereitgestellten QIAamp® Spinsäulen (in einem 2,0 ml Collection Tube).
7. Zentrifugieren der Spinsäulen für 1 Minute bei 8000 rpm (ca. 6000g) und 20°C, anschließend Umsetzen der Säulen in neue Collection Tubes und Verwerfen des Zentrifugats.
8. Zugabe von 500µl QIAGEN® Buffer AW1 je Probe, danach erneut Zentrifugieren für 1 Minute bei 8000 rpm (ca. 6000g) und 20°C, Umsetzen der Säulen in saubere Collection Tubes und Verwerfen des Zentrifugats.
9. Zugabe von 500 µl QIAGEN® Buffer AW2 je Probe, dann Zentrifugieren für 3 min bei 13000 rpm (ca. 19000g) und 20°C, Umsetzen der Spinsäulen in bereitgestellte 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße und Verwerfen des Zentrifugats.
10. Zugabe von 200 µl QIAGEN® Buffer AE je Probe.
11. Inkubieren des Ansatzes bei Raumtemperatur für 1 Minute, danach Zentrifugieren für 1 Minute bei 8000 rpm (ca. 6000g) und 20°C.
12. Im 1,5 ml Eppendorfgefäß liegt jetzt die extrahierte DNA vor. Sie kann entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert werden. Die benutzen Spinsäulen werden abschließend verworfen.

7.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

7.3.1 Allgemeine Bemerkungen zur PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zählt heute zu den essentiellen Methoden der molekularbiologischen und medizinischen Forschung im weitesten Sinne, ohne die eine Arbeit im Labor nicht mehr möglich ist. Mit ihr lassen sich kleinste Mengen DNA oder RNA, im Extremfall ausgehend von nur einer einzigen Kopie, nahezu beliebig vermehren. Seit der ersten Anwendung der Methode durch Saiki et al. [147] und der darauf folgenden Beschreibung durch Mullis et al. [129; 130] wurde sie laufend verändert und verbessert. Dadurch und durch Kombination mit anderen Methoden wurde sie zur universellen Anwendung im Labor. Die Grundprinzipien blieben jedoch bis heute unverändert [128]:

- Benötigt werden lediglich die sog. Template-DNA, die vermehrt werden soll, zwei dazu komplementäre Oligonukleotidprimer, freie Nukleotide (Desoxyribonukleotidtriphosphate, also dATP, dTTP, dGTP, dCTP), eine DNA-Polymerase, die heute meist aus thermophilen Bakterien wie z.B. *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) stammt [78], und eine Pufferlösung für den Ansatz.
- Die zu vermehrende DNA wird zunächst in einem Denaturierungsschritt denaturiert, d.h. die beiden komplementären Stränge der DNA werden voneinander getrennt. Dazu wird der Ansatz 30 sek. auf ca. 94°C erhitzt.
- Im folgenden Annealingschritt wird der Ansatz 30 sek. auf ca. 55°C abgekühlt. Dadurch kann sich die DNA rehybridisieren. Da die Primer dem Ansatz im Überschuss zugegeben werden, verbinden sich die DNA-Stränge vorwiegend mit diesen.
- Um das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase einzustellen, erhöht man die Temperatur 90 sek. auf ca. 72°C. Diese verlängert die DNA-gebundenen Primer im sog. Elongationsschritt.
- Diese drei Vorgänge werden je nach Protokoll in Form von ca. 30 Zyklen wiederholt. Unter idealen Bedingungen wird dabei in jedem Zyklus die vorhandene DNA verdoppelt, so dass zunächst die doppelte, dann die vierfache, achtfache usw. Menge der Template-DNA vorliegt.

- Diese drei beschriebenen Schritte werden häufig von einer länger dauernden Denaturierung zu Beginn und einer mehrminütigen Elongation nach dem letzten Zyklus eingerahmt.

Die folgende Abbildung 7.2 soll die beschriebenen Abläufe noch einmal verdeutlichen:

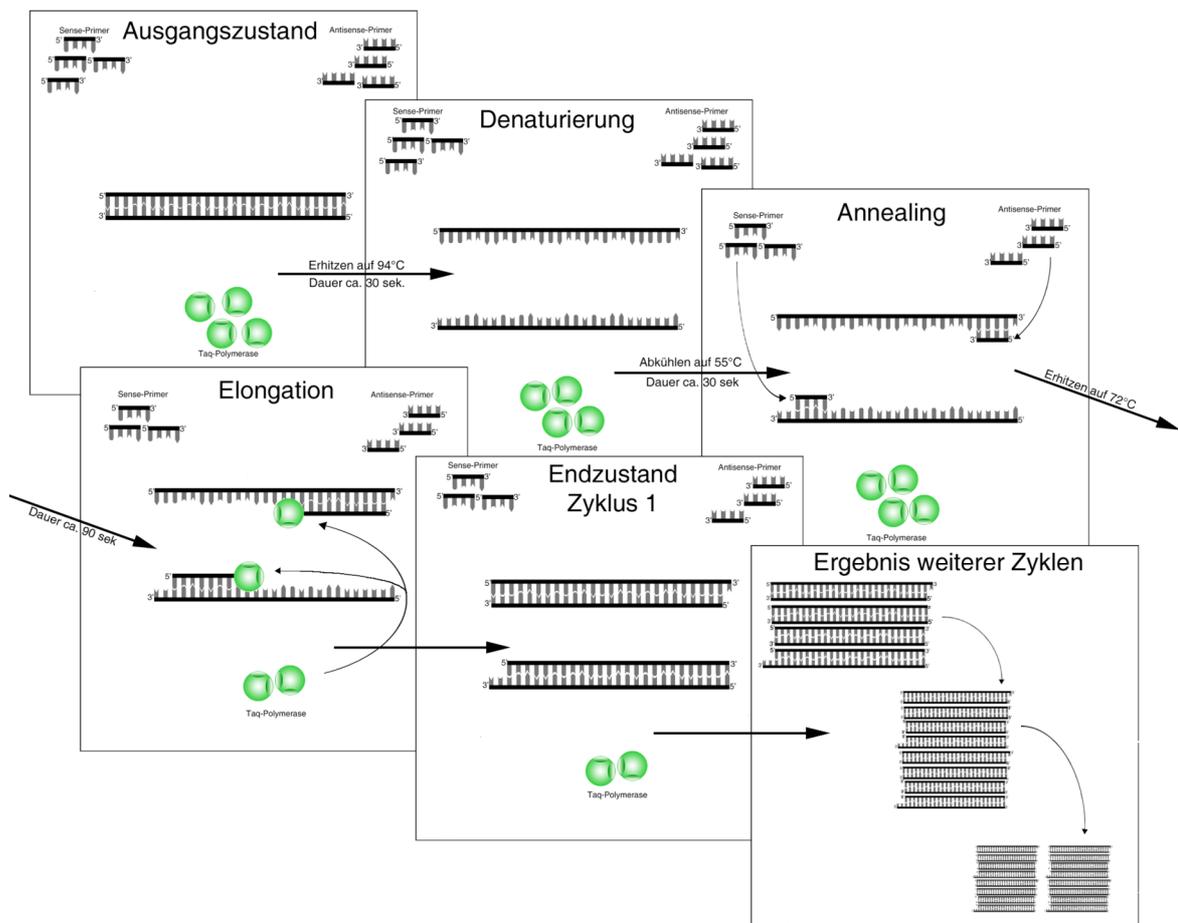


Abb. 7.2: Darstellung einer üblichen PCR ausgehend von einem doppelsträngigen DNA-Template: Durch einen Denaturierungsschritt werden die beiden DNA-Stränge voneinander getrennt. Durch Abkühlen auf die Annealingtemperatur können die Primer binden; an diese lagert sich die im Reaktionsmix vorhandene Polymerase an, die während des Elongationsschrittes Nucleotide anbaut. Ergebnis ist die Verdopplung der Ausgangsstranges. Weitere Zyklen nach demselben Muster vervielfachen das PCR-Produkt idealerweise exponentiell. (nach Mülhardt, C. [128]).

7.3.2 TaqMan®-PCR mit allel-spezifischen Fluoreszenz-Oligonukleotid-Sonden und 5' nuclease assay

Für die Genotypisierung von single nucleotide polymorphisms (SNPs) existiert heute eine Vielzahl unterschiedlicher Methoden [167]. Besonders für die Genotypisierung weniger SNPs bei einer hohen Fallzahl etablierten sich in letzter Zeit drei Methoden, die vergleichbare Ergebnisse liefern: hybridisation probes, molecular beacons und TaqMan®. Bei der Entscheidung für die Verwendung von TaqMan® gab letztlich die längere Erfahrung mit dieser Methode und die entsprechende Ausstattung im Labor den Ausschlag.

Das Grundprinzip der Methode besteht im Nachweis der Hybridisierung von Nukleinsäuren mittels des fluorescence resonance energy transfer (FRET), das erstmals von Cardullo et al. [21; 22] beschrieben wurde. Dabei macht man sich zunutze, dass Fluoreszenzfarbstoffe, auch Fluorochrome genannt, die mit Licht einer für sie spezifischen Wellenlänge angeregt werden, die aufgenommene Energie in Form von Licht anderer Wellenlänge wieder abgeben. Diese Lichtemission ist messbar und für jeden Farbstoff charakteristisch. Das Licht wird aber nicht messbar abgestrahlt, wenn sich in unmittelbarer Umgebung des ersten Fluorochroms ein zweites befindet, dessen Anregungsspektrum dem Emissionsspektrum des ersten entspricht. Dann wird die Lichtenergie direkt verwendet, um den zweiten Farbstoff anzuregen, der nun seinerseits ein für ihn charakteristisches Licht abgibt. In diesem Fall spricht man bei Farbstoff eins vom reporter (engl. to report = berichten), bei Nummer zwei vom quencher (engl. to quench = löschen) (s. Abb. 7.3).

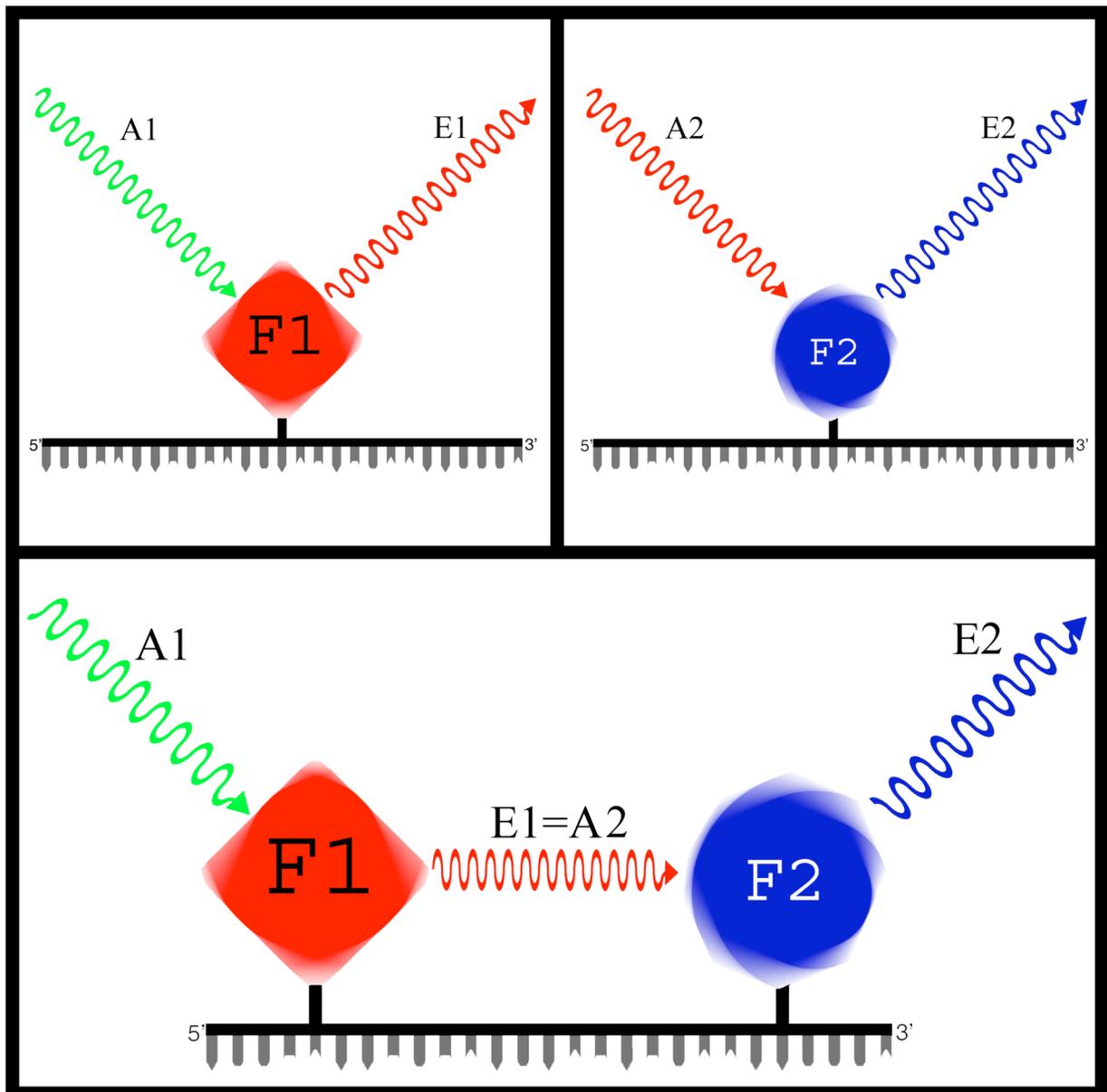


Abb. 7.3: Darstellung der Grundprinzipien des FRET (detaillierte Beschreibung im Text): Anregungsspektrum A1 regt das Fluorochrom F1 an, welches Licht der spezifischen Frequenz E1 emittiert. Äquivalent für F2. Liegen die Fluorochrome F1 und F2 in ausreichender Nähe, und ist $E1=A2$, so fungiert F2 als quencher. Emittiert wird stattdessen E2. (nach Livak, K.J. [109]).

Entscheidender Schritt auf dem Weg zur heutigen Methode war die Nutzbarmachung der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase [74]. Ihre herkömmliche Funktion besteht, von einem gebundenen Primer ausgehend, in der Verlängerung eines zum Template komplementären DNA-Stranges in 5'-3'-Richtung (Polymerase-Funktion). Trifft sie dabei auf ein Hindernis in Form einer bereits mit dem Template hybridisierten DNA, so spaltet sie diese mittels ihrer 5'-3'-Exonuklease-Funktion ab und setzt anschließend ihre Strangsynthese fort (s. Abb.7.4).

zueinander passen. Wenn sich fälschlicherweise eine Sonde des nicht exakt passenden Allels mit dem Template verbunden hat, kommt es nicht zur Spaltung, sondern zur Abtrennung im Ganzen. Ergo kommt es nicht zur räumlichen Trennung der beiden Fluorophore. Dieser Vorgang wiederholt sich idealerweise bei jedem PCR-Zyklus, so dass sich im Laufe der Zeit die abgetrennten Fluoreszenzfarbstoffe anhäufen und ein entsprechend starkes Lichtsignal emittieren. Das Prinzip dieses Ansatzes wurde mit der Zeit weiterentwickelt und verfeinert und ist heute allgemein unter dem Namen 5' nuclease assay bekannt. Entsprechend den dort beschriebenen Regeln wurden die Genotypisierungen dieser Studie durchgeführt [102; 109; 110; 111; 127] (s.Abb. 7.5). Je nachdem in der Probe vorliegenden Genotyp wird bei Homozygotie für Allel eins die Emissionsstärke von reporter eins stark ansteigen; entsprechend die von reporter zwei bei Homozygotie für Allel zwei. Bei Heterozygoten kommt es zur Zunahme beider Farbsignale. Hierauf wird weiter unten näher eingegangen (siehe Abschnitt 7.4).

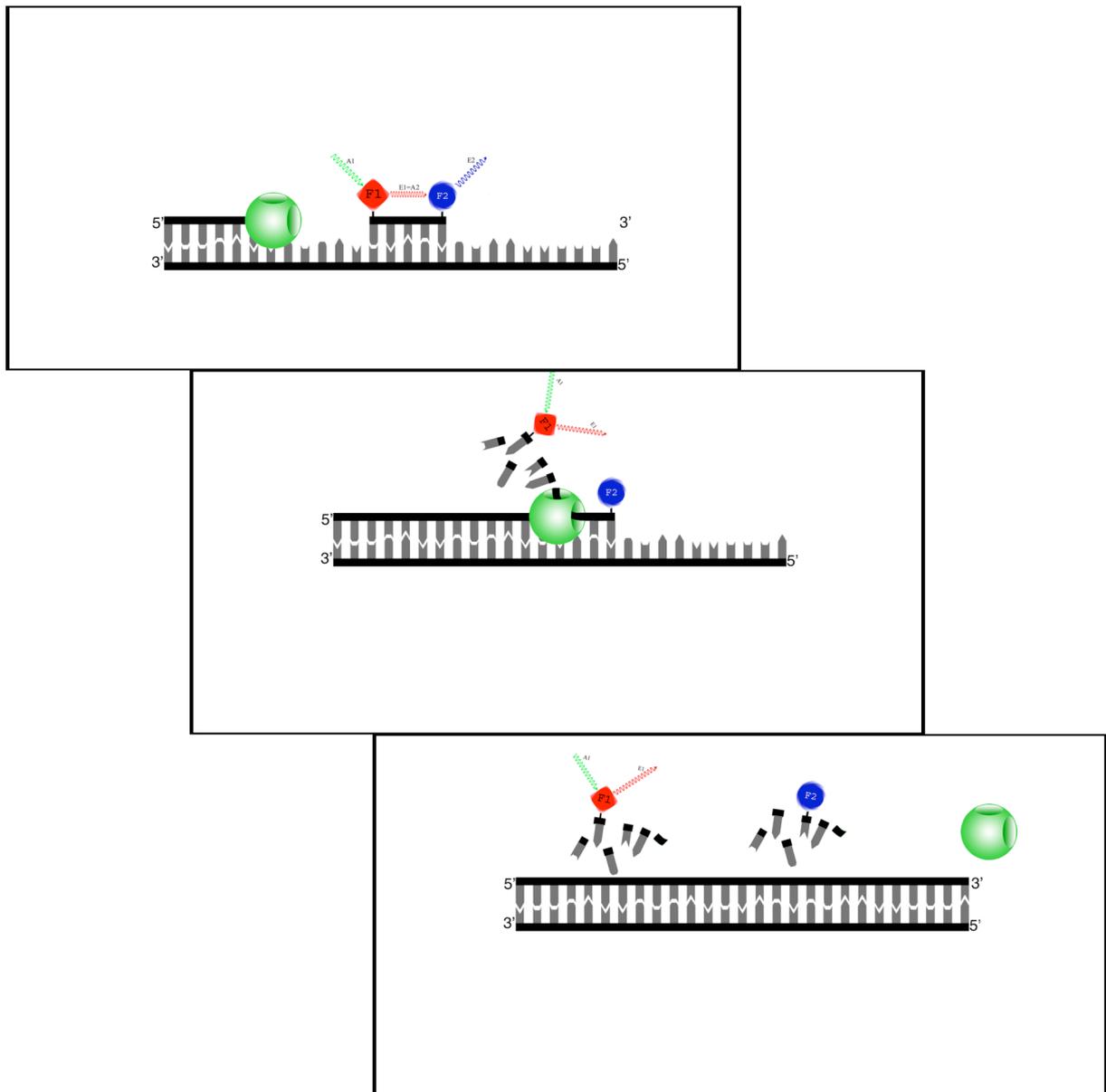


Abb. 7.5: Darstellung des gesamten Abspaltungsvorganges auf dessen Grundlage die Genotypisierung stattfindet: Ein ASO mit reporter und quencher ist an einem DNA-Strang gebunden. Der reporter wird mit seinem Anregungsspektrum angeregt, das emittierte Licht jedoch durch den quencher eingefangen. Die vorrückende Polymerase spaltet mittels ihrer 5'-3'-Exonuklease-Aktivität das ASO und trennt so reporter und quencher. Dadurch wird das emittierte Licht des reporters messbar und im Sinne der Genotypisierung nutzbar (nach Livak, K.J. [109]).

7.3.3 PCR-Ansatz

Um bei der Genotypisierung der einzelnen SNPs ein optimales Ergebnis zu erzielen, ist es nötig, den PCR-Ansatz für jeden Polymorphismus individuell anzupassen. Für die drei untersuchten Gene geschah dies in enger Kooperation mit Herrn Dieter Saur aus der II. Medizinischen Klinik am Klinikum rechts der Isar, München.

Als Thermal Cycler für die Automatisierung der PCR-Zyklen kamen die Geräte GeneAmp® PCR System 9600 und das Nachfolgeprodukt GeneAmp® PCR System 9700 in der 96-well Version zum Einsatz (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Beide Versionen erlauben durch Reaktionsplatten, die in die Geräte eingesetzt werden, eine gleichzeitige Bearbeitung von 96 Proben, womit, abzüglich der mitgeführten Positiv- und Negativkontrollen, die DNA von 72 Patienten untersucht werden kann. Als Platten wurden hierfür die ABI PRISM™ Optical 96-well Reaction Plates (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) verwendet. Je acht wells werden mit Wasser statt Template beschickt und als Negativkontrolle benutzt. Die Positivkontrollen bilden 16 wells, in die verschiedene Standards pipettiert werden, von denen bekannt ist, ob sie die zu untersuchenden Allele 1 oder 2 tragen.

Um mögliche Pipettierfehler zu minimieren, werden, mit Ausnahme der Template-DNA, der Vergleichsstandards und des Wassers für die Negativkontrollen, alle Reagenzien für die Beschickung einer 96-well-Platte als Master Mix angesetzt, gemischt und dann als fertige Mischung auf alle wells verteilt. Die drei erwähnten Ausnahmen werden entsprechend dem weiter unten beschriebenen Schema auf die Platten verteilt (s. Abschnitt 7.3.4).

In den folgenden Abschnitten werden die für die Ansätze verwendeten Materialien und Reagenzien näher beschrieben.

7.3.3.1 Template-DNA

Als Template-DNA wird die DNA aus Patientenvollblut verwendet, die zuvor gemäß dem unter Punkt 6.2 beschriebenen Protokoll extrahiert wurde. Pro Patient werden 5 µl Template zugefügt, was laut Qiagen einer DNA-Menge von ca. 0,15 µg bzw. einer Konzentration von ca. 30 ng / µl entspricht [142].

7.3.3.2 Primer

Alle verwendeten Primer wurden eigens für den zu überprüfenden SNP entworfen und durch die Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Beim Primer-Design wurde darauf geachtet, dass sich keine Primer-internen Sekundärstrukturen wie z.B. „hairpins“ bilden konnten und dass die jeweiligen sense- und antisense-Primer möglichst wenig zueinander komplementär waren, um Primerdimere zu vermeiden. Die Länge der Primer betrug zwischen 16 bp und 21 bp; der GC-Anteil lag zwischen 55% und 75%. Entsprechend schwankte die Schmelztemperatur T_m zwischen 56,0 °C und 63,7 °C. Jeder Primer wurde dem jeweiligen Mastermix in einer Konzentration von 10 μ M zugefügt; die Konzentration im Reaktionsmix lag dann bei 500 nM.

7.3.3.3 MGB-Sonden

Entsprechend den Anweisungen der Software Primer Express® Oligo Design in der Version 1.5 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) [7] wurden die Sequenzen der ASO entworfen und über dieselbe Firma bezogen.

Für den eNOS- und den nNOS 3391-Polymorphismus konnten MGB-Sonden eingesetzt werden [2; 98]. Dabei handelt es sich um eine Modifikation am 3'-Ende der Sonde, wo ein sog. Minor Groove Binder (MGB) eingebaut wird. Das Tripeptid 1,2-dihydro-(3H)-pyrrolo[3,2-e]indol-7-carboxylat (CDPI₃) bindet mit hoher Affinität an die Minor Groove der DNA und erhöht so die Bindungsstärke zwischen dem Template und der hybridisierten Sonde. Auf diese Weise wird die Schmelztemperatur T_m der Sonde erhöht. Dadurch kann die Annealing- / Elongationsphase der PCR bei höherer Temperatur ablaufen und so die Wahrscheinlichkeit für fehlerhafte Bindungen zwischen den beiden Strängen gesenkt werden. Auch gestattet die höhere Bindungsstärke den Einsatz kürzerer Sonden, was zu einer höheren Effizienz des FRET führt. Beide Effekte verbessern also die Genauigkeit der Diskrimination zwischen den Allelen.

Um die während der PCR ablaufende Amplifikation der jeweils im Template vorhandenen Allele mittels FRET sichtbar zu machen, werden die beiden ASO eines SNP mit zwei verschiedenen fluoreszierenden reportern markiert. Diese werden jeweils an das 5'-Ende der Sonde gehängt. Bei beiden Polymorphismen wurde für das Allel 1 der Farbstoff 6-FAM™ (6-carboxyfluorescein), für das Allel 2 der Farbstoff VIC® (Applied Biosystems,

patentgeschützt) verwendet. Als quencher wurde ein nicht fluoreszierender Stoff am 3'-Ende fixiert. Dadurch wird bei intaktem Zustand der ASO kein Farbsignal abgestrahlt; erst nach der räumlichen Trennung von reporter und quencher kommt es zur Lichtemission. Auf diese Weise müssen bei der Sequence Detection nur zwei, nicht vier verschiedene Spektren diskriminiert werden, was die Unterscheidungsgenauigkeit verbessert.

Die Sondenlänge lag zwischen 15 bp und 19 bp, bei einer T_m zwischen 44,4 °C und 50,8 °C. Die ASO wurden in einer Konzentration von 5 µmol/l dem Master Mix zugefügt.

7.3.3.4 TAMRA™-Sonden

Im Gegensatz zu den vorbeschriebenen MGB-Sonden wurden für den Polymorphismus nNOS c.-84G>A sog. TAMRA™-Sonden eingesetzt. Diese kommen ohne Minor Groove Binder aus und verwenden einen fluoreszierenden quencher. Als Folge muss die Länge der ASO erhöht werden, wodurch T_m steigt und die FRET-Effizienz sinkt. Auch muss das Gerät zur Sequence Detection insgesamt vier Signale differenzieren.

Die Oligonukleotidsequenz wurde auch hier mit der erwähnten Software entworfen und über Applied Biosystems bezogen [7]. An den 5'-Enden wurde 6-FAM™ für Allel 1 angehängt, VIC® für Allel 2. Als fluoreszierender quencher wurde das Rhodaminderivat TAMRA™ (carboxytetramethylrhodamin) mit dem 3'-Ende verknüpft.

Die Sonden waren 19 bp bzw. 20 bp lang, wiesen eine T_m von 59,5 °C bzw 59,8 °C auf und wurde in einer Konzentration von 5 µmol/l verwendet.

7.3.3.5 TaqMan® Universal PCR Master Mix

Beim TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) handelt es sich um eine kommerziell verfügbare Mischung verschiedener Reagenzien, die speziell auf die Bedingungen des 5'-nuclease-assays abgestimmt ist [8]. Im Einzelnen sind dies:

- AmpliTaq® Gold DNA Polymerase
- AmpErase® uracil-N-glycosylase
- dATP, dCTP, dGTP, dUTP
- Puffer auf Tris-Basis
- Glycerin.

AmpliTaq® Gold DNA Polymerase ist eine gentechnisch hergestellte Form der thermostabilen *Thermus Aquaticus* Polymerase. Sie besitzt die übliche 5'-3'-Polymerase- und Exonukleaseaktivität, jedoch keine 3'-5'-Exonukleasefunktion. Sie bietet die Möglichkeit eines sog. Hot Start. Dabei liegt die Polymerase zunächst in inaktiver Form vor und kann so mit allen übrigen Reagenzien des Assays zusammengegeben werden, ohne dass es zur Elongation von im Mix befindlicher DNA kommt. Erst durch Erhitzen des Ansatzes über die Aktivierungstemperatur von 95 °C für zehn Minuten wird das Enzym freigesetzt und nimmt seine Arbeit auf. Dadurch wird verhindert, dass es in unteren, nicht optimierten Temperaturbereichen bereits zur Amplifikation kommt und fehlerhafte oder unspezifische Produkte entstehen.

Ein Problem beim Typisieren größerer Zahlen von Proben besteht darin, dass es durch vorangegangene PCRs zu Verunreinigungen, sog. carry-over Kontaminationen, kommt, die das Ergebnis des aktuellen Laufs verfälschen können. Um dies zu vermeiden, lässt sich, neben sorgfältigem Arbeiten, durch die von Longo et al [8; 112] beschriebene Technik des Einsatzes einer Uracil-DNA-Glycosylase und dUTP anstelle von dTTP als Nukleotide die carry-over Kontamination wirkungsvoll verhindern. Im verwendeten Universal Master Mix wird dies von der AmpErase® uracil-N-glycosylase übernommen, einem gentechnisch von *Escherichia Coli* produziertem 26 kDA großen Enzym. Während der Amplifikation werden die im Ansatz vorhandenen dUTPs in die synthetisierten DNA-Stränge eingebaut. Auf das Resultat der PCR hat dies keinen Einfluss. Die nächste PCR wird durch ein zwei minütiges Erhitzen auf 50 °C begonnen. In diesem Temperaturbereich arbeitet die Glycosylase optimal und spaltet alle in einer möglicherweise vorhandenen carry-over Kontamination vorhandenen Uracil-Basen aus den Strängen heraus. Dadurch liegen nur noch unterbrochene Stränge vor, die nicht mehr als Matrix für die Replikation dienen können. Durch anschließendes Erhitzen auf 95 °C für zehn Minuten wird zum einen die Polymerase aktiviert, zum anderen die Glycosylase denaturiert, so dass im weiteren Verlauf der PCR keine Uracil-Basen mehr exzidiert werden. Um dies noch sicherer zu verhindern – es werden nicht 100% der AmpErase® uracil-N-glycosylase deaktiviert – sollte die Temperatur während des Laufes konstant über 55 °C gehalten werden.

Im Universal Master Mix sind weiterhin alle nötigen Nukleotide vorhanden. Aus den beschriebenen Gründen ist dUTP anstelle von dTTP vorhanden.

Als weitere Bestandteile sind in der Mischung Tris-Puffer zur pH-Regulierung – das Optimum der Taq-Polymerase liegt über pH 8 – sowie Glycerin zur Beschleunigung der Amplifikationsreaktion vorhanden.

Bei zum Teil unbekanntem Konzentrationen der Einzelkomponenten wurden dem Ansatz 1250 µl Universal Master Mix zugefügt; dies entspricht einer Menge von 13,02 µl pro well.

7.3.3.6 Standards

Die Standards werden benutzt, um für die Allel Diskriminierung eindeutige Signale als Referenz zu schaffen. Dabei wird, wie erwähnt, Wasser als Negativkontrolle verwendet, da von diesem kein fluoreszierendes Signal ausgeht. Die beiden Positivkontrollen bilden für jedes Allel je acht wells, in die DNA mit bekanntem Polymorphismus pipettiert wird. Das sich ergebende Signal in der Auswertung sollte also klar dem jeweiligen Allel eins oder zwei entsprechen, so dass alle übrigen, unbekanntem templates unter Bezug auf diese Standards als homo- oder heterozygot eingestuft werden können.

Sowohl von Negativ- als auch Positivkontrollen werden pro well 5 µl eingesetzt.

7.3.4 PCR-Bedingungen

Die oben beschriebenen Reagenzien wurden für alle drei untersuchten Polymorphismen in identischen Konzentrationen und Mengenverhältnissen eingesetzt. Die folgende Liste verschafft einen Überblick:

Reagenz	pro well	Menge (100x)	Konzentration
TaqMan® Universal PCR Master Mix	12,5 µl	1250 µl	unbekannt
Sense Primer	2,25 µl	225 µl	500 nM
Antisense Primer	2,25 µl	225 µl	500 nM
Oligonukleotid-Sonde Allel 1	1,00 µl	10 µl	200 nM
Oligonukleotid-Sonde Allel 2	1,00 µl	10 µl	200 nM
Wasser (aqua dest. ultrarein)	1,00 µl	10 µl	-
Gesamt	20 µl	2000 µl	

Dieser Grundansatz wird mittels Vortex gemischt und eine Menge von 20 µl in jede der 96 Vertiefungen der Reaktionsplatten verteilt. Die verbleibenden Reagenzien, PCR-gereinigtes Wasser als Negativkontrolle, die Standard-Lösungen als Positivkontrollen und die Template-DNA werden nach folgendem Schema in die wells pipettiert (s. Abb. 7.6):

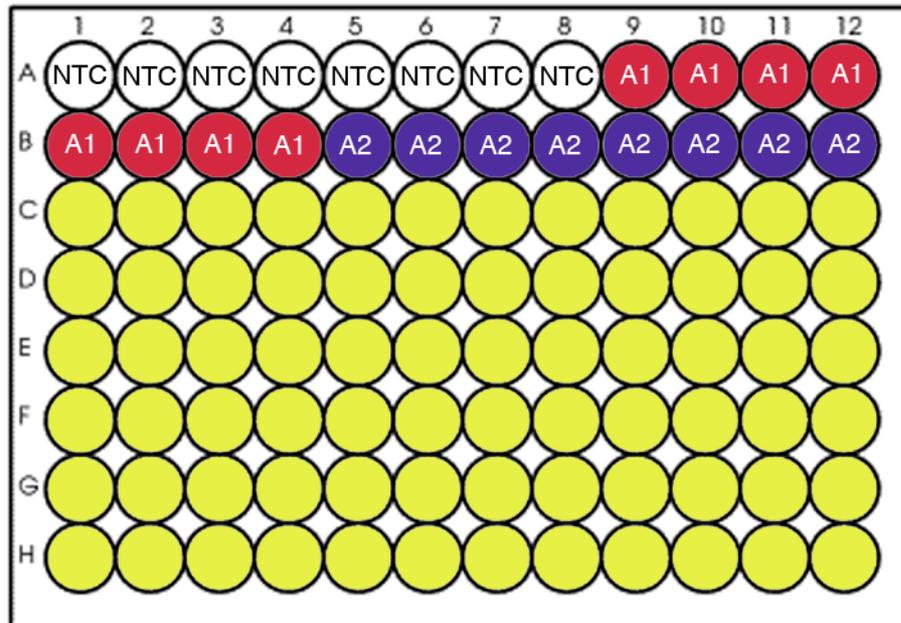


Abb. 7.6: Plattenbelegung für die Genotypisierung (identisches Schema für alle Platten): wells A1-A8: NTC – No template control = Wasser; wells A9-A12 und B1-B4: A1 – Standard für Allel 1; wells B5-B12: A2 – Standard für Allel 2. Alle übrigen wells (C1-H12, hier gelb) stehen für zu genotypisierende Proben zur Verfügung.

Zur Anwendung kamen die im Protokoll des TaqMan® Universal PCR Master Mix angegebene PCR-Konditionen, die empirisch optimiert wurden[8]. Aufgrund der ähnlichen Reagenzienzusammensetzungen konnten für alle drei untersuchten SNPs dieselben Bedingungen gewählt werden. Diese ließen sich mit beiden verwendeten Thermal Cycler Modellen verwirklichen und sollen im Folgenden beschrieben werden:

- Zu Beginn einmaliges Erhitzen auf 50 °C für zwei Minuten zur Aktivierung der AmpErase® uracil-N-glycosylase.
- Anschließend zehnmütiges Erhitzen auf 95 °C. Dadurch Inaktivierung der AmpErase® uracil-N-glycosylase und Aktivierung der AmpliTaq® Gold DNA Polymerase.
- Beginn der Amplifikationszyklen:
 - o 35 Zyklen
 - o Denaturierung bei 92 °C für 15 sec
 - o Annealing / Elongation bei 60 °C für 2 min
- Abschließende Elongation zur Vervollständigung nicht kompletierter PCR-Produkte für zehn Minuten bei 72 °C
- Abkühlen auf 10 °C zur Lagerung, falls ein sofortiges Auslesen der Platten nicht möglich war

Die folgende Abbildung 7.7 verdeutlicht den Ablauf der PCR-Zyklen noch einmal bildlich:

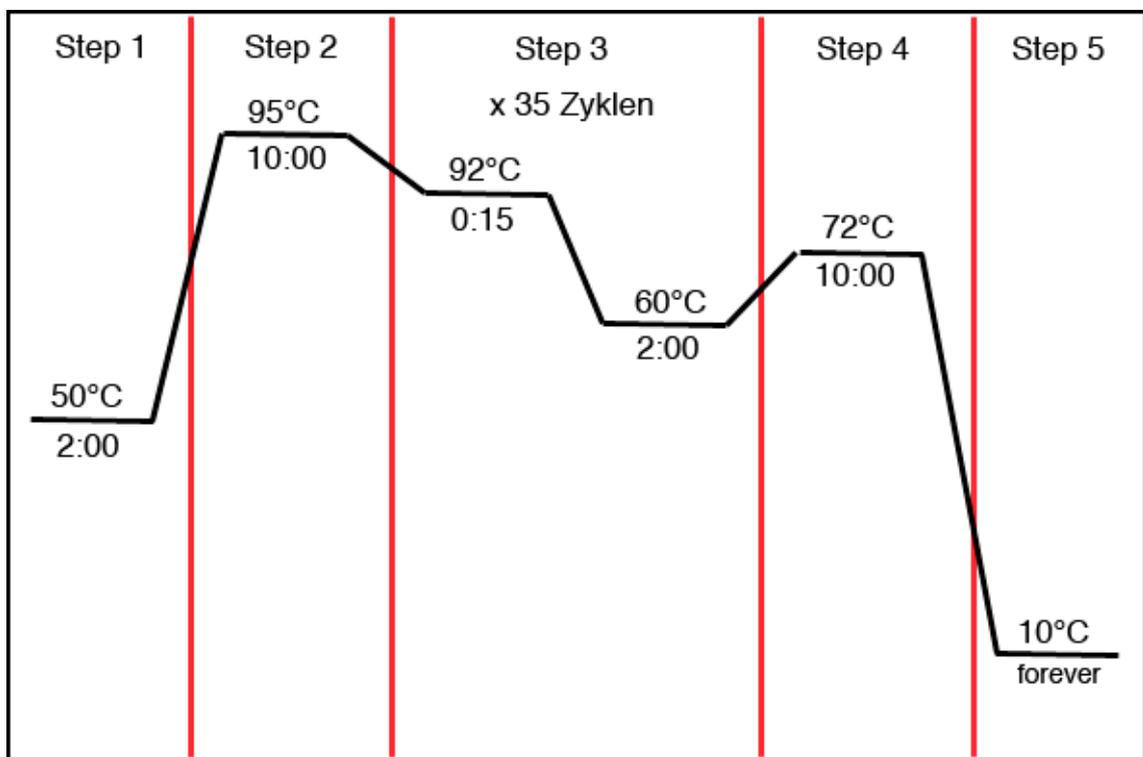


Abb. 7.7: Graphischer Überblick über die einzelnen Schritte der PCR.

7.3.4.1 Primer und Sonden für eNOS p.E298D

Für den eNOS - SNP wurden Primer mit den folgenden Sequenzen eingesetzt:

- sense: 5' – AGG AAA CGG TCG CTT CGA – 3'

Länge: 18-mer
GC-Anteil: 55,6 %
T_m: 56,0 °C
Molmasse: 5549 g / mol

- antisense: 5' – CAC CCA GTC AAT CCC TTT GG – 3'

Länge : 20-mer
GC-Anteil : 55 %
T_m : 59,4 °C
Molmasse : 6013 g / mol

Es wurden allelspezifische Oligonukleotid-Sonden mit folgender Sequenz verwendet:

- Allel 1: 5' – 6-FAM – CCA GAT GAGG CCC CCA G – MGB – 3'

Länge: 16-mer
T_m: 50,8 °C
Molmasse: 4821 g / mol

- Allel 2: 5' – VIC – CCA GAT GATT CCC CCA GA – MGB – 3'

Länge: 17-mer
T_m: 49,3 °C
Molmasse: 5108 g / mol

7.3.4.2 Primer und Sonden für nNOS c.3391C>T:

Für den c.3391C>T – SNP wurden Primer mit den folgenden Sequenzen eingesetzt:

- sense: 5' – CAT ACC CTC ACT TTT GCG CC – 3'

Länge: 20-mer
GC-Anteil: 55 %
T_m: 59,4 °C
Molmasse: 5964 g / mol

- antisense: 5' – CCT CTC CCC TCC CAG TTC TTC – 3'

Länge : 21-mer
GC-Anteil : 61,9 %
T_m : 63,7 °C
Molmasse : 6180 g / mol

Es wurden allelspezifische Oligonukleotid-Sonden mit folgender Sequenz verwendet :

- Allel 1: 5' – 6-FAM – TTC GGA CAC GCT GTG – MGB – 3'

Länge: 15-mer
T_m: 44,4 °C
Molmasse: 4570 g / mol

- Allel 2: 5' – VIC – TTC GGA CAT GCT GTG G – MGB – 3'

Länge: 16-mer
T_m: 45,7 °C
Molmasse: 4913 g / mol

7.3.4.3 Primer und Sonden für nNOS c.-84G>A:

Für den c.-84G>A – SNP wurden Primer mit folgenden Sequenzen eingesetzt:

- sense: 5' – AAG GCT TGG CCT CCC AAC – 3'

Länge: 18-mer
GC-Anteil: 61,1 %
T_m: 58,2 °C
Molmasse: 5445 g / mol

- antisense: 5' – GCA GGC CGA GCG ACT – 3'

Länge: 16-mer
GC-Anteil: 75 %
T_m: 59,4 °C
Molmasse: 4932 g / mol

Es wurden allelspezifische Oligonukleotid-Sonden mit folgender Sequenz verwendet :

- Allel 1: 5' – 6-FAM – AGC AGA GCC ACC TCC CAG CC – TAMRA – 3'

Länge: 20-mer
T_m: 59,8 °C
Molmasse: 5998 g / mol

- Allel 2: 5' – VIC – AGC AGA GCC GCC TCC CAG C – TAMRA – 3'

Länge: 19-mer
T_m: 59,5 °C
Molmasse: 5726 g / mol

7.4 Genotypisierung der SNPs mittels ABI PRISM® Sequence Detection System 7700

Grundlage der Bestimmung der einzelnen Allele der zu untersuchenden Proben ist das Prinzip des FRET (vgl. Abschnitt 7.3.2), wobei abhängig vom Vorliegen des Allels 1 oder 2 unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe angeregt und zum Leuchten gebracht werden. So kann mittels eines entsprechend kalibrierten Lesegerätes sicher zwischen beiden Allelausprägungen oder einer möglichen Heterozygotie diskriminiert werden. Zum Einsatz kam hierzu das Gerät ABI PRISM® Sequence Detection System 7700 (SDS 7700) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) [6]. Es weist denselben Aufnahmeschacht für PCR-Platten auf, wie die verwendeten Thermal Cycler, so dass die beschickten Optical 96-well Reaction Plates nach der Amplifikation problemlos in das Lesegerät umgesetzt werden konnten.

Das SDS 7700 bietet zwei Arten, auf welche die Platten ausgelesen werden können [109]. Zum einen den sog. post-read-mode, der bei weitem am häufigsten zur Anwendung kam. Es handelt sich um einen Lesevorgang nach abgeschlossener Amplifikation, mit dem die zu diesem Zeitpunkt vorliegende Intensität der Fluoreszenzfarbstoffe und damit die Verteilung der Genotypen gemessen wird. Zum anderen ist ein sog. real-time-run möglich. Dabei dient das SDS 7700 selbst als Thermal Cycler und misst kontinuierlich die Fluoreszenzemissionen der angeregten Farbstoffe. Daraus kann eine Kurve errechnet werden, die exakt die Mengenzunahme freigesetzter reporter-Farbstoffe widerspiegelt. Da man quasi live bei der DNA-Amplifikation während der PCR zusehen und zudem die Veränderungen in jeder einzelnen Vertiefung der Reaktionsplatte überwachen kann, dient diese Art des Auslesens gleichzeitig als Qualitätskontrolle der Reaktion und als Beweis für das Funktionieren der Methode. Nachteilig ist jedoch, dass diese Art des plate-read sehr zeitaufwendig ist, da nicht in mehreren Thermal Cyclers gleichzeitig amplifiziert werden kann um anschließend alle Platten schnell hintereinander auszuwerten; während eines real-time-runs ist das Gerät blockiert.

Das Lesegerät wurde mit der dazugehörigen ABI PRISM® Sequence Detection Software in der Version 1.7 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) betrieben. Diese bietet für beide Methoden des Auslesens entsprechende Modi. Es lassen sich die verschiedenen reporter und dazugehörigen quencher auswählen und so das zu messende Frequenzspektrum festlegen. Weiterhin wird die Belegung der Platten eingegeben, so dass die mitgeführten Positiv- und Negativkontrollen in definierten wells liegen und daran die Hintergrundfluoreszenz und der Genotyp der templates gemessen werden kann.

Mit Hilfe der folgenden Abbildungen soll dies noch einmal veranschaulicht werden (s. Abb. 7.8 und 7.9):

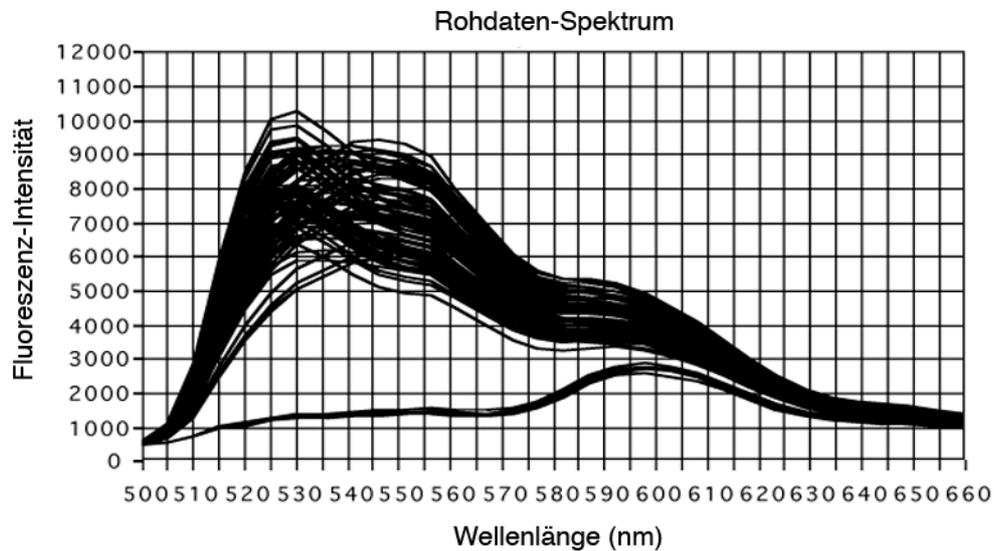
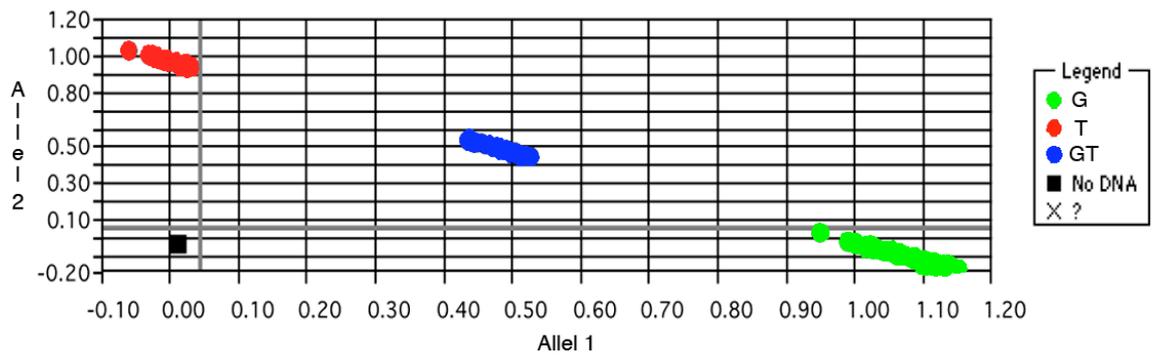


Abb. 7.8: Typisches Rohdatenspektrum der gemessenen Fluoreszenzwerte bei verschiedenen Wellenlängen. Im unteren Bildteil ist der Kurvenverlauf der mitgeführten Negativkontrollen gut zu erkennen. Der obere, dichtere Teil des Spektrums enthält die Fluoreszenzwerte der Positivkontrollen und der zu messenden Proben. Besonders im Wellenlängenbereich zwischen 540 und 550 nm ist eine deutliche Aufteilung der Kurven in die drei Cluster erkennbar. Diese drei Cluster entsprechen den drei möglichen Genotypen AA, AB und BB. Ohne die Hilfe einer Auswerte-Software ist die exakte Bestimmung des einzelnen Genotyps jedoch schwierig.



No Amp	G	G	G	G							
G	G	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T
G	GT	GT	GT	GT	G	T	G	G	G	G	G
T	G	GT	GT	GT	G	T	GT	G	G	GT	G
GT	G	GT	GT	T	G	GT	GT	GT	G	G	GT
G	GT	GT	G	G	T	G	GT	G	GT	T	G
G	G	G	GT	GT	GT	GT	G	G	GT	GT	GT
G	GT	G	T	G	GT	GT	GT	T	GT	GT	T

Abb. 7.9: Ergebnis der Genotypenanalyse einer 96-well Platte. Im oberen Teil der Abbildung sind die Fluoreszenzwerte der Allele 1 und 2 gegeneinander aufgetragen. Hohe Werte für Allel 1 entsprechen dem Genotyp G und finden sich in der Graphik rechts unten, solche für Allel 2 entsprechen dem Genotyp T und finden sich links oben. In der Mitte zwischen beiden Gruppen befinden sich die Proben, die Fluoreszenzsignale beider Allele zeigen (blau). Dieses Cluster repräsentiert die Heterozygoten mit dem Genotyp GT. Entsprechend der oben beschriebenen Aufteilung der Platte finden sich in den ersten beiden Reihen der im unteren Teil der Graphik abgebildeten Plattenübersicht die Positiv- und Negativkontrollen. Ab Reihe drei sind die Ergebnisse der Genotypisierung dargestellt.

8. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten, insbesondere die Analyse der Genotyp-Phänotyp-Assoziationen erfolgte in enger Zusammenarbeit mit Frau Regina Hollweck vom Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie sowie Herrn Arne Pfeufer vom Institut für Humangenetik der Technischen Universität München.

Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der Software Excel 2002, SPSS Version 11.0.0, SAS Version 8.02 sowie STATA SE 8.0 ausgewertet.

Die Verteilung der Genotypen wurde in Kontingenztafeln dargestellt. Die statistische Auswertung der Genotypenanalyse erfolgte gemäß den Überlegungen von Lewis aus dem Jahr 2002 zur Auswertung genetischer Assoziationsstudien [107]. Von keinem der drei untersuchten SNPs waren Angaben in der Literatur zu erheben, ob der funktionelle Effekt der Allele einem speziellen genetischen Vererbungsmodell folgt. Aus diesem Grund wurde angenommen, dass die Vererbung des transportierten Effekts einem additiven Modell folgt. Dabei erhöht sich das Risiko mit jedem vorhandenen Krankheitsallel r -fach mit einem Risiko „1“ für den Genotyp AB und einem Risiko „ $2r$ “ für homozygotes Vorliegen des Minor Allels BB.

Die Berechnung der Unterschiede in der Genotypenverteilung zwischen den jeweiligen Fall- und Kontrollgruppen erfolgte mittels des Armitage Test for Trend bzw. logistischer Regression. Das dem Genotyp zuschreibbare Risiko wurde durch Berechnung der odds ratios aus der Genotypenverteilung in der Fallgruppe im Vergleich mit der in der Kontrollgruppe quantifiziert. Odds ratios wurden mit dem entsprechenden 95% Konfidenz-Intervall (KI) angegeben.

9. Darstellung der Ergebnisse

9.1 Testung der Genotypen auf Abweichung vom Hardy-Weinberg-Equilibrium

Das Hardy-Weinberg-Gesetz besagt, dass die Verhältnisse der Genotypenverteilung über die Generationen hinweg konstant bleiben. Es geht auf die Beschreibung durch Hardy und Weinberg in den Jahren 1908 und 1909 zurück [66; 184]. Demgemäß sollten die Ergebnisse einer Genotypisierung in einer gesunden Population diesem Verhältnis entsprechen. Ist dies nicht der Fall, muss man in Betracht ziehen, dass ein Genotypisierungsfehler vorliegt. Wenn man davon ausgeht, dass eine zu untersuchende Genvariante kausal an der Entstehung einer Erkrankung beteiligt ist, so kann dies im Sinne der Evolution auch einen selektiven Einfluss auf die Verteilung der Genotypen in der erkrankten Population haben. Deshalb kann in einer Fallpopulation das Hardy-Weinberg-Gesetz erfüllt sein, es ist aber nicht Bedingung.

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Verteilung der Genotypen aller drei typisierten Varianten sowohl in der unstratifizierten Gesamtpopulation als auch in allen Subgruppen bezüglich einer Abweichung vom Hardy-Weinberg-Equilibrium untersucht. Dazu wurde die DeFinetti-Software verwendet, welche öffentlich im Internet auf der Homepage des Institut für Humangenetik der GSF – Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit (<http://ihg.gsf.de>) verfügbar ist [150].

Es zeigte sich, dass lediglich in der Fallpopulation der Subgruppe junger Studienteilnehmer die Verteilung der Genotypen der c.-84G>A-Variante vom Hardy-Weinberg-Equilibrium abwich. In allen übrigen Populationen und Subgruppen war keine Abweichung vorhanden.

9.2 Auswertung der Genotypenanalyse

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt getrennt für Gesamtpopulation und Subgruppen. In den Tabellen und im Text wird dabei für den Aminosäure-austauschenden SNP im eNOS-Gen die für das jeweilige Allel vorliegende Aminosäure im Ein-Buchstaben-Code angegeben (E entspricht Glutamat; D entspricht Aspartat). Für die beiden nicht kodierenden SNPs im Gen für nNOS ist die dem Allel entsprechende Base angegeben (C bzw. T für c.3391C>T und G bzw. A für c.-84G>A).

9.2.1 Auswertung der unstratifizierten Gesamtgruppe

In einem ersten Schritt wurden die Genotypen aller 657 Patienten der Fallgruppe und aller 672 Teilnehmer der Kontrollgruppe ausgewertet. Dies erfolgte für jeden der drei untersuchten Polymorphismen separat.

9.2.1.1 c.894G>T / p.E298D-Variante des eNOS-Gens

Einen Überblick über die Verteilung der Genotypen der p.E298D-Variante verschafft die Tabelle 9.1.

Genotyp	AF	Kontrollen	p-Wert und OR (95% KI)
E / E	286	324	
E / D	294	279	p=0,094
D / D	77	69	OR 1,15 (0,98–1,35)
	657	672	

Tab. 9.1: Verteilung der Genotypen des SNPs p.E298D in der unstratifizierten Gesamtpopulation. E – Glutamat; D – Aspartat; p – p-Wert; OR – odds ratio; KI – Konfidenzintervall.

Es zeigte sich, dass hinsichtlich der Verteilung der Allele des p.E298D-SNPs kein signifikanter Unterschied zwischen Fällen und Kontrollen besteht. Bei einem p-Wert von p=0,094 und einer OR von 1,15 (95% KI 0,98-1,35) war aber ein möglicher, geringer Einfluss des Minor Allels auf die Entstehung von Vorhofflimmern zu vermuten.

9.2.1.2 c.3391C>T-Variante des nNOS-Gens

Die Genotypenverteilung hinsichtlich des c.3391C>T-SNPs ist in der Tabelle 9.2 dargestellt.

Genotyp	AF	Kontrollen	p-Wert und OR (95% KI)
C / C	300	335	
C / T	295	280	p=0,163
T / T	61	57	OR 1,13 (0,95–1,33)
	656	672	

Tab. 9.2: Verteilung der Genotypen des SNPS c.3391C>T in der unstratifizierten Gesamtpopulation. Die von der Gesamtzahl der Patienten abweichende Fallzahl ist auf nicht erfolgreiche Genotypisierung zurückzuführen. C – Cytosin; T – Thyrosin; sonst Abkürzungen wie in Tab. 9.1.

Diese Verteilung wies keine signifikant unterschiedliche Häufigkeit der Allele in der Fall- und Kontrollgruppe auf. Der p-Wert von p=0,163 ließ auch keinen Trend vermuten.

9.2.1.3 c.-84G>A-Variante des nNOS-Gens

Eine Übersicht über die Genotypisierungsergebnisse bezüglich der c.-84G>A- Variante gibt Tabelle 9.3.

Genotyp	AF	Kontrollen	p-Wert und OR (95% KI)
G / G	515	526	
G / A	135	137	p=0,872
A / A	6	8	OR 0,98 (0,77–1,25)
	656	671	

Tab. 9.3: Verteilung der Genotypen des c.-84G>A-SNPs in der unstratifizierten Gesamtpopulation. Die von der Gesamtzahl der Patienten abweichende Fallzahl ist auf nicht erfolgreiche Genotypisierung zurückzuführen. G – Guanin; A – Adenin; sonst Abkürzungen wie in Tab. 9.1.

Der Armitage Test for Trend zeigte mit p=0,872 nahezu eine Gleichverteilung der Allele in den beiden Gruppen.

9.2.2 Substratifizierung nach Geschlecht

Im zweiten Schritt erfolgte die Auswertung der Genotypen in der nach weiblichem Geschlecht stratifizierten Subpopulation. Dabei fanden sich 200 Patientinnen mit Vorhofflimmern und 199 Kontroll-Probandinnen. Auch hier werden die Ergebnisse der einzelnen SNPs getrennt dargestellt. Zusätzlich werden die Resultate für die aufgrund der Stratifizierung herausgefallenen männlichen Studienteilnehmer aufgelistet. Da dies nicht den vor Studienbeginn definierten Strata entspricht, wurden die Berechnungen hierfür nicht interpretiert. Sie dienen ausschließlich einer vollständigen Darstellung.

9.2.2.1 c.894G>T / p.E298D-Variante des eNOS-Gens

Tabelle 9.4 fasst die Genotypenanalyse bezüglich der p.E298D-Variante für die Subgruppe der weiblichen Studienteilnehmer zusammen.

Genotyp	AF	Kontrollen	p-Wert und OR (95% KI)
E / E	94	113	
E / D	79	69	p=0,030
D / D	27	17	OR 1,38 (1,03–1,85)
	200	199	

Tab. 9.4: Verteilung der Genotypen des p.E298D-SNPs in der nach weiblichem Geschlecht stratifizierten Subpopulation. Abkürzungen wie in Tab. 9.1.

Die Berechnung mit Hilfe des Armitage Test for Trend bzw. mittels logistischer Regression erbrachte, dass das Minor Allel 298D in einer nur aus Frauen bestehenden Studienpopulation signifikant mit Vorhofflimmern assoziiert ist. Der gefundene p-Wert lag dabei bei p=0,030, die odds ratio errechnete sich zu 1,38 (95% KI 1,03-1,85).

Ohne Einfluss auf die Interpretation der Studienergebnisse zu nehmen, erfolgt in Tabelle 9.5 die Darstellung der Berechnung für eine theoretisch ebenfalls mögliche Subgruppe, bestehend nur aus männlichen Studienteilnehmern. Die Angaben sind nur im Sinne einer vollständigen Aufstellung aller Ergebnisse zu verstehen.

Genotyp	AF	Kontrollen	p-Wert und OR (95% KI)
E / E	192	211	
E / D	215	210	p=0,558
D / D	50	52	OR 1,05 (0,87–1,29)
	457	473	

Tab. 9.5: Verteilung der Genotypen des p.E298D-SNPs in einer nach männlichem Geschlecht stratifizierten Subpopulation. Abkürzungen wie in Tab. 9.1.

Es zeigte sich deutlich, dass in dieser Subpopulation mit einem p-Wert von $p=0,558$ in keiner Weise eine signifikant unterschiedliche Verteilung der Genotypen zwischen Fällen und Kontrollen zu erkennen ist.

9.2.2.2 c.3391C>T-Variante des nNOS-Gens

Die Verteilung der Genotypen des SNPs c.3391C>T im Exon 18 des Gens für nNOS findet sich für die nach weiblichem Geschlecht stratifizierten Teilnehmer in Tabelle 9.6.

Genotyp	AF	Kontrollen	p-Wert und OR (95% KI)
C / C	100	109	
C / T	82	71	p=0,520
T / T	18	19	OR 1,10 (0,82–1,49)
	200	199	

Tab. 9.6: Verteilung der Genotypen des c.3391C>T-SNPs in einer nach weiblichem Geschlecht stratifizierten Subpopulation. Abkürzungen wie in Tab. 9.2.

Als Ergebnis ließ sich zusammenfassen, dass mit $p=0,520$ eine Assoziation zwischen dem SNP und der Rhythmusstörung höchstwahrscheinlich ausgeschlossen werden kann.

Auch hier soll im Rahmen der Vollständigkeit auf das Ergebnis einer hypothetischen Stratifikation nach männlichem Geschlecht hingewiesen werden (siehe Tabelle 9.7).

Genotyp	AF	Kontrollen	p-Wert und OR (95% KI)
C / C	200	226	
C / T	213	209	p=0,205
T / T	43	38	OR 1,14 (0,93–1,39)
	456	473	

Tab. 9.7: Verteilung der Genotypen des c.3391C>T-SNPs in einer nach männlichem Geschlecht stratifizierten Subpopulation. Abkürzungen wie in Tab. 9.2.

Aus dieser Darstellung ließ sich ableiten, dass auch in diesem Fall eine Assoziation zwischen Genvariante und Erkrankung bei p=0,205 nicht nachzuweisen ist.

9.2.2.3 c.-84G>A-Variante des nNOS-Gens

In der folgenden Tabelle 9.8 sind die Ergebnisse der Genotypisierung dargestellt, wenn die Auswertung auf das vordefinierte Stratum der weiblichen Probanden beschränkt wird.

Genotyp	AF	Kontrollen	p-Wert und OR (95% KI)
G / G	152	156	
G / A	45	40	p=0,607
A / A	3	3	OR 1,12 (0,73–1,71)
	200	199	

Tab. 9.8: Verteilung der Genotypen des c-84G>A-SNPs in einer nach weiblichem Geschlecht stratifizierten Subpopulation. Abkürzungen wie in Tab. 9.3.

Eine Assoziation zwischen AF und dem SNP musste aufgrund der hier dargestellten Ergebnisse (p=0,607) ausgeschlossen werden.

Wie bereits bei den anderen beiden Polymorphismen werden die Resultate der Genotypisierung bei Berechnung einer rein männlichen Untergruppe in Tabelle 9.9 aufgeführt.

Genotyp	AF	Kontrollen	p-Wert und OR (95% KI)
G / G	363	370	
G / A	90	97	p=0,570
A / A	3	5	OR 0,92 (0,68–1,24)
	456	472	

Tab. 9.9: Verteilung der Genotypen des c.-84G>A-SNPs in einer nach männlichem Geschlecht stratifizierten Subpopulation. Abkürzungen wie in Tab. 9.3.

Aus den Ergebnissen dieser Analyse (p=0,570) ließen sich keine Schlüsse hinsichtlich einer signifikanten Assoziation ziehen.

9.2.3 Substratifizierung nach Alter

Wie oben im Rahmen der Beschreibung des Studienkollektivs erläutert, wurde eine zweite, vordefinierte Subgruppe von Fällen und Kontrollen analysiert. In diese Gruppe wurden all diejenigen Teilnehmer eingeschlossen, die Vorhofflimmern vor oder in ihrem 60. Lebensjahr entwickelt hatten. Dabei wurden, anders als in der ersten Substratifizierung, wieder Personen beides Geschlechts zusammengefasst. Die Fallgruppe setzte sich somit aus 138 Patienten mit AF und aus 220 Probanden ohne Rhythmusstörung zusammen.

Die Daten einer theoretisch möglichen, aber in der Interpretation der Daten nicht berücksichtigten weiteren Stratifizierung sollen auch hier wieder mit angegeben werden. Es handelt sich dabei um die Analyse der Studienteilnehmer, die AF nach Vollendung des 61. Lebensjahres entwickelt haben, sowie um die entsprechenden Kontrollen.

9.2.3.1 p.E298D-Variante des eNOS-Gens

Zunächst folgt in Tabelle 9.10 die Aufstellung der Daten der Genotypenanalyse bei den Teilnehmern, die AF gemäß den gerade erwähnten Kriterien in jungen Jahren entwickelt haben.

Genotyp	AF	Kontrollen	p-Wert und OR (95% KI)
E / E	58	114	
E / D	57	84	p=0,029
D / D	23	22	OR 1,41 (1,03–1,91)
	138	220	

Tab. 9.10: Verteilung der Genotypen des p.E298D-SNPs in einer nach Alter ≤ 60 stratifizierten Subpopulation. Abkürzungen wie in Tab. 9.1.

Die Ergebnisse dieser Berechnung legen nahe, dass bei Betrachtung junger Patienten (Alter ≤ 60) mit einem p-Wert von $p=0,029$ eine signifikante Assoziation zwischen Vorhofflimmern und dem typisierten SNP im eNOS-Gen besteht. Die odds ratio für die Entwicklung von AF wurde in dieser Subgruppe berechnet und lag bei 1,41 (95% KI 1,03-1,91).

Wie angesprochen, erfolgt in Tabelle 9.11 die Darstellung der Genotypisierungsergebnisse für eine Subgruppe älterer Patienten und der entsprechenden Kontrollen (Alter > 60).

Genotyp	AF	Kontrollen	p-Wert und OR (95% KI)
E / E	228	210	
E / D	237	195	p=0,550
D / D	54	47	OR 1,06 (0,88–1,28)
	519	452	

Tab. 9.11: Verteilung der Genotypen des p.E298D-SNPs in einer nach Alter > 60 stratifizierten Subpopulation. Abkürzungen wie in Tab. 9.1.

Eine signifikante Assoziation konnte anhand dieser Daten mit einem p-Wert von $p=0,550$ nicht festgestellt werden.

9.2.3.2 c.3391C>T-Variante des nNOS-Gens

Tabelle 9.12 verschafft einen Überblick über die Verteilung der Genotypen bei jungen Probanden.

Genotyp	AF	Kontrollen	p-Wert und OR (95% KI)
C / C	59	111	
C / T	69	93	p=0,256
T / T	10	16	OR 1,22 (0,87–1,72)
	138	220	

Tab. 9.12: Verteilung der Genotypen des c.3391C>T-SNPs in einer nach Alter ≤ 60 stratifizierten Subpopulation. Abkürzungen wie in Tab. 9.2.

Es zeigte sich, dass die c.3391C>T-Variante des nNOS-Gens auch bei Beschränkung der Analyse auf junge Patienten und Kontrollen keine signifikante Assoziation mit AF aufweist.

Es folgt Tabelle 9.13, in der die Ergebnisse einer Analyse der theoretisch möglichen Studienpopulation mit Beschränkung auf ältere von AF Betroffene gezeigt wird.

Genotyp	AF	Kontrollen	p-Wert und OR (95% KI)
C / C	241	224	
C / T	226	187	p=0,365
T / T	51	41	OR 1,09 (0,90–1,33)
	518	452	

Tab. 9.13: Verteilung der Genotypen des c.3391C>T-SNPs in einer nach Alter > 60 stratifizierten Subpopulation. Abkürzungen wie in Tab. 9.2.

Eine signifikante Beeinflussung von Vorhofflimmern durch die typisierte Genvariante konnte bei p=0,365 nicht angenommen werden.

9.2.3.3 c.-84G>A-Variante des nNOS-Gens

Abschließend werden in Tabelle 9.14 die Resultate der Genotypisierung des Promotor-Polymorphismus für Exon 1c des nNOS-Gens beschrieben.

Genotyp	AF	Kontrollen	p-Wert und OR (95% KI)
G / G	106	172	
G / A	32	45	p=0,999
A / A	0	3	OR 1,00 (0,62–1,62)
	138	220	

Tab. 9.14: Verteilung der Genotypen des c.-84G>A-SNPs in einer nach Alter ≤ 60 stratifizierten Subpopulation. Abkürzungen wie in Tab. 9.3.

Diese Ergebnisse veranschaulichten, dass zwischen der typisierten Promotor-Variante und der Erkrankung keinerlei Zusammenhang besteht. Mit einem p-Wert nahe 1 ($p=0,999$) waren alle Genotypen in beiden Gruppen beinahe gleich verteilt.

Der Vollständigkeit halber folgt auch hier ein Zusammenfassung der Ergebnisse bei Betrachtung des älteren Teils der Studiengruppe (Tabelle 9.15).

Genotyp	AF	Kontrollen	p-Wert und OR (95% KI)
G / G	409	354	
G / A	103	92	p=0,884
A / A	6	5	OR 0,98 (0,74–1,30)
	518	451	

Tab. 9.15: Verteilung der Genotypen des c.-84G>A-SNPs in einer nach Alter > 60 stratifizierten Subpopulation. Abkürzungen wie in Tab. 9.3.

Auch hier zeigte sich, dass sich anhand der Genotypen des hier untersuchten SNP kein Zusammenhang zur Erkrankung Vorhofflimmern schlussfolgern lässt ($p=0,884$).

10. Diskussion

10.1 Diskussion der Ergebnisse

In die vorliegende Untersuchung im Fall-Kontroll-Design wurden insgesamt 657 Studienteilnehmer mit Vorhofflimmern und 672 Kontrollpatienten ohne AF eingeschlossen. Bei allen Probanden wurden drei SNPs in zwei verschiedenen Genen, der endothelialen und neuronalen NO-Synthase, genotypisiert. Es handelt sich hierbei um die p.E298D-Variante im NOS3-Gen, sowie die Polymorphismen c.3391C>T und c.-84G>A im NOS1-Gen.

Die Auswertung erfolgte zunächst für das gesamte Kollektiv; anschließend wurde die Gesamtpopulation in zwei vordefinierte Subgruppen stratifiziert, um die Assoziation zwischen den Polymorphismen und AF auch in den jeweiligen Untergruppen beurteilen zu können. Dabei sollten gerade die Untergruppen näher betrachtet werden, in denen eine genetisch fixierte Prädisposition zur Entwicklung häufiger Krankheiten potentiell stärker zum Tragen kommt. Durch Eliminieren möglichst vieler beeinflussender Faktoren sollte so die Wahrscheinlichkeit für die Entschlüsselung des genetischen Beitrages erhöht werden. Im Falle von Vorhofflimmern sind dies zum einen jüngere Personen, bei denen naturgemäß herkömmliche Risikofaktoren seltener vorliegen. Zum anderen scheint dies auf Frauen zuzutreffen. Die bereits erwähnte ATRIA-Studie [57] zeigte, dass, unabhängig von Risikofaktoren, das weibliche Geschlecht durch alle Altersgruppen hindurch seltener von AF betroffen ist, als dies für Männer zutrifft.

Alle untersuchten Assoziationen wurden für das additive Vererbungsmodell berechnet [167]. Dies geschah unter der Annahme, dass die allelischen Varianten ihren Einfluss unabhängig davon ausüben, ob sie in hetero- oder homozygoter Form vorliegen. Jedes einzelne Allel trägt demnach gleichviel zum Gesamteffekt bei; liegt mehr als ein Allel vor, addieren sich die Einzeleffekte. Ein Erbgang, der einem dominanten oder rezessiven Muster folgt, konnte noch nicht nachgewiesen werden.

Die für die drei hier untersuchten Polymorphismen gefundenen Ergebnisse sollen nachfolgend im Einzelnen diskutiert werden.

10.1.1 eNOS

Die Ergebnisse für die p.E298D-Variante zeigten, dass das seltenere D-Allel in allen untersuchten Kollektiven bei Patienten mit VHF überrepräsentiert ist. Dabei verfehlte das Resultat in der Gesamtgruppe zwar das gesetzte Signifikanzniveau von 5%. Sowohl bei Betrachtung einer Subgruppe, in die nur Frauen eingeschlossen wurden, als auch in einer weiteren, die nur Personen unter 60 Jahren analysierte, fanden sich jedoch signifikante Assoziationen mit p-Werten von 0,029 bzw. 0,030.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass der genotypisierte SNP einen Einfluss auf die Entstehung von Vorhofflimmern hat, wenn auch einen kleinen. Folgt man der erwähnten common disease – common variant – Hypothese (s.o. Abschnitt 2.4), ist der identifizierte Polymorphismus jedoch nicht allein kausal. Bezüglich des genetischen Einflusses auf die Entstehung von Vorhofflimmern besteht eine große Heterogenität. Es ist höchst unwahrscheinlich, dass lediglich ein Gen, bzw. Polymorphismen und sonstige häufige Varianten in einem einzigen Genomabschnitt allein für das Auftreten verantwortlich gemacht werden können. Erst die Kombination vieler, für sich genommen kleiner Veränderungen fügt sich zu einem individuellen Muster genetischer Variabilität zusammen und erklärt so genug Einfluss, der zum Auftreten der Rhythmusstörung führt. Diese Hypothese wurde 2005 von Käab und Schulze-Bahr am Beispiel des Long-QT-Syndroms ausführlich erörtert [86]. Untermauert wurde sie durch eine aktuelle Arbeit von Arking et al. aus dem Jahr 2006 [9]. Im Rahmen einer genomweiten Assoziationsstudie wurde ebenfalls das QT-Intervall untersucht. In der Normalbevölkerung konnte dabei auch in einer Vielzahl von Replikationen an etlichen tausend Probanden keine häufige Genvariante mit einem starken Einfluss auf den Phänotyp identifiziert werden, obwohl die Länge des QT-Intervalls bekanntermaßen in hohem Maße erblich ist [137]. Der Grundgedanke dieser common variant-Hypothese lässt sich problemlos auf andere komplexe Phänotypen wie Vorhofflimmern übertragen. Wie bereits im Einleitungskapitel ausgeführt, finden sich in der Literatur bisher nur wenige Berichte über weitere Genvarianten, die mit der Entstehung von VHF assoziiert sind (siehe Tab. 2.2) [56; 186]. Alle gefundenen Effekte waren schwach und zudem nur in den seltensten Fällen replizierbar. Die hier gefundene Assoziation zwischen AF und dem Trägerstatus des selteneren D-Allels ist daher nur einer von vielen zu erwartenden Zusammenhängen und erhöht erwartungsgemäß das individuelle Krankheitsrisiko nur zu einem kleinen Teil.

Bei der Suche nach assoziierten Genvarianten im Rahmen von komplexen Phänotypen kommt der Größe der untersuchten Studienpopulation entscheidende Bedeutung zu. So gelang es Gensini et al. nicht, eine Assoziation zwischen AF und dem p.E298D-SNP zu zeigen [56]. Allerdings war deren Studienpopulation mit nur 148 Fällen extrem klein. Die zu erwartende statistische Power, mit der ein vorhandener Effekt bei gegebener Anzahl von Studienteilnehmern detektiert wird, kann mit Hilfe einer Vielzahl üblicher Software-Applikationen berechnet werden. Ein ganz aktuelles Beispiel für ein derartiges Programm ist der Power Calculator for Genetic Studies, kurz CaTS [163]. In der hier untersuchten, unstratifizierten Gesamtpopulation war das D-Allel mit einer odds ratio von 1,15 mit AF assoziiert. Der ethnische Hintergrund, sowie die Alters- und Geschlechtsverteilung war mit der von Gensini untersuchten Population weitestgehend vergleichbar. Bei deren Probandenzahl von 148 Fällen und 210 Kontrollen erreichten sie gerade einmal eine statistische Power von 14%, die Assoziation mit dem p.E298D-SNP zu entdecken. In der vorliegenden Untersuchung wurde die Zahl der Fälle und Kontrollen deshalb deutlich erhöht. Damit konnte der Einfluss der Variante in den, wie erläutert, stärker von der Genetik betroffenen Subgruppen von Frauen und jüngeren Menschen nachgewiesen werden. Um diesen Zusammenhang auch im Gesamtkollektiv zu zeigen, fehlte auch in der vorliegenden Studie noch die nötige Populationsgröße. Mit demselben Programm berechnet, lag die von uns erzielte statistische Power bereits bei knapp 50%. Der errechnete p-Wert von 0,094 ließ dementsprechend bereits einen klaren Trend hin zu einer Assoziation erkennen. Es ist also nachvollziehbar, dass, bei weiterer deutlicher Erhöhung der Gruppengröße, der offensichtlich kleine Effekt des p.E298D-SNPs auch in einer unstratifizierten Population statistische Signifikanz erreicht. Üblicherweise wird angestrebt, mit dem Studienmodell eine statistische Power von 80% zu erzielen. Berechnet mit dem erwähnten Programm CaTS wären dazu in einem einstufigen Ansatz, d.h. ohne Replikationsstudien, ca. 1500 Patienten und vergleichbar viele Kontrollen nötig.

Nachdem die Assoziation des typisierten SNPs mit AF gezeigt wurde, bleibt zu klären, welche pathophysiologischen Mechanismen dem Effekt zugrunde liegen. Diese Zusammenhänge sind bis heute nur teilweise verstanden. Für eine endgültige Klärung bedarf es weiterer funktioneller und systembiologischer Studien. Erkenntnisse aus bereits durchgeführten Untersuchungen stützen aber hypothetische Überlegungen.

So zeigten funktionelle Daten, dass durch den Aminosäureaustausch von Glutamat zu Aspartat das Protein eNOS durch saure Hydrolyse beschleunigt abgebaut wird. Dadurch sinkt

die Bioverfügbarkeit des Produktes NO, wodurch dieses seine kardioprotektiven Funktionen nicht in vollem Umfang entfalten kann [48; 169].

Es hat sich weiterhin gezeigt, dass die verschiedenen Isoformen der NO-Synthase im Bereich der Kardiomyozyten räumlich voneinander getrennt vorliegen. Während sich die neuronale NO-Synthase im Bereich des sarkoplasmatischen Retikulums befindet, ist die endotheliale Isoform in subzellulären Caveolae lokalisiert. Dort befinden sich auch β -adrenerge Rezeptoren sowie L-Typ Calcium-Kanäle, mit denen NO interagiert und so die kardiale Funktion reguliert [16]. Zusätzlich wird die endotheliale NO-Synthase selbst durch komplexe Regulationsprozesse mittels der Gerüst-Proteine Caveolin 1 und 3 gesteuert [51; 55]. Eine Untersuchung von Hare et al. aus dem Jahr 1995 zeigte, dass es diese räumliche Begebenheit ist, durch die von eNOS produziertes NO die β -adrenerg stimulierten, inotropen Effekte auf das Herz inhibiert [67]. Ein Review, das die vielen und zum Teil sehr komplexen Erkenntnisse zusammenfasst, die hinsichtlich der Regulation der kardialen L-Typ Calcium-Kanäle durch NO-abhängige Signalwege von Bedeutung sind, wurde 2001 von Keef et al. publiziert [89]. Dementsprechend werden die L-Typ Calcium-Kanäle vorwiegend über β -adrenerge Stimulation aktiviert, die durch die erwähnte Co-Lokalisation in den Caveolae ermöglicht wird. Durch β -adrenerge Stimuli wird intracaveolär G-Protein-vermittelt cyclisches Adenosin-Monophosphat (cAMP) gebildet. Durch dieses wird die Phosphatkinase A (PKA) aktiviert, die selbst wiederum den Calcium-Kanal phosphoryliert und damit aktiviert (s. Abb. 10.1). Die Hemmung dieser Kanäle erfolgt u.a. mittels des von der eNOS produzierten NO. Dafür sind mehrere mögliche Signalkaskaden beschrieben. Alle laufen über die G-Cyclase, die durch NO aktiviert wird. Es kommt zur Bildung von cyclischem Guanosin-Monophosphat (cGMP). Danach spalten sich die möglichen Signalwege auf: So aktiviert cGMP die cGMP-abhängige Kinase (PKG), die durch Phosphorylierung des Kanals an anderer Stelle diesen hemmt. Ähnliches funktioniert indirekt mittels deaktivierender Dephosphorylierung des Kanals durch eine Proteinphosphatase, die von der PKG aktiviert wird. Ein anderer möglicher Wirkungsweg ist die cGMP-abhängige Aktivierung der Phosphodiesterase 2 (PDE2), die cAMP abbaut. Damit fehlt ein essentielles Substrat zur Aktivierung der PKA. Daneben sind eine Reihe von Nebenwegen beschrieben, die u.a. die Phosphatkinase C, die Phosphodiesterase 3, die Protein-Tyrosin-Kinase oder die Calmodulinkinase einbinden. Bei all diesen Abläufen ist die Einwirkung von NO maßgeblich. Es ist nachvollziehbar, dass für den Fall erniedrigter NO-Spiegel im Zuge verminderter Bioverfügbarkeit allelischer eNOS-Proteinvarianten die Regulation dieses diffizilen Systems eingeschränkt ist. Durch eine solche suboptimale Steuerung der Calcium-Kanäle wäre ein

arrhythmogenes Potential bei Vorliegen des Minor Allels des genotypisierten SNPs erklärbar. Einen Überblick über die beschriebenen Vorgänge, v.a. über die Aktivierung und die häufigsten Inhibitionsvorgänge verschaffen die Abb. 10.1 und 10.2.

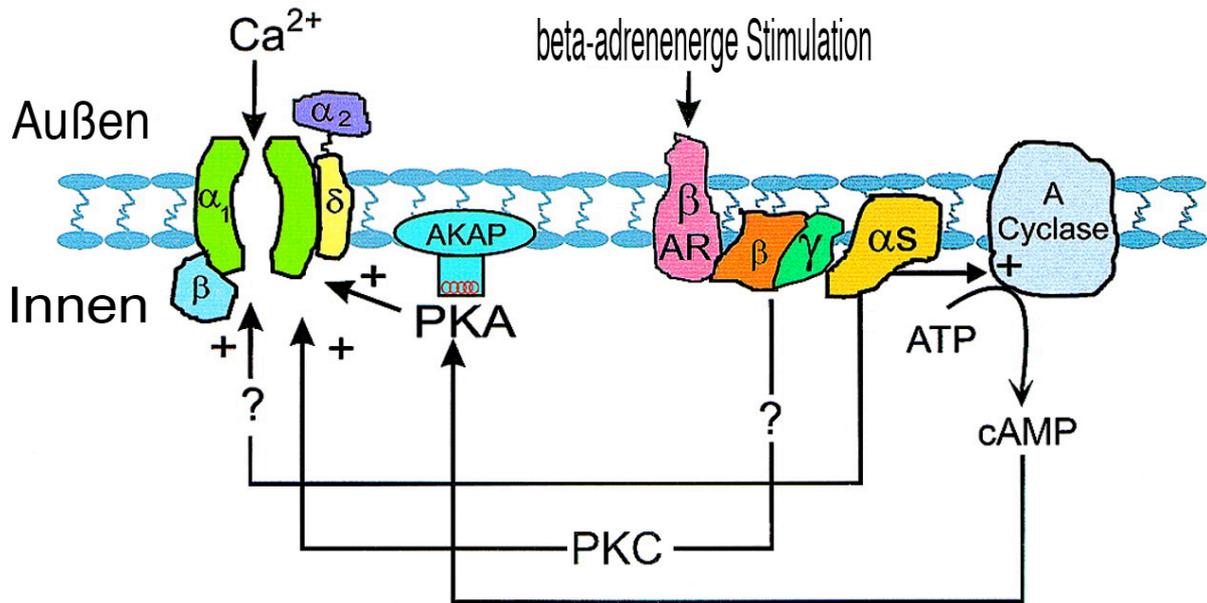


Abb. 10.1: Die Abbildung zeigt die Aktivierung des kardialen L-Typ-Calcium-Kanals. Diese erfolgt in erster Linie durch β -adrenerge Stimulation. Zum Teil sind nicht alle Signalwege vollständig geklärt. Weitere Erläuterungen im Text. (Abbildung in Anlehnung an [89]).

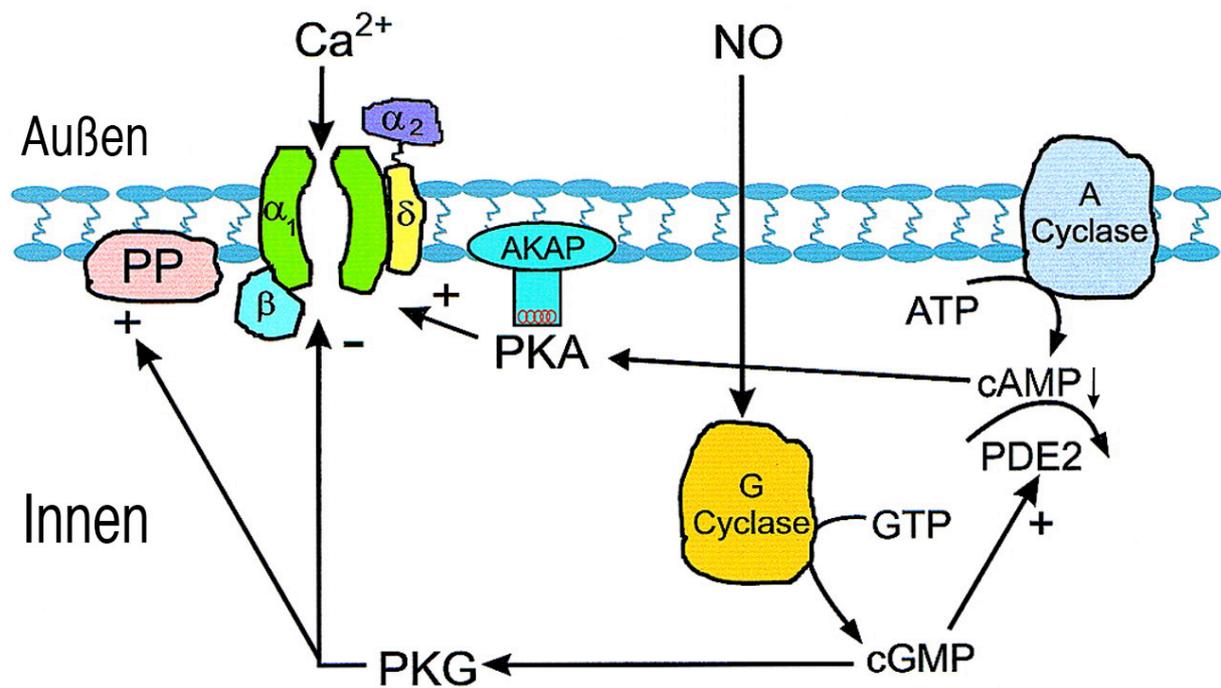


Abb. 10.2: Die Abbildung veranschaulicht die verschiedenen Signalwege, über die NO Einfluss auf die Steuerung der kardialen L-Typ-Calcium-Kanäle nimmt. Eine Reihe weiterer Nebenwege ist beschrieben. Weitere Erläuterungen im Text. (Abbildung in Anlehnung an [89]).

Eine weitere Erklärung des gefundenen Einflusses des p.E298D-SNPs auf die Entstehung von VHF muss in Betracht gezogen werden, insbesondere da die Stärke der Assoziationen relativ schwach ist und in einer unstratifizierten Population nicht nachweisbar war. Es ist möglich, dass der gezeigte Effekt tatsächlich auf eine andere Variante im NOS3-Gen oder gar auf einen Polymorphismus in einem benachbarten Gen bzw. einem benachbarten Genomabschnitt zurückzuführen ist. Dies ist denkbar, weil SNPs nicht unabhängig voneinander vererbt werden. Da die Polymorphismen eines Genomabschnitts auch übergreifend wie auf einer Perlenkette hintereinander liegen, können sie nicht meiotisch sondern nur im Rahmen von Rekombinationsereignissen, beispielsweise crossing-over, voneinander getrennt werden. Diese Tatsache der nicht freien Vererbung bezeichnet man als Linkage Disequilibrium (LD) oder Kopplungsungleichgewicht. Dieses könnte dafür sorgen, dass der hier beschriebene SNP hochkorreliert an eine weitere Variante gekoppelt ist, die die eigentlich ursächliche Assoziation erklärt. Der SNP p.E298D wäre in diesem Fall nur ein Marker und nicht der krankheitsvermittelnde Polymorphismus. Ein in Frage kommendes Gen in der genomischen Umgebung könnte dabei beispielsweise das Gen für den kardialen Kalium-Kanal KCNH2 sein. Eine Assoziation desselben mit kongenitalen Formen des Long-QT-Syndroms ist

vielfach vorbeschrieben [80]. Auf die Thematik und die Entstehung des Linkage Disequilibrium und wie dieser Umstand im Rahmen von genetischen Assoziationsstudien genutzt werden kann, wird in Abschnitt 10.2 der Diskussion (s.u.) näher eingegangen.

10.1.2 nNOS

Die Ergebnisse der Untersuchung der Polymorphismen c.3391C>T und c.-84G>A legen nahe, dass keine krankheitsrelevante Assoziation zu Vorhofflimmern besteht. Die stärkste Assoziation besteht dabei mit einem p-Wert von $p=0,163$ zwischen der c.3391C>T-Variante und AF in der unstratifizierten Gesamtpopulation. Dies lässt auch einen sehr schwachen Einfluss höchst unwahrscheinlich erscheinen. Alle anderen Berechnungen zeigten noch schwächere Assoziationen; bei der Betrachtung der c.-84G>A-Variante in der nach Alter stratifizierten Gruppe lag mit einem p-Wert von $p=0,999$ nahezu eine statistische Gleichverteilung der Allele vor. Insgesamt fällt auf, dass besonders für diesen Promotor-Polymorphismus die p-Werte sehr hoch sind.

Die Ausführungen aus Abschnitt 10.1.1 gelten im Wesentlichen auch für die Diskussion der beiden Varianten im NOS1-Gen. Auch hier wäre ein allenfalls kleiner zurechenbarer Effekt der beiden SNPs zur Entstehung von AF zu erwarten gewesen. Ähnliches gilt hinsichtlich der statistischen Power, signifikante Assoziationen zwischen Genvarianten und Erkrankungen zu detektieren. Die odds ratios, wenn auch ohne signifikantes Ergebnis, bewegen sich in derselben Größenordnung wie für die p.E298D-Variante. Dementsprechend hätte durch eine Erhöhung der Teilnehmerzahl diese Power ebenfalls gesteigert werden können. Bei der vorliegenden Schwäche der gefundenen Assoziationen wäre es jedoch nicht sehr wahrscheinlich, allein durch die Verbesserung der Power auch ein anderes Ergebnis zu finden. Deshalb kann trotz der bekannten Einschränkungen festgestellt werden, dass kein Zusammenhang zwischen den beiden SNPs und AF vorliegt.

Es bleibt allerdings zu diskutieren, weshalb kein Nachweis einer Assoziation möglich war. Dazu sollen für beide Polymorphismen getrennt einige kurze Bemerkungen angebracht werden.

Durch die Genotypisierung von c.3391G>T ist keinesfalls ausgeschlossen, dass nicht doch ein Zusammenhang zwischen NOS1 / nNOS und Vorhofflimmern besteht. Wie in der Beschreibung der drei SNPs in Abschnitt 4 ausgeführt, liegt bei c.3391C>T ein

Basenaustausch von Cytosin zu Thyrosin an Position 3391 der cDNA vor. Beide so vorkommenden Basentriplets kodieren jedoch für ein und dieselbe Aminosäure (Histidin), weshalb es sich um einen sog. synonym kodierenden SNP handelt. Wie weiter unten in der Diskussion (Abschnitt 10.2) ausgeführt ist, bedeutet diese Tatsache nicht, dass ein solcher, nicht Aminosäure-austauschender SNP keinerlei Einfluss auf die Gen- bzw. Proteinfunktion besitzen kann. Durch unterschiedlich effektive Transkription und / oder Translation des einen oder anderen Codons ist ein Einfluss durchaus erklärbar und könnte eine Assoziation zwischen Genotyp und Krankheit erklären. Allerdings gibt es Polymorphismen, die durch ihre Position in Gen oder Genom weitreichendere Änderungen bedingen. Beispiele wären nicht-synonyme, also Aminosäure-austauschende SNPs sowie solche, die Splice-sites oder Promotor-Sequenzen betreffen [187].

Im Rahmen der bereits mehrfach erwähnten common disease – common variant-Hypothese muss eine weitere Tatsache in Betracht gezogen werden, die allgemein die Krankheitsrelevanz einzelner SNPs berührt. SNPs entstanden vor sehr langer Zeit als Mutationen und wurden von Generation zu Generation weitervererbt. Allerdings unterliegen auch DNA-Veränderungen im Sinne von SNPs einem Selektionsdruck im Rahmen der Evolutionstheorie. Wird nun durch einen einzelnen Polymorphismus ein so starker Effekt auf die Entstehung oder die Aufrechterhaltung einer Erkrankung vererbt, dass dadurch in letzter Instanz auch das Leben des Betroffenen bedroht ist, bedeutet das unzweifelhaft einen Selektionsnachteil. Der Träger einer solchen Genvariante könnte sich also weniger effektiv fortpflanzen als Träger des Wildtypallels. Im Laufe vieler Generationen würde ein derart negativer Polymorphismus deshalb aus dem Erbgut verdrängt. Dieser Umstand erklärt, weshalb die große Mehrheit der im Genom vorkommenden SNPs keinen oder allenfalls einen geringen Einfluss auf die Genese der verschiedenen Erkrankungen besitzt [3].

Während für den SNP c.-84G>A prinzipiell dasselbe gilt, wie vorstehend ausgeführt, muss hier ein weiterer wichtiger Punkt beachtet werden. Sowohl bei Wang et al. [181] als auch bei Saur et al. [154] wird ausführlich die Tatsache beschrieben, dass Exon 1 der nNOS in wenigstens neun verschiedenen Splice-Varianten vorkommt und einzelne Varianten in verschiedenen Geweben des Körpers präferentiell oder aber gar nicht exprimiert werden. Die außergewöhnlich starke Assoziation des c.-84G>A-Polymorphismus im Promotor des Exon 1c mit hypertropher Pylorusstenose, wie sie von Saur et al. beschrieben wurde [153; 155], veranlasste uns, diesen SNP auch in unserer Studienpopulation mit Vorhofflimmern zu genotypisieren. Allerdings ist den Daten von Wang zu entnehmen, dass Exon 1c im Bereich des Herzens nicht oder allenfalls nur schwach exprimiert wird [181]. Es ist unklar, inwieweit

sich diese Ergebnisse der Expressionsanalyse des Exons auch auf dessen Promotor und damit den hier typisierten SNP übertragen lassen. Da die betreffende Variante aber 84 Basenpaare vor dem Beginn des transkribierten Exon 1c-Bereichs lokalisiert ist, konnte sie in genomischer DNA problemlos typisiert werden. Geht man davon aus, dass Exon 1c im Herzen nicht exprimiert wird, könnte die praktisch nicht vorhandene Assoziation der typisierten Genvariante mit AF ein Ausdruck dessen sein, dass dieser DNA-Abschnitt für die kardiale Pathophysiologie nicht relevant ist.

Abschließend zu diesem Abschnitt der Diskussion soll auf die möglichen pathophysiologischen Mechanismen eingegangen werden, durch die eine potentielle, signifikante Assoziation hätte erklärt werden können. Da in der vorliegenden Studie keine solche Assoziation nachgewiesen werden konnte, müssen die folgenden Ausführungen zum Teil spekulativ bleiben. Wie aber bereits erwähnt, ist es gut möglich, dass anderen Genvarianten in NOS1 ein krankheitsrelevanter Effekt zuzuschreiben ist.

Im Gegensatz zu den diskutierten Effekten der endothelialen NO-Synthase besteht in der Literatur kein Konsens bezüglich der pathophysiologischen Mechanismen der neuronalen Isoform. Dazu tragen v.a. eine Vielzahl z.T. gegensätzlicher Forschungsergebnisse einzelner Arbeitsgruppen bei, sowie die Tatsache, dass es bisher nicht gelungen ist, die vielen vorhandenen Beeinflussungsfaktoren ausreichend zu kontrollieren. Obwohl es sich um Arbeitshypothesen handelt, scheinen sich einige der postulierten Wirkmechanismen dennoch durchzusetzen. Im Folgenden soll eine kurze Übersicht mögliche Signalwege gegeben werden.

Weitgehend Klarheit herrscht hinsichtlich der Mechanismen, die der vegetativen Steuerung über vorwiegend parasymphatische Nervenendigungen im Bereich des Herzens zugrunde liegen. Ein guter Überblick hierzu findet sich in einem Review-Artikel von Danson et al. aus dem Jahr 2005 [37]. Demzufolge führt die Bildung von NO durch nNOS zur Stimulation der löslichen Guanylat-Cyclase und damit zur vermehrten Bildung von cGMP. Die dadurch bedingte Hemmung der Phosphodiesterase 3 (PDE3) ermöglicht höhere Spiegel von cAMP, welches die PKA aktiviert. Diese aktiviert N-Typ Calcium-Kanäle durch Phosphorylierung und erhöht so den Calcium-Einstrom in die Nervenendigungen, welcher für die Freisetzung des Neurotransmitters Acetylcholin (ACh) verantwortlich ist. ACh vermittelt die parasymphatischen Effekte im Bereich des Herzens. Die beschriebenen Vorgänge veranschaulicht Abb. 10.3:

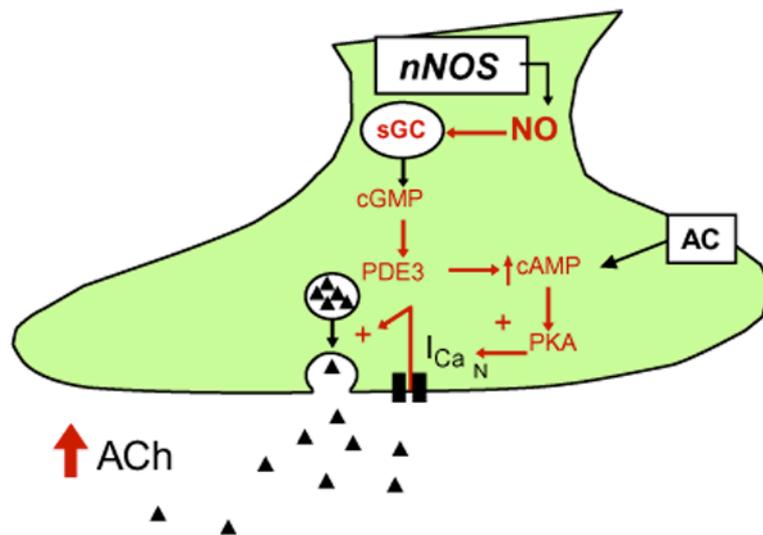


Abb. 10.3: Übersicht über die Einbindung der nNOS in die vegetative Steuerung im Bereich kardialer, parasympathischer Nervenendigungen. Erhöhte nNOS-Aktivität führt über eine Reihe von Zwischenschritten zur vermehrten Freisetzung des vorwiegend parasympathischen Neurotransmitters ACh. Weitere Erläuterungen im Text. (Abbildung in Anlehnung an [37]).

Deutlich weniger klar liegen die Verhältnisse im Bereich der Kardiomyozyten, wo der oben beschriebene Einfluss auf die kardiale Kontraktilität zu suchen ist. Unstrittig ist, dass von der nNOS produziertes NO für eine tonische Inhibition der kardialen Kontraktion sorgt [13]. Seit dem Nachweis der nNOS im Bereich des sarkoplasmatischen Retikulums durch Xu et al. verdichten sich die Hinweise, dass die verantwortlichen Prozesse vorwiegend dort ablaufen [193]. Diese Theorie wird gestützt von Barouch et al., die zeigen konnten, dass diese räumliche Trennung der Isoformen für die unterschiedlichen Effekte verantwortlich ist, die von eNOS bzw. nNOS vermittelt werden [16]. Welche Strukturen im Bereich des sarkoplasmatischen Retikulums aber konkret verantwortlich sind, ist nicht geklärt und Gegenstand kontroverser Diskussionen in der Literatur.

Während Xu et al. [193] die Hypothese vertreten, durch Hemmung der Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA) würde die Calcium-Aufnahme in die kardialen Speicher verlangsamt, können Ashley et al. so nur einen Teil ihrer Ergebnisse erklären. Diese Gruppe mutmaßt, auch das NO der nNOS könnte L-Typ Calcium-Kanäle regulieren, die sich

in Mikrodomänen zusammen mit dem Enzym befinden [11]. Dieselbe Gruppe diskutiert in einer späteren Veröffentlichung zusätzlich die Involvierung des Ryanodin Rezeptors 2 (RyR2) [157], nachdem sich gezeigt hat, dass dieser Kanal durch NO sowohl aktiviert [136; 194] als auch inhibiert [197] wird. Nach deren Hypothese würde NO die Offenheitswahrscheinlichkeit von RyR2 erhöhen und so höhere Calciumströme ermöglichen. Allerdings räumen die Autoren ein, dass auch dieser Zusammenhang keine suffiziente Erklärung aller Befunde gewährleistet. Messungen der Calciumströme an L-Typ Calcium-Kanälen machen dagegen auch in deren Untersuchung eine maßgebliche Beteiligung dieser Strukturen wahrscheinlich. Der erhöhte Einstrom der Ionen bei nNOS^{-/-}-Mäusen könnte die verstärkte kardiale Kontraktion dieser Tiere erklären [157].

Erschwerend kommt für das Verständnis der nNOS-abhängigen Pathophysiologie hinzu, dass sich unter ischämischer Belastung des Herzens auch das Wirkungsspektrum des Enzyms zu ändern scheint, so dass zumindest unter diesen Bedingungen eine Beteiligung der SERCA wieder wahrscheinlicher wird [41].

Zusammenfassend muss also festgestellt werden, dass der Einfluss der neuronalen NO-Synthase auf die kardiale Pathophysiologie allgemein und die Entstehung von AF speziell nicht endgültig geklärt ist. Es ist aber keineswegs unwahrscheinlich, dass alle, oder zumindest mehrere der vermuteten Signalwege zusammen die Wirkungsweise des Enzyms erklären.

10.2 Limitationen der Studie bei kritischer Betrachtung des Studienkonzeptes und der Methodik

In der vorliegenden Arbeit wurde die Assoziation zwischen drei single nucleotide polymorphisms und dem Auftreten von Vorhofflimmern untersucht. Dabei zeigten die beiden SNPs aus dem NOS1-Gen in der gesamten untersuchten Population und in allen Subgruppen keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der Verteilung der Genotypen und dem Auftreten der Erkrankung. Demgegenüber fanden sich bei dem Polymorphismus p.E298D aus dem NOS3-Gen in der Gesamtgruppe ein zumindest statistisch auffälliges Ergebnis ($0,1 > p > 0,05$). In verschiedenen Subgruppen der Studienpopulation konnten auch signifikante Unterschiede nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse wurden bereits im vorangegangenen Kapitel ausführlich diskutiert. Gegenstand dieses Abschnitts soll das Konzept der Studie sowie die verwendete Methodik sein. Nach heutigen Gesichtspunkten liegen darin Limitationen begründet, die sich besonderes in der jüngeren Vergangenheit herauskristallisiert haben.

Zunächst muss die Auswahl des Fall- und Kontrollkollektivs hinterfragt werden. Bei einem, wie hier durchgeführt, klassischen Kandidatengen-Ansatz hat sich das Konzept der Fall-Kontroll-Studie als einfach praktikabel und aussagekräftig erwiesen. In dieser Hinsicht steht auch die Gruppe der Patienten mit Vorhofflimmern nicht zur Diskussion. Eine potentielle Gefahr der unbeabsichtigten Verfälschung der Ergebnisse liegt jedoch darin, auch als Kontrollgruppe ausschließlich Patienten heranzuziehen, die im Krankenhaus rekrutiert wurden. Hinzu kommt, dass der bei weitem größte Teil der Probanden Patienten derselben Klinik waren und von daher eine Unabhängigkeit der beiden Kollektive nicht als endgültig sicher anzunehmen ist.

Schwerer, da potentiell das Studienergebnis beeinflussend, wiegt jedoch die Tatsache, dass Probanden, die im Rahmen eines Krankenhausaufenthaltes rekrutiert wurden, auch bei Ausschluss der für die Studie relevanten Erkrankung schwerlich als gesund gelten können. Es birgt eine unkalkulierbare Anzahl an Beeinflussungsfaktoren, diese Patienten als „gesundes Kontrollkollektiv“ zu verwenden. Den konkreten Fall betreffend wurden bei den Patienten der Kontrollgruppe überdurchschnittlich häufig die Diagnosen „arterielle Hypertonie“ und „koronare Herzerkrankung“ gestellt. Hinsichtlich dieser beiden Erkrankungen bestehen signifikante Unterschiede bezüglich der Häufigkeit des Auftretens zwischen Fällen und Kontrollen. Ähnliches gilt für eine Reihe weiterer klinischer Parameter, die bei den Studienteilnehmern erhoben wurden. Wie aber oben beschrieben, zählen gerade diese beiden Begleiterkrankungen zu den besonders relevanten Risikofaktoren für das Auftreten von Vorhofflimmern [96].

Um diese Konflikte in der Struktur der untersuchten Kollektive wenigstens teilweise zu lösen, hätten die beiden Gruppen unter Berücksichtigung der kritischen Merkmale gematcht werden müssen [103]. Durch die dadurch erreichte Gleichverteilung zwischen den Gruppen wäre es möglich gewesen, die Beeinflussung der Studienergebnisse zu verringern. Ein Ausschluss der Beeinflussung wäre jedoch auch dadurch nicht möglich gewesen, da nach heutigem Wissensstand nicht exakt bekannt ist, auf welche Art und in welchem Maße die koronare Herzkrankheit oder der arterielle Hypertonus tatsächlich für die Entstehung von Vorhofflimmern verantwortlich sind. Inwieweit diese beiden Erkrankungen selbst genetisch fixiert sind, ist Gegenstand der aktuellen wissenschaftlichen Forschung und bis dato nur unvollständig geklärt. Insbesondere die p.E298D-Variante im eNOS-Gen konnte bereits sowohl mit der arteriellen Hypertonie als auch mit der koronaren Herzerkrankung korreliert werden [34; 71; 121; 135; 182; 198]. Deshalb muss das vorliegende Studienergebnis umso

kritischer betrachtet werden, um nicht zu übersehen, dass die gefundene Assoziation möglicherweise auf die Begleiterkrankungen in der Kontrollgruppe zurückzuführen ist. Ein Punkt, der hierbei zugunsten der gefundenen Ergebnisse zu werten ist, ist die Tatsache, dass die erwähnten kritischen Confounder in der Kontrollgruppe überrepräsentiert sind. Der in der Studie gefundene Effekt zwischen AF und dem Genotyp der eNOS-Variante zeigt jedoch eine Assoziation mit der Fallgruppe. Daher mag man annehmen, dass dieser Effekt trotz vordergründig nur schwach signifikanten Ergebnisses glaubhaft ist und ausreichend, um den Einfluss der Confounder Hypertonie und KHK zu überspielen.

Diese Erörterung der Limitationen der vorliegenden Studie verdeutlicht, welche Probleme bei der Untersuchung komplexer Phänotypen auftreten. Die Tatsache, dass im Gegensatz zu monogenen Erkrankungen eben nicht eine einzelne Mutation mehr oder weniger alleine für die Ausprägung von Merkmalen verantwortlich ist, zwingt dazu, sich mit deutlich weniger klaren Ergebnissen zufrieden zu geben und diese im Sinne eines kleinen Beitrags zur Gesamtheit der Einflussfaktoren zu interpretieren [9; 86]. Erschwerend kommt hinzu, dass diese kleinen Unterschiede, die in ihrer Summe letztlich wahrscheinlich zum Auftreten der Erkrankung führen, nicht immer und in jedem untersuchten Kollektiv nachweisbar sind. Grund dafür kann beispielsweise die unterschiedliche ethnische Herkunft des Studienkollektivs [81; 168] oder die unterschiedliche Definition des untersuchten Phänotyps sein [132]. So ist es bei den meisten vergleichbaren Studien in der Literatur unabhängig vom Phänotyp geradezu an der Tagesordnung, dass ein einmal gefundener Effekt in einer unabhängigen Nachuntersuchung nicht repliziert werden kann [159]. Dies führt dazu, dass verschiedene Untersuchungen zu Ergebnissen führen, die sich vermeintlich widersprechen. Dabei ist mit heutigem Wissen über die Vererbung komplexer Phänotypen aber kaum nachzuweisen, ob sich diese Ergebnisse letztendlich tatsächlich entgegenstehen, oder ob nicht erkannte oder nicht beachtete Einflussfaktoren zum Tragen gekommen sind, die eine zweifelsfreie Bestätigung eines Ergebnisses verhindern.

Um diesen Problemen bestmöglich Rechnung zu tragen, existieren verschiedene Ansätze, die auch in der vorliegenden Studie hätten bedacht werden müssen:

Eine Möglichkeit besteht darin, die Fall- und die Kontrollgruppe bezüglich identifizierter Einflussfaktoren besser zu matchen [103]. Dadurch kämen in beiden Kollektiven nur noch Personen vor, die sich bezüglich des zu betrachtenden Merkmals unterscheiden, ansonsten aber in möglichst vielen Punkten eins zu eins gleichen. Dies ist allerdings dadurch limitiert,

dass es mit zunehmender Anzahl gematchter Faktoren schwieriger bis unmöglich wird, eine passende Kontrollpopulation zu rekrutieren.

Die zweite Strategie, eine aussagekräftige Kontrollgruppe zu rekrutieren, ist die der populationsbasierten Erhebung [125]. Dabei wird eine Bevölkerungsgruppe gesucht, die bezüglich ihres genetischen Hintergrundes möglichst homogen ist und in den zurückliegenden Generationen nicht Bevölkerungsbewegungen in großem Stile unterworfen war. Aufgrund der Egalisierung durch eine große Anzahl an Probanden ist dabei die gelegentliche Beimischung Einzelner im Rahmen von Ehen oder Zuzug, die nicht der vorwiegend anzutreffenden ethnischen Gruppe zugehören, nicht problematisch. Eine solche populationsbasierte, hypothesenfreie Kontrollgruppe existiert beispielsweise im Rahmen der MONICA / KORA-Erhebungen im süddeutschen Raum [75; 185]. Seit Mitte der 80er Jahre des vorigen Jahrhunderts wurden hier in mehreren Erhebungen zufällig aus dem Melderegister ausgewählte Bewohner der Region um Augsburg eingeschlossen. Bei diesen wurden mittels Befragung und klinischer Untersuchung eine Vielzahl verschiedener Parameter erfasst, und zusätzlich zur genetischen Evaluation eine Blutprobe abgenommen. Die einzigen wichtigen Einschlusskriterien waren dabei ein Alter zum Erhebungszeitpunkt zwischen 25 und 75 Jahren, sowie die zahlenmäßig gleiche Repräsentation von Männern und Frauen. Um mögliche Unterschiede in der Bevölkerungsstruktur auszugleichen, fand die Erhebung sowohl im Bereich der Großstadt Augsburg, als auch in der ländlich geprägten Umgebung der Stadt statt. Dieser Ansatz ermöglicht es, einerseits epidemiologische Fragestellungen zu klären, andererseits eine vorurteilsfreie Kontrollpopulation für Fall-Kontroll-Studien zur Verfügung zu haben, in der mögliche Erkrankungen nur mit der für die Allgemeinbevölkerung zutreffenden Häufigkeit vorkommen. Wiese ein Teilnehmer der Kontrollgruppe zufällig die im Rahmen der Studie untersuchte Erkrankung auf, könnte er als Einzelfall problemlos aus der Erhebung ausgeschlossen werden, ohne dass dadurch ein negativer Einfluss auf die Struktur der Gruppe oder das Studienergebnis zu erwarten wäre. Wäre ein solches Konzept in der vorliegenden Untersuchung zum Tragen gekommen, hätte dies nicht zwingend dafür gesorgt, dass ein höher signifikantes Ergebnis gefunden worden wäre. Das wie auch immer geartete Ergebnis der Studie hätte aber eine deutlich höhere Aussagekraft, da die Vielzahl oben beschriebener negativer Einflussfaktoren nicht vorhanden gewesen wäre. Eine solch annähernd ideale Vergleichsgruppe stand für die vorliegende Dissertation nicht zur Verfügung. Die Mitbenutzung von Daten und genetischem Material aus Projekten wie KORA ist im Allgemeinen nur für die am Projekt selbst teilnehmenden Institute und Einrichtungen möglich oder aber mit sehr hohen Kosten verbunden, die im Rahmen dieser Arbeit nicht zu

decken gewesen wären. Die eigenständige Erhebung von Kontrolldaten im beschriebenen Rahmen ist jedoch ebenfalls höchst kostenintensiv, vor allem aber logistisch ohne den Hintergrund eines groß angelegten Studienzentrums nicht zu verwirklichen. All dies hat verhindert, einen wie hier beschriebenen Ansatz für die Kontrollgruppe der vorliegenden Untersuchung zu nutzen.

Auch die Auswahl der untersuchten SNPs bietet Anlass zur Kritik: In der hier durchgeführten Studie wurden wie beschrieben drei Polymorphismen untersucht, die im Bereich der Gene NOS1 und NOS3 liegen. Wie erwähnt, handelt es sich bei Vorhofflimmern um einen komplexen Phänotyp, der multifaktoriell vererbt wird. Es ist also nicht der Fall, dass, ähnlich wie bei Mutationen im Rahmen monogener Erkrankungen, ein einzelner, in der Gruppe der Erkrankten über- oder unterrepräsentierter SNP, mehr oder weniger allein für das Auftreten des Phänotyps verantwortlich ist. Im Gegenteil: Wahrscheinlich ist erst die individuelle Konstellation verschiedener genetischer Marker und der zusätzliche Einfluss dritter Faktoren für dessen Ausprägung verantwortlich [86]. In diesem Rahmen ist es oft wenig hilfreich, lediglich einzelne single nucleotide polymorphisms zu genotypisieren, solange sich nicht gezeigt hat, dass der jeweils untersuchte SNP eine hohe bis sehr hohe funktionelle Relevanz besitzt. Bis zum heutigen Zeitpunkt liegen jedoch zu den wenigsten SNPs profunde funktionelle Daten vor; dies ist eher die Ausnahme. Unseres Wissens nach existieren lediglich zu dem p.E298D-Polymorphismus publizierte Daten hinsichtlich der Relevanz des SNPs auf die Funktion des Genproduktes [48; 169; 179]. Bis solche Information für eine Vielzahl oder sogar alle SNPs vorhanden ist, dürfte noch geraume Zeit vergehen. Bis dahin muss man davon ausgehen, dass a priori eine Vielzahl von SNPs potentiell dazu in der Lage ist, die Funktion des jeweils kodierten Proteins zu beeinflussen, unabhängig von ihrer Position im Genom [187]. Dies bedeutet, dass nicht nur solche Genvarianten in Frage kommen, die zu einem Austausch von Aminosäuren im translatierten Protein führen. Auch solche, die zwar im Bereich eines Exons liegen, aber aufgrund des redundanten genetischen Codes keine direkte Veränderung der Primärstruktur des Genprodukts nach sich ziehen, können auf z. T. noch nicht verstandenen Wegen zur Entwicklung von krankhaften Phänotypen führen. Mögliche Ansatzpunkte für das Verständnis der veränderten Funktion ist eine ineffizientere Transkription oder Translation so veränderter DNA bzw. RNA. Wie im Fall der hier zum p.E298D-SNP zitierten Publikationen [48; 169; 179] muss auch der beschleunigte, respektive verlangsamte Abbau der mRNA und damit möglicherweise erniedrigte bzw. erhöhte Plasmaspiegel der jeweiligen Proteine in Betracht gezogen werden. Ähnlich relevant wie

exonische SNPs sind solche, die im Bereich von Introns, Promotor- oder Enhancer-Regionen liegen [187]. Da sich durch diese Veränderungen die Aminosäurefolge eines Proteins auf den ersten Blick nicht verändert, neigt man dazu, diesen Polymorphismen nicht die nötige Aufmerksamkeit zu schenken. Dass dies zu falschen Schlüssen verleitet, wird deutlich, wenn man bedenkt, dass im Bereich von Introns häufig Regulatorsequenzen liegen, die Splicing-Vorgänge bei der Prozessierung von Proteinen kodieren. Alternativ gesplicte Proteine können verständlicherweise grundlegend unterschiedliche funktionelle Eigenschaften aufweisen, zum Teil auch völlig funktionslos werden. Ähnliches gilt für Promotor- und Enhancer-Sequenzen. Kann durch eine Veränderung in einer solchen Region die Transkription eines DNA-Abschnitts nicht mehr korrekt reguliert werden, hat dies einen potentiellen Einfluss auf die Plasmaspiegel und damit die Funktion von Proteinen. Neueste Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass noch DNA-Varianten, die bis zu einer Million Basenpaare vom Transkriptionsstartpunkt entfernt liegen, regulatorischen Einfluss auf das jeweilige Gen haben können [165]. Bis heute ist die Regulation des genetischen Codes so lückenhaft verstanden, dass auch im Bereich von DNA-Sequenzen, die hier nicht gesondert erwähnt wurden, wichtige, bisher unerkannte Funktionen verschlüsselt sein können. Es muss also festgestellt werden, dass es potentiell keinen SNP gibt, dessen Relevanz von vornherein ausgeschlossen werden kann.

Um diese Problematik bestmöglich zu umgehen, ist man heute dazu übergegangen, eine größere Anzahl an SNPs eines Gens oder Genomabschnitts zu typisieren, nach Möglichkeit lückenlos alle bekannten Varianten des entsprechenden Bereichs zu untersuchen. Dabei werden jedoch schnell die Grenzen des Machbaren erreicht, sei es aus finanziellen, sei es aus logistischen Gründen. Denn im Bereich eines Gens können durchaus mehrere hundert, auch tausende Polymorphismen liegen [145]. Jeden Einzelnen zu genotypisieren wäre extrem aufwändig und kostenintensiv.

In diesem Zusammenhang hat sich eine internetbasierte Datenbank als äußerst hilfreich erwiesen: Das International HapMap Project[5; 170] (s. Abb. 10.4).



Abb. 10.4: Logo des International HapMap Project (nach [171]).

Es handelt sich um ein von der Harvard Medical School und dem Massachusetts Institute of Technology unter der Führung des Broad-Institute entwickeltes Projekt, das bei sog. Trios in großem Maßstab SNPs genotypisiert und diese Ergebnisse in einer speziellen Datenbank veröffentlicht. Trios bestehen aus je drei Personen, wobei es sich jeweils um ein Elternpaar und einen von diesen beiden abstammenden Nachkommen handelt [171]. Dadurch ist es möglich, Rückschlüsse auf die Weitergabe genetischer Information zu ziehen. Um der Tatsache Rechnung zu tragen, dass Menschen unterschiedlicher ethnischer Herkunft verschiedene Kombinationsmuster von Polymorphismen aufweisen, wurden im Rahmen des HapMap-Projektes vier verschiedene Populationen untersucht. Dabei handelt es sich um 90 Bewohner des US-Bundesstaates Utah mit nord- und westeuropäischen Vorfahren (CEU), 90 Yoruba in Ibadan, Nigeria (YRI), repräsentativ für Schwarzafrika südlich der Sahara, 45 Han-Chinesen aus Peking (CHB) und 45 Japaner aus Tokio (JPT).

Bei all diesen Individuen wurden in mehreren Projektphasen über 5,6 Millionen SNPs, verteilt über das gesamte menschliche Genom, genotypisiert. Über eine Art Genom-Browser, den die HapMap-Homepage darstellt, lassen sich eine Vielzahl von Informationen zu all diesen Polymorphismen, z.B. die exakte genomische Position oder die Häufigkeit des Minor Allels abfragen. Es können nicht nur Einzelabfragen durchgeführt werden, sondern auch die SNPs ganzer Gene oder genomischer Regionen dargestellt werden. Dabei zeigt sich auch die bekannte Tatsache, dass SNPs eines Chromosoms nicht unabhängig voneinander vererbt werden [5]. Dies ist naheliegend, denn während den meiotischen Teilungen werden ja die nicht-homologen, väterlichen und mütterlichen Chromosomen zufällig auf die neuentstehenden Zellen verteilt und so für genetische Durchmischung gesorgt. Die Neuorganisation einzelner Bereiche innerhalb eines Chromosoms geschieht dagegen nur im Zuge von Rekombinationsereignissen. So können SNPs, die sich innerhalb einer genomischen Region quasi wie Perlen auf einer Kette hintereinander befinden, beispielsweise durch crossing-over voneinander getrennt werden. Solche Ereignisse sind mit einer Durchschnittsrate von 10^{-8} pro Basenpaar und Generation aber äußerst selten [5]. Je näher

zwei Polymorphismen beieinander liegen, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein Rekombinationsereignis exakt zwischen beiden auftritt und sie trennt. So gibt es eine Vielzahl von SNPs, die seit ihrer Entstehung als Punktmutationen vor tausenden von Generationen noch nie voneinander getrennt wurden. Folglich existieren in Bereichen geringer Rekombination SNP-Kombinationen, die immer gemeinsam vererbt werden. Diese Gruppen bilden sog. Haplotypen. Den beschriebenen Umstand, dass einzelne SNPs nicht unabhängig vererbt werden, bezeichnet man als Kopplungsungleichgewicht bzw. Linkage Disequilibrium (LD). Das besondere an der HapMap-Datenbank ist nun, dass hier diese gemeinsam vererbten Haplotypen verzeichnet sind und das bestehende LD zwischen einzelnen Polymorphismen mittels üblicher Korrelationskoeffizienten quantifiziert werden kann [5]. Diese sind im wesentlichen der Parameter D' , der ein Maß für das LD eines SNPs in einer Region darstellt, sowie der Koeffizient r^2 , der angibt, wie hoch zwei einzelne SNPs miteinander korreliert sind. Ein Wert von $r^2=1$ entspricht dabei einer 100%igen Übereinstimmung hinsichtlich der Information, die eine Genotypisierung liefert. Kennt man den Genotypen des einen, kann man sich den des anderen erschließen. Betrachtet man ganze Gene oder noch größere Genomregionen, lassen sich die LD-Verhältnisse in Form sogenannter LD-Blöcke entweder direkt auf der Homepage oder mit Hilfe spezieller Software visualisieren.

Um, wie am Anfang dieses Absatzes gefordert, eine möglichst lückenlose Abdeckung an SNP-Genotypen einer Region zu erreichen, läßt sich das Wissen um die Korrelation zwischen den einzelnen Genvarianten nutzen. Für alle SNPs mit einem perfekten r^2 -Partner von $r^2=1$ reduziert sich die Anzahl zu typisierender Polymorphismen um die Hälfte, da ja der Rückschluß auf den Genotyp des anderen möglich ist. Da aber ein Großteil der SNPs keine perfekten r^2 -Nachbarn aufweist, läßt sich diese Strategie nicht auf alle Varianten anwenden. Lockert man jedoch die Anforderungen an die Höhe der Korrelation und reduziert sich auf das in der Literatur übliche Niveau von $r^2=0,8$, so läßt sich, bei gleichzeitig ausreichender Sicherheit hinsichtlich des vorhersagbaren Genotyps des anderen SNPs, eine sehr deutliche Reduktion der Anzahl zu typisierender SNPs erreichen [42]. Abhängig von der LD-Struktur der jeweiligen Genomregion reduziert sich die Zahl der Varianten um etwa den Faktor zehn [42]. Die SNPs, die auf diese Weise sich selbst und die Genotypen ihrer r^2 -Nachbarn abbilden, bezeichnet man als sog. haplotype-tagging SNPs, oder kurz htSNPs. Die Berechnung dieser htSNPs einer Region läßt sich ebenfalls direkt auf der Homepage des HapMap-Browsers, oder offline mit Hilfe entsprechender Software durchführen.

Durch diese drastische Reduktion des Genotypisierungsaufwandes gewinnt man zusätzlichen Spielraum bei der Anzahl der Polymorphismen, die bestimmt werden können. So ist es

möglich, den Blickwinkel über ein bestimmtes Gen hinaus auf die umgebende genomische Region zu erweitern. Die Betrachtung der LD-Blöcke genomischer Regionen macht darüberhinaus deutlich, dass die Grenzen dieser Blöcke und die Gengrenzen in den seltensten Fällen übereinstimmen. Oftmals überschneiden sich dabei die LD-Strukturen mehrerer nah beieinander liegender Gene maßgeblich. Dies erschwert die Beurteilung, welcher einzelne SNP tatsächlich für einen krankheitsbeeinflussenden Effekt verantwortlich gemacht werden kann. Es ist dementsprechend sinnvoll, sich bei der Auswahl der zu typisierenden Polymorphismen nicht allein an den Gengrenzen zu orientieren, sondern die Struktur der LD-Blöcke als Leitfaden zu benutzen.

Die Informationen aus diesem Abschnitt lassen sich ohne weiteres auf das konkrete Beispiel des in der vorliegenden Arbeit untersuchten eNOS-Gens anwenden. Abbildung 10.5 zeigt eine 200kb-Region um das Gen, wobei die roten Dreiecksstrukturen das LD der Region anhand des Koeffizienten D' darstellen (s.Abb 10.5).

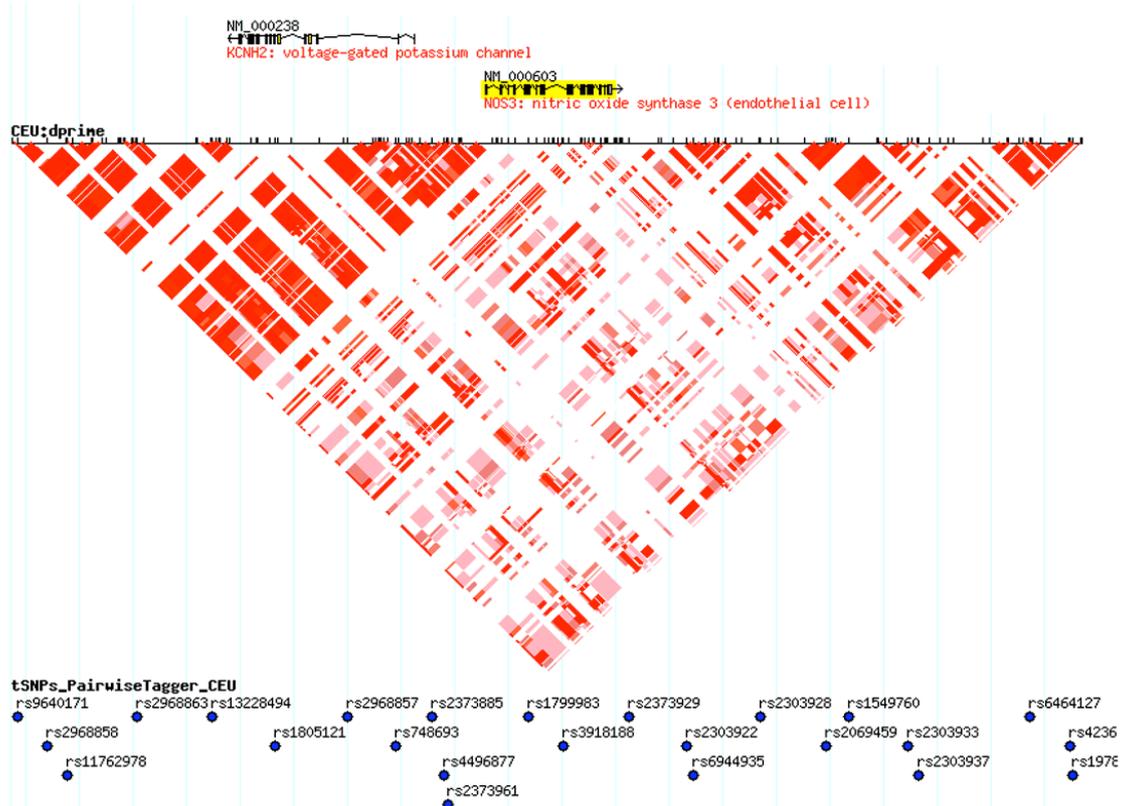


Abb. 10.5: Darstellung des LD einer 200kb großen genomischen Region um das Gen NOS3 mit Hilfe des Genombrowsers der HapMap-Homepage [171]. Die Graphik zeigt das LD anhand des Koeffizienten D' . Im oberen Teil der Abbildung ist das Gen NOS3 gelb unterlegt zu erkennen, daneben das in unmittelbarer Nachbarschaft gelegene Gen KCN2, welches den Kalium-Kanal I_{Kr} kodiert. Im Hauptteil der Graphik sind die Blockstrukturen des Linkage Disequilibriums dargestellt; man erkennt, dass die Blöcke die Gengrenzen überschreiten. Im unteren Teil der Abbildung repräsentieren die blauen Punkte einen Teil der htSNPs dieser Region. Genauere Erläuterungen im Text.

Bei Anwendung der erwähnten Kriterien mit einer Grenze von $r^2=0,8$ und einer Frequenz des Minor Allels von 10% wäre hier die Genotypisierung von 40 Polymorphismen nötig geworden. Diese Zahl hätte alle htSNPs der ausgewählten Region umfasst und zusätzlich die nicht-synonym kodierenden Varianten des eNOS-Gens eingeschlossen. Diese wären theoretisch bereits durch die htSNPs abgedeckt. Die Restwahrscheinlichkeit wird dadurch umgangen, einen Effekt dieser potentiell relevanten Genvarianten durch die nicht 100%ige Abbildung der Region, die mit der Grenze von $r^2=1$ möglich gewesen wäre, zu übersehen. Betrachtet man die Vielzahl möglicher kausaler SNPs in dieser verhältnismäßig kleinen Genomregion, wird deutlich, dass beim Fund einer positiven Assoziation bei Typisierung nur

einer einzelnen Variante ein Zufallstreffer vorliegen muss. Dies wird nur dadurch abgeschwächt, dass für den hier untersuchten p.E298D-Polymorphismus funktionelle Daten verfügbar sind, die die a priori-Wahrscheinlichkeit erhöhen, einen Effekt aufzudecken.

Betrachtet man im vorliegenden Fall eine weitere Tatsache, so wird die Wahrscheinlichkeit eines kausalen Effekts des untersuchten SNPs erneut niedriger: Es besteht die Möglichkeit, dass der gefundene Effekt nicht auf das eNOS-Gen zurückzuführen ist. In unmittelbarer Nachbarschaft des Gens NOS3 befindet sich das Gen KCNH2, welches die α -Untereinheit der schnellen Komponente des als delayed rectifier bekannten Kalium-Kanals I_{Kr} kodiert [91]. Wie in der Abb. 9.5 oben zu erkennen ist, überschneiden sich die LD-Blöcke beider Gene maßgeblich. KCNH2 konnte bisher nicht mit AF in Verbindung gebracht werden. Das kodierte Protein wird jedoch im menschlichen Herz exprimiert [190]. Mutationen und common variants des Gen sind nachweislich beteiligt an der Genese anderer Formen kardialer Arrhythmien, namentlich des Long-QT-Syndrom [35; 137; 149]. Diese Umstände lassen KCNH2 als wichtiges weiteres Kandidatengen auch für die Entstehung von Vorhofflimmern erscheinen.

Nach Ausführung aller beschriebenen Limitationen dieser Arbeit muss abschließend auch der technische Ablauf der Genotypisierung kritisch hinterfragt werden. Eine solch große, wengleich zu bewältigende Zahl an SNPs, die bei Anwendung der eben beschriebenen Auswahlkriterien zusammenkäme, mit der in der vorliegenden Untersuchung verwendeten TaqMan-Technik zu typisieren, wäre sehr aufwändig und deshalb sowohl aus zeitlichen Gründen als auch aufgrund finanzieller Erwägungen nicht sinnvoll. Die Methode an sich hat selbstverständlich weiter ihre Einsatzberechtigung, wenn sich technisch bedingt einzelne Polymorphismen mit anderen Techniken nicht bestimmen lassen, oder nur einige wenige SNPs typisiert werden sollen.

Eine zeitgemäße und effiziente Methode, eine größere Anzahl an SNPs zu genotypisieren, stellt die sog. matrix-assisted laser-desorption / ionisation time-of-flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF) dar [151]. Die Technik wurde ursprünglich für die Untersuchung von Proteinen entwickelt [88]. Weiterentwicklungen erhöhten die erreichte Auflösung der Signale enorm und erlauben heute den Einsatz auch bei im Vergleich zu Proteinen sehr viel kleineren DNA-Molekülen, so dass sich insbesondere kleine DNA-Veränderungen wie SNPs sehr gut zur Anwendung eignen [19; 31]. Hier ist die Massenspektrometrie konventionellen, elektrophoretischen oder Fluoreszenz-basierten Methoden v.a. in punkto Geschwindigkeit und Durchsatzvolumen weit überlegen [30; 148]. Der exakte Ablauf der physikalischen Prozesse

ist bis heute nicht endgültig verstanden. Prinzipiell beruht die MALDI-TOF jedoch darauf, dass durch Laser-Beschuß einzeln positiv oder negativ geladene Ionen aus einer Matrix herausgelöst werden. Diese Ionen werden dann in einem elektrischen Feld beschleunigt und fliegen durch eine, je nach Gerätetyp 0,5 bis 1,5 Meter lange, evakuierte Röhre. Abhängig von Masse und Ladung wird für diese Flugstrecke eine unterschiedlich lange Zeit benötigt, die erstens messbar und zweitens für die einzelnen Basen der Nukleinsäuren charakteristisch ist. Die folgende Abbildung soll die Methode der MALDI-TOF graphisch veranschaulichen (s. Abb. 10.6).

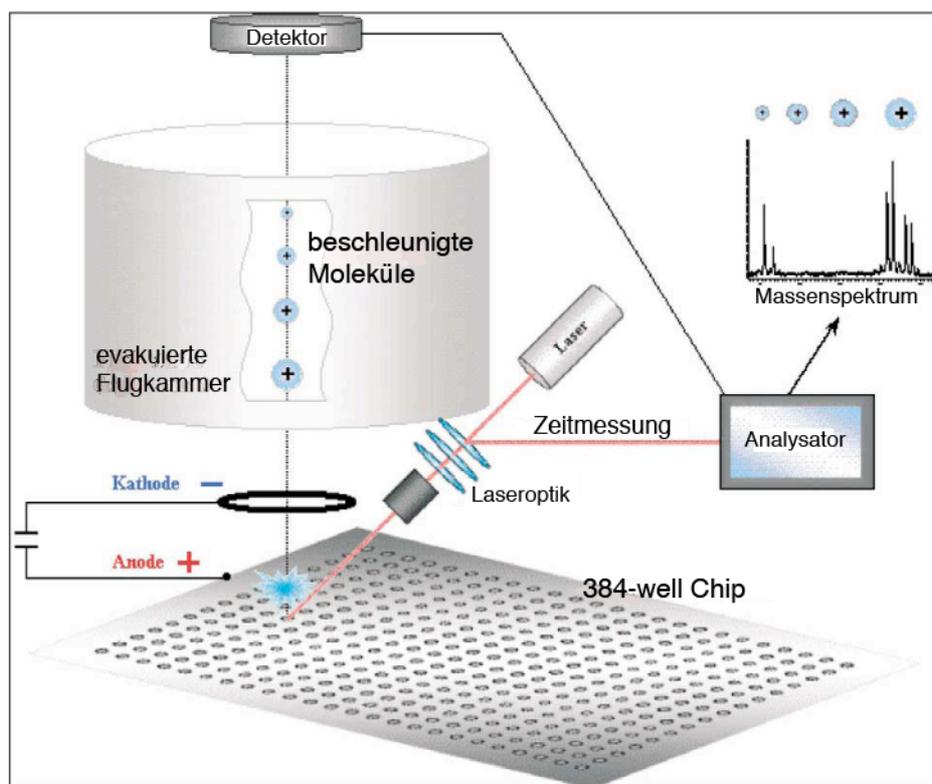


Abb. 10.6: Physikalische Grundzüge der MALDI-TOF Massenspektrometrie:
 Ein Objekt, hier ein 384-well-Chip wird well für well von einem Laser beschossen. Die dadurch freigesetzten Moleküle werden durch Hochspannung beschleunigt und durchfliegen eine evakuierte Kammer. Je nach Molekülgröße ist die Flugzeit verschieden und kann gemessen werden, wenn die Moleküle den Detektor erreichen. Im Analysator können die Massenspektren der Teilchen analysiert werden. Da im konkreten Fall verschiedene Allele Teilchen mit unterschiedlichem Gewicht freisetzen, können die Genotypen bestimmt werden. Durch Verfeinerung des Detektors können so mehrere Genotypen pro well erfasst werden (sog. Multiplexe). Weitere Erläuterungen im Text. (Abb. nach [151]).

Das Massenspektrum möglicher zu untersuchender DNA-Sequenzen reicht von ca. 1000 bis 7000 Da, was in etwa Oligonukleotiden zwischen drei und 25 Basen entspricht [124]. Der Einsatz spezieller Termination-Mix-Reagenzien, wie sie beispielsweise von der Firma Sequenom angeboten werden, ermöglicht die Durchführung von Multiplex-Analysen (iPlex). Dabei können in einem einzelnen well einer Reaktionsplatte mehrere SNPs gleichzeitig genotypisiert werden. Aktuell ist ein Plexgrad von 29 möglich, d.h. 29 verschiedene SNPs pro well können bestimmt werden. Standard ist dabei die Verwendung von Reaktionsplatten im 384er-Format. Bei insgesamt acht Positiv- und Negativkontrollen pro Platte können so von 376 Patienten 29 SNPs gleichzeitig untersucht werden [83; 84; 85]. Bis zur Durchführung der hier beschriebenen Genotypenanalyse sind etliche vorbereitende Schritte nötig, die in den drei zitierten Publikationen beschrieben werden: Mittels einer herkömmlichen PCR-Reaktion, die in jedem well Primerpaare für alle zu untersuchenden Polymorphismen enthält, werden die entsprechenden DNA-Abschnitte amplifiziert. Anschließend müssen mittels einer sog. shrimp alkaline phosphatase-Reaktion (SAP-Reaktion) die Phosphatgruppen aller noch in der Reaktionslösung übriggebliebenen Deoxynukleotide (dNTPs) degradiert werden. Dies ist nötig, um zu verhindern, dass es in der folgenden Extensionsreaktion, für die z.T. PCR-ähnliche Inkubationsschritte nötig sind, zu einer weiteren, unerwünschten Amplifikation der PCR-Produkte kommt. Für diese anschließende Single Base-Extension-Reaktion (SBE-Reaktion) ist der Zusatz sog. Extensionsprimer im hohen Überschuss nötig. Dabei handelt es sich um Oligonukleotide mit oben beschriebener Länge zwischen drei und 25 bp, die exakt und im verwendeten Ansatz einzigartig zur zu untersuchenden DNA-Sequenz komplementär sind. Weiterhin muss die Sequenz so mit der template-DNA hybridisieren, dass der zu untersuchende SNP genau eine Basenposition nach Ende des hybridisierten Oligonukleotids positioniert ist. Dadurch besteht der Unterschied zweier Allele später in genau einer Base, die je nach Genotyp das eine oder andere Allel des untersuchten SNPs tragen kann. Der Massenunterschied, den die beiden Stränge aufweisen, je nachdem welche Base an den Extensionsprimer bindet, kann mittels der Massenspektrometrieanalyse in den meisten Fällen zweifelsfrei detektiert werden. So kann unterschieden werden, ob die untersuchte Probe heterozygot oder homozygot für das eine oder andere Allel ist. Die nötige Hybridisierung von Extensionsprimer und template-DNA erfolgt während der SBE-Reaktion. Nach Beendigung dieser Inkubationsreaktion müssen freie Ionen mit Hilfe eines Ionenfängerharzes aus dem Ansatz entfernt werden. Es folgt dann der Vorgang des sog. spotting. Hierbei wird Roboterunterstützt eine Flüssigkeitsmenge im nanoliter-Bereich aus den fertigen Ansätzen auf einen Chip pipettiert, der in etwa die Größe einer handelsüblichen Speicherkarte für digitale

Photoapparate hat. Auf einem Chip finden dabei alle Proben der 384er-Platte Platz. Liegt die amplifizierte und wie beschrieben behandelte DNA auf dem Chip vor, kann dieser in das Massenspektrometer eingesetzt werden und die oben dargestellte MALDI-TOF-Analyse gestartet werden. Der weitere Vorgang läuft computergesteuert automatisch ab und liefert direkt die Genotypen der jeweils untersuchten SNPs. Die folgende Abbildung zeigt einen Screenshot der Auswertungssoftware (s. Abb. 10.7).

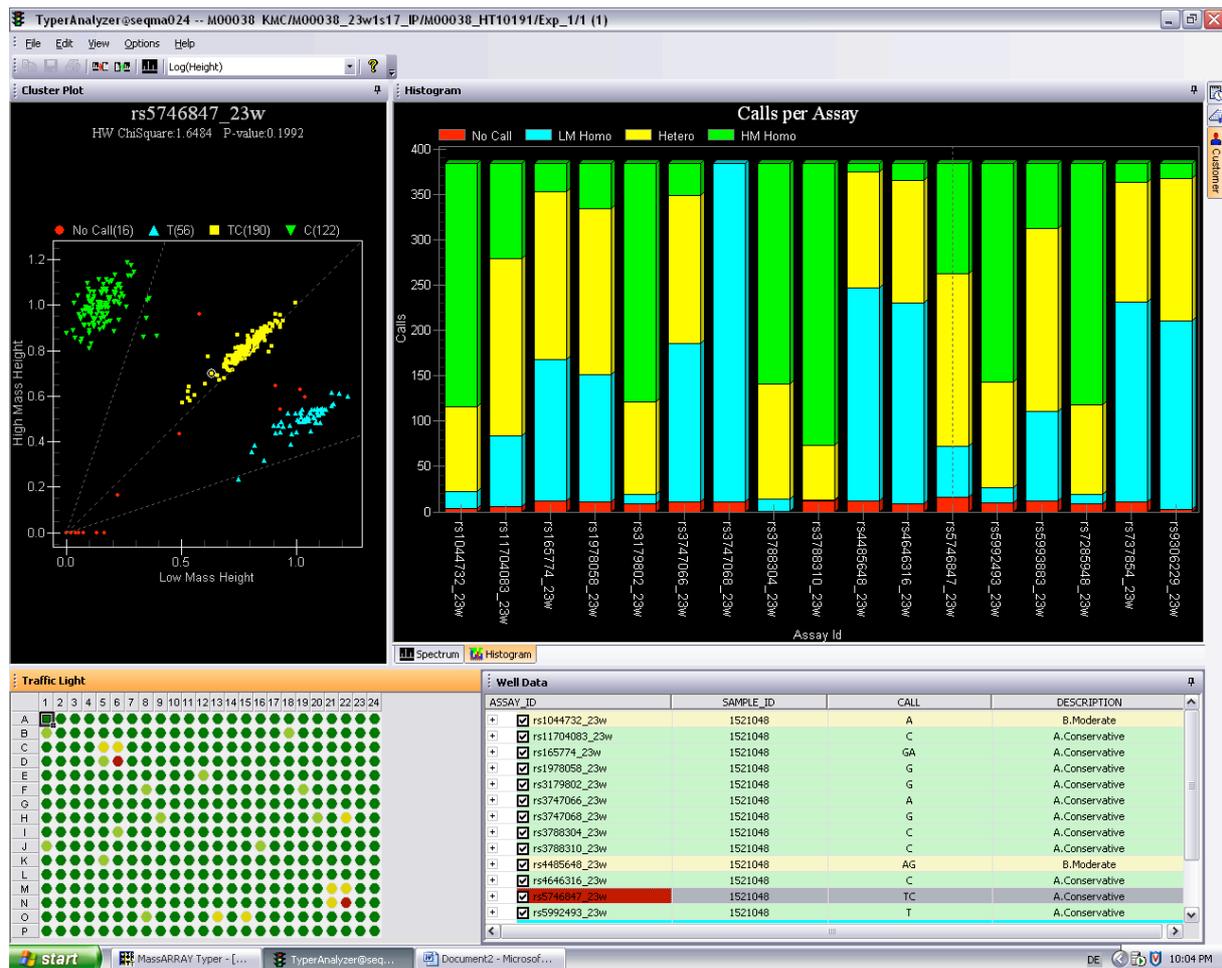


Abb. 10.7: Die Abbildung zeigt einen Screenshot der Auswertungssoftware der Firma Sequenom.

Im konkreten Fall wurde die Analyse als 17-plex durchgeführt, d.h. pro well der 384er-Platte wurden 17 SNPs genotypisiert. Das Fenster links unten gibt einen Überblick über die gesamte Platte und lässt grob die Erfolgsrate der Genotypisierung abschätzen. Das Fenster rechts oben zeigt die Verhältnisse der Allele für alle untersuchten Genotypen. Durch Anwählen einer Säule, ergo eines SNPs, zeigt das Fenster links oben die Cluster, in die die einzelnen Proben fallen. Durch entsprechende logarithmische Darstellung erkennt man leicht die jeweiligen Gruppen aus Heterozygoten sowie Homozygoten für das eine oder andere Allel. Rechts unten finden sich Detailangaben zu jedem einzelnen Genotyp.

Mit der hier beschriebenen Methode lassen sich pro 384er-Platte weit über 10000 SNPs auf einmal bestimmen, ohne dass ein Arbeitsaufwand nötig wäre, der weit über den herkömmlicher Techniken hinausgeht. Damit ist es vergleichsweise einfach, genetische Assoziationsstudien im Fall-Kontroll-Design durchzuführen, die den heutigen Anforderungen hinsichtlich der Auswahl und Anzahl der untersuchten SNPs sowie der Zahl der Studienteilnehmer genügt.

Unter Berücksichtigung aller Limitationen, die in diesem Abschnitt 10.2 ausgeführt wurden, ist es nötig, die in der vorliegenden Studie gefundenen Ergebnisse zu überprüfen und zu replizieren. Dadurch könnte der Effekt im eNOS-Gen verlässlicher bestimmt und gleichzeitig ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem Einfluss auf die Entstehung von Vorhofflimmern nur um einen LD-bedingten Nebeneffekt eines benachbarten Gens handelt.

11. Zusammenfassung

11.1 Zusammenfassung deutsch

EINLEITUNG: Vorhofflimmern (VHF, AF) ist mit einer Prävalenz von 1% die häufigste Herzrhythmusstörung. Im Alter steigt diese Prävalenz bis auf 11% bei Männern. Morbidität und Mortalität sind deutlich erhöht. Viele Erkrankungen wie Hypertonie oder valvuläre Herzkrankungen prädisponieren zur Entstehung von AF. Pathogenetisch fibrosiert atriales Gewebe und behindert eine normale Reizleitung. Dies begünstigt die ektope Reizbildung, die durch Reentrymechanismen aufrechterhalten wird.

In letzter Zeit wurde bei AF eine starke genetische Komponente festgestellt. Diese zeigt sich in Familien, in denen VHF gehäuft auftritt. Ursächlich wurden chromosomale Loci sowie KCNQ1-, KCNE2- und KCNJ2-Mutationen beschrieben. Eine hohe Heritabilität auch der gewöhnlichen Form von AF belegt u.a die Framingham Offspring Study. Statt seltener Mutationen hält man hier häufige Genvarianten, insbesondere SNPs für kausal. Solche wurden in KCNE1, KCNE5 und in den Genen für ACE, Angiotensinogen und G-Protein β_3 beschrieben. Der Zellmediator NO wird von NO-Synthasen produziert. Neben einer induzierbaren (iNOS) existieren konstitutive endotheliale und neuronale Isoformen (eNOS, nNOS). Letztere werden kardial exprimiert und liegen intrazellulär voneinander getrennt vor. NO aus der Quelle dieser beiden Proteine beeinflusst auf verschiedenen Signalwegen Erregungs- und Kontraktionsabläufe am Herzen. Für beide Proteine konnte gezeigt werden, dass Kardiomyozyten in Genknockout-Modellen Arrhythmieäquivalente zeigen. eNOS^{-/-}-Mäuse entwickelten in einem Versuch auch Vorhofflimmern. In der vorliegenden Arbeit folgten wir der Hypothese, dass die häufigen Polymorphismen eNOS-p.E298D (rs1799983) sowie c.3391C>T (rs1047735) und c.-84G>A aus nNOS mit dem Auftreten von Vorhofflimmern assoziiert sind.

PATIENTEN und METHODEN: Insgesamt 657 Patienten mit AF und 672 Kontrollprobanden wurden in die Fall-Kontroll-Studie eingeschlossen. Alle Studienteilnehmer wurden in der Klinik für Herz- und Kreislauferkrankungen des Deutschen Herzzentrums München sowie der I. und II. Medizinischen Klinik der Krankenhauses rechts der Isar der Technischen Universität München rekrutiert. Patienten mit starken Risikofaktoren für AF wurden ausgeschlossen.

Die Probanden-DNA wurde aus Vollblut-Leukozyten extrahiert; die Genotypisierung erfolgte mittels TaqMan-Assays. Dazu wird die genomische Region um den zu untersuchenden SNP mittels PCR amplifiziert. Dem Ansatz werden allelspezifische Oligonukleotidsonden zugegeben, die bei entsprechender Anregung ein typisches Lichtspektrum emittieren. Anfangs

sind diese chemisch blockiert; Spaltung der Sonden durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase hebt diese Blockade auf und initiiert so die Lichtemission. Die Intensität ist proportional zur Menge des jeweiligen Allels. Auf diesem Wege läßt sich der Genotyp des jeweiligen Probanden bestimmen.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels SPSS und STATA. Es wurde die Genotypenverteilung in der Gesamtpopulation mit AF assoziiert. Zusätzlich wurden Assoziationen für zwei vordefinierte Subgruppen von jungen Patienten bis einschließlich 60 Jahren sowie weiblichen Probanden berechnet. Die Genotypenverteilung aller Kontrollgruppen war im Hardy-Weinberg-Equilibrium. Die Berechnungen der Assoziationen erfolgten unter Annahme eines log-additiven Vererbungsmodells.

ERGEBNISSE: Für den Polymorphismus p.E298D konnte in der Gesamtgruppe ein Trend hin zu einer Assoziation mit AF festgestellt werden (OR 1,15; p=0,094). In den Subgruppen der Frauen (OR 1,38; p=0,030) und Jungen (OR 1,41; p=0,029) war diese Assoziation signifikant. Für beide Varianten des Gens für nNOS konnten keine signifikanten Assoziationen nachgewiesen werden (p-Werte zw. 0,163 und 0,999).

DISKUSSION: In der vorliegenden Studie konnten wir eine signifikante Assoziation zwischen VHF und p.E298D bei Jungen sowie bei Frauen nachweisen. In der unstratifizierten Gesamtpopulation war ein Trend in dieselbe Richtung zu erkennen, verfehlte jedoch das Signifikanzniveau. Dies ist am ehesten auf eine zu kleine Studienpopulation zurückzuführen; die statistische Power lag bei nur ca. 50%. Für die beiden SNPs im Gen für nNOS konnte keine signifikante Assoziation gezeigt werden.

Pathophysiologisch ist am ehesten eine Beeinträchtigung G-Protein regulierter Calcium-Kanäle durch erniedrigte NO-Spiegel anzunehmen. Das allelische 298D-Protein wird durch saure Hydrolyse verstärkt abgebaut. Dadurch sinkt die Bioverfügbarkeit von NO.

Bei der gegebenen schwachen Assoziation muss auch in Betracht gezogen werden, dass der eigentliche Effekt in einer anderen, nicht untersuchten Genvariante zu suchen ist, die sich mit E298D in nicht perfektem Linkage-Disequilibrium (LD) befindet.

Bei der Interpretation der Studie müssen weiterhin einige Limitationen beachtet werden. Inhomogenitäten zwischen Fall- und Kontrollgruppe hätten durch besseres matching oder durch Ersetzen der Kontrollen durch ein Allgemeinbevölkerungs-basiertes Kollektiv vermieden werden können. Die gefundene Assoziation hätte in einer zweiten, unabhängigen Population repliziert werden müssen. Anstatt einen einzelnen Polymorphismus in einem Gen zu genotypisieren, wäre es nach heutigen Gesichtspunkten angebracht gewesen, das entsprechende Gen und seine genomische Region systematisch, LD-basiert zu untersuchen.

11.2 Zusammenfassung englisch

INTRODUCTION: Atrial fibrillation (AF) is the most common arrhythmia with a prevalence of 1%. This prevalence reaches 11% in older males. Both morbidity and mortality are significantly increased. A number of diseases like hypertension or valvular affections predispose to the development of AF. Pathogenic background is fibrosis of atrial tissue which affects a normal cardiac conduction. This promotes ectopic excitation which is maintained by re-entry mechanisms.

Recently a strong genetic component of AF has been detected. This has been shown in families where AF occurs as a monogenic disorder. Causally, chromosomal loci and mutations in *KCNQ1*, *KCNE2* and *KCNJ2* have been described. A high heritability of common AF has been shown in the Framingham Offspring Study and others. Instead of rare mutations, here common variants such as SNPs are considered causal and have been described in *KCNE1*, *KCNE5* and the genes encoding ACE, angiotensinogen and G-protein β_3 .

The mediator NO is produced by NO-synthases. Besides an inducible isoform (iNOS) exist the constitutive endothelial and neuronal ones (eNOS, nNOS). The latter two are expressed in the heart and regulated intracellularly by spatial confinement. NO from the source of these proteins influences cardiac excitation and conduction via different pathways. For both proteins it has been shown in gene-knockout models that cardiomyocytes present with arrhythmia-equivalents. eNOS^{-/-}-mice also developed AF in one study. In our study we hypothesized that the common polymorphisms eNOS-p.E298D (rs1799983) as well as c.3391C>T (rs1047735) and c.-84G>A of nNOS are associated with AF.

PATIENTS and METHODS: Totally 657 patients with AF and 672 control probands were included in this case-control-study. All participants were recruited at the Deutsches Herzzentrum München and the I. and II. Medizinische Klinik of the rechts der Isar Hospital of the Technische Universität München. Patients with strong risk factors for AF were excluded.

The proband-DNA was extracted from whole-blood leucocytes; genotyping was performed using TaqMan assays. To do so, a genomic region around the variant of interest is PCR-amplified. Allele-specific oligonucleotide probes are added to the mix which, upon proper excitation, emit a specific spectrum of light. Initially these probes are chemically blocked; cleavage of the probes by the Taq-polymerase's 5'-3'-exonuclease activity neutralizes this blockage and therewith initiates the emission of light. The light-intensity is measurable and

proportional to the amount of the respective allele. Via this link the probands can be genotyped.

Statistical analysis was performed using SPSS and STATA. The distribution of genotypes in the entire study population was associated with AF. Additionally associations for two predefined subgroups of young individuals aged 60 and below and females were calculated. The distribution of all control groups did not deviate from the Hardy-Weinberg-Equilibrium. We calculated associations for a log-additive model of inheritance.

RESULTS: For the p.E298D-variant we could show a trend towards an association with AF (OR 1.15; $p=0.094$). In the subgroups of females (OR 1.38; $p=0.030$) and young participants (OR 1.41; $p=0.029$) this association was significant. For both variants of the nNOS-gene no significant associations was shown (p -values between 0.163 and 0.999)

DISCUSSION: In the present study we could show a significant association between AF and p.E298D in young participants and females. In the unstratified study-population a trend towards the same direction was detectable, however, failed to reach significant levels. Most presumably this is due to too small a study sample size. For both the SNPs of the nNOS gene no significant associations could be shown.

Pathophysiologically an impairment of G-protein regulated Calcium-channels via reduced NO-levels is most probable. The allelic 298D-protein is cleaved predominantly by acidic hydrolysis. Given the weak association it has to be taken into account that the real effect could be found in another, non-examined genetic variant that is not in perfect linkage-disequilibrium (LD) with E298D.

In interpreting the results of this study one has to consider a number of limitations. Inhomogeneities between cases and controls should have been matched more efficiently or controls should have been replaced by a population-based sample. A once-found association should have been replicated in a second, unrelated population. Instead of genotyping only one single polymorphisms, according to today's understanding the respective gene and its respective genomic region should have been analyzed systematically and LD-based.

12. Literaturverzeichnis

1. **Abu-Soud H.M., Loftus M., und Stuehr D.J.,**
Subunit dissociation and unfolding of macrophage NO synthase: relationship between enzyme structure, prosthetic group binding, and catalytic function. *Biochemistry* 34 (1995), 11167-11175.
2. **Afonina I., Zivarts M., Kutyavin I., Lukhtanov E., Gamper H., und Meyer R.B.,**
Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res.* 25 (1997), 2657-2660.
3. **Akey J.M., Zhang G., Zhang K., Jin L., und Shriver M.D.,**
Interrogating a high-density SNP map for signatures of natural selection. *Genome Res.* 12 (2002), 1805-1814.
4. **Allessie M.A., Bonke F.I., und Schopman F.J.,**
Circus movement in rabbit atrial muscle as a mechanism of tachycardia. III. The "leading circle" concept: a new model of circus movement in cardiac tissue without the involvement of an anatomical obstacle. *Circ. Res.* 41 (1977), 9-18.
5. **Altshuler D., Brooks L.D., Chakravarti A., Collins F.S., Daly M.J., und Donnelly P.,**
A haplotype map of the human genome. *Nature* 437 (2005), 1299-1320.
6. **Applied Biosystems / PE Corporation,**
ABI PRISM 7700 Sequence Detection System. User Bulletin (2000), 1-16.
7. **Applied Biosystems / PE Corporation,**
Primer Express Version 1.5 and TaqMan MGB probes for Allelic Discrimination. User Bulletin 4317594 (2000), 1-28.
8. **Applied Biosystems / PE Corporation,**
TaqMan Universal PCR Master Mix. Protocol 4304449 Rev. C (2002), 1-60.
9. **Arking D.E., Pfeufer A., Post W., Kao W.H., Newton-Cheh C., Ikeda M., West K., Kashuk C., Akyol M., Perz S., Jalilzadeh S., Illig T., Gieger C., Guo C.Y., Larson M.G., Wichmann H.E., Marban E., O'donnell C.J., Hirschhorn J.N., Kaab S., Spooner P.M., Meitinger T., und Chakravarti A.,**
A common genetic variant in the NOS1 regulator NOS1AP modulates cardiac repolarization. *Nat. Genet.* 38 (2006), 644-651.
10. **Arnar D.O., Thorvaldsson S., Manolio T.A., Thorgeirsson G., Kristjansson K., Hakonarson H., und Stefansson K.,**
Familial aggregation of atrial fibrillation in Iceland. *Eur. Heart J.* 27 (2006), 708-712.
11. **Ashley E.A., Sears C.E., Bryant S.M., Watkins H.C., und Casadei B.,**
Cardiac nitric oxide synthase 1 regulates basal and beta-adrenergic contractility in murine ventricular myocytes. *Circulation* 105 (2002), 3011-3016.

12. **Awata T., Neda T., Iizuka H., Kurihara S., Ohkubo T., Takata N., Osaki M., Watanabe M., Nakashima Y., Sawa T., Inukai K., Inoue I., Shibuya M., Mori K., Yoneya S., and Katayama S.,**
Endothelial nitric oxide synthase gene is associated with diabetic macular edema in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 27 (2004), 2184-2190.
13. **Balligand J.L.,**
"La Donna e Mobile...": is cardiac neuronal nitric oxide synthase such a disconcerting enzyme? *Circulation* 112 (2005), 3668-3671.
14. **Balligand J.L. and Cannon P.J.,**
Nitric oxide synthases and cardiac muscle. Autocrine and paracrine influences. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17 (1997), 1846-1858.
15. **Balligand J.L., Kobzik L., Han X., Kaye D.M., Belhassen L., O'Hara D.S., Kelly R.A., Smith T.W., and Michel T.,**
Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 270 (1995), 14582-14586.
16. **Barouch L.A., Harrison R.W., Skaf M.W., Rosas G.O., Cappola T.P., Kobeissi Z.A., Hobai I.A., Lemmon C.A., Burnett A.L., O'Rourke B., Rodriguez E.R., Huang P.L., Lima J.A., Berkowitz D.E., and Hare J.M.,**
Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature* 416 (2002), 337-339.
17. **Benjamin E.J., Levy D., Vaziri S.M., D'Agostino R.B., Belanger A.J., and Wolf P.A.,**
Independent risk factors for atrial fibrillation in a population-based cohort. The Framingham Heart Study. *JAMA* 271 (1994), 840-844.
18. **Bredt D.S., Hwang P.M., Glatt C.E., Lowenstein C., Reed R.R., and Snyder S.H.,**
Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 351 (1991), 714-718.
19. **Brown R.S. and Lennon J.J.,**
Mass resolution improvement by incorporation of pulsed ion extraction in a matrix-assisted laser desorption/ionization linear time-of-flight mass spectrometer. *Anal. Chem.* 67 (1995), 1998-2003.
20. **Brugada R., Tapscott T., Czernuszewicz G.Z., Marian A.J., Iglesias A., Mont L., Brugada J., Girona J., Domingo A., Bachinski L.L., and Roberts R.,**
Identification of a genetic locus for familial atrial fibrillation. *N. Engl. J. Med.* 336 (1997), 905-911.
21. **Cardullo R.A., Agrawal S., Flores C., Zamecnik P.C., and Wolf D.E.,**
Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85 (1988), 8790-8794.
22. **Cardullo R.A. and Parpura V.,**
Fluorescence resonance energy transfer microscopy: theory and instrumentation. *Methods Cell Biol.* 72 (2003), 415-430.

23. **Casas J.P., Bautista L.E., Humphries S.E., und Hingorani A.D.,**
Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic heart disease: meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects. *Circulation* 109 (2004), 1359-1365.
24. **Champion H.C., Georgakopoulos D., Takimoto E., Isoda T., Wang Y., und Kass D.A.,**
Modulation of in vivo cardiac function by myocyte-specific nitric oxide synthase-3. *Circ. Res.* 94 (2004), 657-663.
25. **Chen S.A., Hsieh M.H., Tai C.T., Tsai C.F., Prakash V.S., Yu W.C., Hsu T.L., Ding Y.A., und Chang M.S.,**
Initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating from the pulmonary veins: electrophysiological characteristics, pharmacological responses, and effects of radiofrequency ablation. *Circulation* 100 (1999), 1879-1886.
26. **Chen Y., Panda K., und Stuehr D.J.,**
Control of nitric oxide synthase dimer assembly by a heme-NO-dependent mechanism. *Biochemistry* 41 (2002), 4618-4625.
27. **Chen Y.H., Xu S.J., Bendahhou S., Wang X.L., Wang Y., Xu W.Y., Jin H.W., Sun H., Su X.Y., Zhuang Q.N., Yang Y.Q., Li Y.B., Liu Y., Xu H.J., Li X.F., Ma N., Mou C.P., Chen Z., Barhanin J., und Huang W.,**
KCNQ1 gain-of-function mutation in familial atrial fibrillation. *Science* 299 (2003), 251-254.
28. **Choate J.K., Danson E.J., Morris J.F., und Paterson D.J.,**
Peripheral vagal control of heart rate is impaired in neuronal NOS knockout mice. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 281 (2001), H2310-H2317.
29. **Cogliati T., Good D.J., Haigney M., Delgado-Romero P., Eckhaus M.A., Koch W.J., und Kirsch I.R.,**
Predisposition to arrhythmia and autonomic dysfunction in *Nhlh1*-deficient mice. *Mol. Cell Biol.* 22 (2002), 4977-4983.
30. **Cohen A.S., Najarian D.R., Paulus A., Guttman A., Smith J.A., und Karger B.L.,**
Rapid separation and purification of oligonucleotides by high-performance capillary gel electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85 (1988), 9660-9663.
31. **Colby S.M., King T.B., Reilly J.P., und Lubman D.M.,**
Improving the resolution of matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass spectrometry by exploiting the correlation between ion position and velocity. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 8 (1994), 865-868.
32. **Cole C.R., Blackstone E.H., Pashkow F.J., Snader C.E., und Lauer M.S.,**
Heart-rate recovery immediately after exercise as a predictor of mortality. *N. Engl. J. Med.* 341 (1999), 1351-1357.
33. **Collins F.S., Morgan M., und Patrinos A.,**
The Human Genome Project: lessons from large-scale biology. *Science* 300 (2003), 286-290.

34. **Colombo M.G., Andreassi M.G., Paradossi U., Botto N., Manfredi S., Masetti S., Rossi G., Clerico A., und Biagini A.,**
Evidence for association of a common variant of the endothelial nitric oxide synthase gene (Glu298-->Asp polymorphism) to the presence, extent, and severity of coronary artery disease. *Heart* 87 (2002), 525-528.
35. **Crotti L., Lundquist A.L., Insolia R., Pedrazzini M., Ferrandi C., De Ferrari G.M., Vicentini A., Yang P., Roden D.M., George A.L., Jr., und Schwartz P.J.,**
KCNH2-K897T is a genetic modifier of latent congenital long-QT syndrome. *Circulation* 112 (2005), 1251-1258.
36. **Cushny A.R. und Edmunds C.W.,**
Paroxysmal irregularity of the heart and auricular fibrillation. *Am. J. Med. Sci.* 133 (1907), 67-77.
37. **Danson E.J., Choate J.K., und Paterson D.J.,**
Cardiac nitric oxide: emerging role for nNOS in regulating physiological function. *Pharmacol. Ther.* 106 (2005), 57-74.
38. **Danson E.J., Mankia K.S., Golding S., Dawson T., Everatt L., Cai S., Channon K.M., und Paterson D.J.,**
Impaired regulation of neuronal nitric oxide synthase and heart rate during exercise in mice lacking one nNOS allele. *J. Physiol* 558 (2004), 963-974.
39. **Danson E.J. und Paterson D.J.,**
Cardiac neurobiology of nitric oxide synthases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1047 (2005), 183-196.
40. **Darbar D., Herron K.J., Ballew J.D., Jahangir A., Gersh B.J., Shen W.K., Hammill S.C., Packer D.L., und Olson T.M.,**
Familial atrial fibrillation is a genetically heterogeneous disorder. *J. Am. Coll. Cardiol.* 41 (2003), 2185-2192.
41. **Dawson D., Lygate C.A., Zhang M.H., Hulbert K., Neubauer S., und Casadei B.,**
nNOS gene deletion exacerbates pathological left ventricular remodeling and functional deterioration after myocardial infarction. *Circulation* 112 (2005), 3729-3737.
42. **de Bakker P.I., Yelensky R., Pe'er I., Gabriel S.B., Daly M.J., und Altshuler D.,**
Efficiency and power in genetic association studies. *Nat. Genet.* 37 (2005), 1217-1223.
43. **Doris P.A.,**
Hypertension genetics, single nucleotide polymorphisms, and the common disease:common variant hypothesis. *Hypertension* 39 (2002), 323-331.
44. **Droma Y., Hanaoka M., Ota M., Katsuyama Y., Koizumi T., Fujimoto K., Kobayashi T., und Kubo K.,**
Positive association of the endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms with high-altitude pulmonary edema. *Circulation* 106 (2002), 826-830.

45. **Ehrlich J.R., Zicha S., Coutu P., Hebert T.E., und Nattel S.,**
Atrial fibrillation-associated minK38G/S polymorphism modulates delayed rectifier current and membrane localization. *Cardiovasc. Res.* 67 (2005), 520-528.
46. **Einthoven W.,**
Le Télécardiogramme. *Arch. Internat. Physiol.* 4 (1906), 132-164.
47. **Ellinor P.T., Shin J.T., Moore R.K., Yoerger D.M., und MacRae C.A.,**
Locus for atrial fibrillation maps to chromosome 6q14-16. *Circulation* 107 (2003), 2880-2883.
48. **Fairchild T.A., Fulton D., Fontana J.T., Gratton J.P., McCabe T.J., und Sessa W.C.,**
Acidic hydrolysis as a mechanism for the cleavage of the Glu(298)-->Asp variant of human endothelial nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 276 (2001), 26674-26679.
49. **Fazekas T., Liskai G., Bielik H., und Luderitz B.,**
Zur Geschichte des Vorhofflimmerns. *Z. Kardiol.* 92 (2003), 122-127.
50. **Feinberg W.M., Blackshear J.L., Laupacis A., Kronmal R., und Hart R.G.,**
Prevalence, age distribution, and gender of patients with atrial fibrillation. Analysis and implications. *Arch. Intern. Med.* 155 (1995), 469-473.
51. **Feron O., Saldana F., Michel J.B., und Michel T.,**
The endothelial nitric-oxide synthase-caveolin regulatory cycle. *J. Biol. Chem.* 273 (1998), 3125-3128.
52. **Fox C.S., Parise H., D'Agostino R.B., Sr., Lloyd-Jones D.M., Vasan R.S., Wang T.J., Levy D., Wolf P.A., und Benjamin E.J.,**
Parental atrial fibrillation as a risk factor for atrial fibrillation in offspring. *JAMA* 291 (2004), 2851-2855.
53. **Frost L., Vestergaard P., und Mosekilde L.,**
Hyperthyroidism and risk of atrial fibrillation or flutter: a population-based study. *Arch. Intern. Med.* 164 (2004), 1675-1678.
54. **Fuster V., Ryden L.E., Asinger R.W., Cannom D.S., Crijns H.J., Frye R.L., Halperin J.L., Kay G.N., Klein W.W., Levy S., McNamara R.L., Prystowsky E.N., Wann L.S., Wyse D.G., Gibbons R.J., Antman E.M., Alpert J.S., Faxon D.P., Fuster V., Gregoratos G., Hiratzka L.F., Jacobs A.K., Russell R.O., Smith S.C., Klein W.W., Alonso-Garcia A., Blomstrom-Lundqvist C., De Backer G., Flather M., Hradec J., Oto A., Parkhomenko A., Silber S., und Torbicki A.,**
ACC/AHA/ESC guidelines for the management of patients with atrial fibrillation: executive summary. A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines and Policy Conferences (Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Atrial Fibrillation): developed in Collaboration With the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *J. Am. Coll. Cardiol.* 38 (2001), 1231-1266.

55. **Garcia-Cardena G., Martasek P., Masters B.S., Skidd P.M., Couet J., Li S., Lisanti M.P., and Sessa W.C.,**
Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *J. Biol. Chem.* 272 (1997), 25437-25440.
56. **Gensini F., Padeletti L., Fatini C., Sticchi E., Gensini G.F., and Michelucci A.,**
Angiotensin-converting enzyme and endothelial nitric oxide synthase polymorphisms in patients with atrial fibrillation. *Pacing Clin. Electrophysiol.* 26 (2003), 295-298.
57. **Go A.S., Hylek E.M., Phillips K.A., Chang Y., Henault L.E., Selby J.V., and Singer D.E.,**
Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults: national implications for rhythm management and stroke prevention: the AnTicoagulation and Risk Factors in Atrial Fibrillation (ATRIA) Study. *JAMA* 285 (2001), 2370-2375.
58. **Godecke A., Heinicke T., Kamkin A., Kiseleva I., Strasser R.H., Decking U.K., Stumpe T., Isenberg G., and Schrader J.,**
Inotropic response to beta-adrenergic receptor stimulation and anti-adrenergic effect of ACh in endothelial NO synthase-deficient mouse hearts. *J. Physiol* 532 (2001), 195-204.
59. **Grasemann H., Drazen J.M., Deykin A., Israel E., De Sanctis G.T., Pillari A., and Yandava C.H.,**
Simple tandem repeat polymorphisms in the neuronal nitric oxide synthase gene in different ethnic populations. *Hum. Hered.* 49 (1999), 139-141.
60. **Grasemann H., Knauer N., Buscher R., Hubner K., Drazen J.M., and Ratjen F.,**
Airway nitric oxide levels in cystic fibrosis patients are related to a polymorphism in the neuronal nitric oxide synthase gene. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 162 (2000), 2172-2176.
61. **Grasemann H., Yandava C.N., Storm van's G.K., Deykin A., Pillari A., Ma J., Sonna L.A., Lilly C., Stampfer M.J., Israel E., Silverman E.K., and Drazen J.M.,**
A neuronal NO synthase (NOS1) gene polymorphism is associated with asthma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272 (2000), 391-394.
62. **Griffith O.W. and Stuehr D.J.,**
Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu. Rev. Physiol* 57 (1995), 707-736.
63. **Gross S.S. and Levi R.,**
Tetrahydrobiopterin synthesis. An absolute requirement for cytokine-induced nitric oxide generation by vascular smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 267 (1992), 25722-25729.

64. **Hagendorff A., Schumacher B., Kirchhoff S., Luderitz B., und Willecke K.,**
Conduction disturbances and increased atrial vulnerability in Connexin40-deficient mice analyzed by transesophageal stimulation. *Circulation* 99 (1999), 1508-1515.
65. **Haissaguerre M., Jais P., Shah D.C., Takahashi A., Hocini M., Quiniou G., Garrigue S., Le Mouroux A., Le Metayer P., und Clementy J.,**
Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. *N. Engl. J. Med.* 339 (1998), 659-666.
66. **Hardy G.H.,**
Mendelian Proportions in a Mixed Population. *Science* 28 (1908), 49-50.
67. **Hare J.M., Loh E., Creager M.A., und Colucci W.S.,**
Nitric oxide inhibits the positive inotropic response to beta-adrenergic stimulation in humans with left ventricular dysfunction. *Circulation* 92 (1995), 2198-2203.
68. **Harvey W.,**
Exercitatio anatomica de motu cordis et sanguinis in animalibus. (1628),
69. **Hering H.E.,**
Das Elektrokardiogramm des Irregularis perpetuus. *Deutsch. Archiv für Klin. Med.* 94 (1908), 185-204.
70. **Hering H.E.,**
Über das Fehlen der Vorhofzacke (P) im Elektrokardiogramm beim Irregularis perpetuus. *Münch. Med. Wschr.* 57 (1909), 2483-2485.
71. **Hingorani A.D., Liang C.F., Fatibene J., Lyon A., Monteith S., Parsons A., Haydock S., Hopper R.V., Stephens N.G., O'Shaughnessy K.M., und Brown M.J.,**
A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298-->Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation* 100 (1999), 1515-1520.
72. **Hiss R.G. und LAMB L.E.,**
Electrocardiographic findings in 122,043 individuals. *Circulation* 25 (1962), 947-961.
73. **Holla L.I., Schuller M., Buckova D., und Vacha J.,**
Neuronal nitric oxide synthase gene polymorphism and IgE-mediated allergy in the Central European population. *Allergy* 59 (2004), 548-552.
74. **Holland P.M., Abramson R.D., Watson R., und Gelfand D.H.,**
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* 88 (1991), 7276-7280.
75. **Holle R., Happich M., Lowel H., und Wichmann H.E.,**
KORA--a research platform for population based health research. *Gesundheitswesen* 67 Suppl 1 (2005), S19-S25.

76. **Hong K., Piper D.R., Diaz-Valdecantos A., Brugada J., Oliva A., Burashnikov E., Santos-de-Soto J., Grueso-Montero J., Diaz-Enfante E., Brugada P., Sachse F., Sanguinetti M.C., und Brugada R.,**
De novo KCNQ1 mutation responsible for atrial fibrillation and short QT syndrome in utero. *Cardiovasc. Res.* 68 (2005), 433-440.
77. **Immervoll T., Loesgen S., Dutsch G., Gohlke H., Herbon N., Klugbauer S., Dempfle A., Bickeboller H., Becker-Follmann J., Ruschendorf F., Saar K., Reis A., Wichmann H.E., und Wjst M.,**
Fine mapping and single nucleotide polymorphism association results of candidate genes for asthma and related phenotypes. *Hum. Mutat.* 18 (2001), 327-336.
78. **Innis M.A., Myambo K.B., Gelfand D.H., und Brow M.A.,**
DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85 (1988), 9436-9440.
79. **Iwai N., Tago N., Yasui N., Kokubo Y., Inamoto N., Tomoike H., und Shioji K.,**
Genetic analysis of 22 candidate genes for hypertension in the Japanese population. *J. Hypertens.* 22 (2004), 1119-1126.
80. **Jongbloed R., Marcelis C., Velter C., Doevendans P., Geraedts J., und Smeets H.,**
DHPLC analysis of potassium ion channel genes in congenital long QT syndrome. *Hum. Mutat.* 20 (2002), 382-391.
81. **Jorgenson E., Tang H., Gadde M., Province M., Leppert M., Kardia S., Schork N., Cooper R., Rao D.C., Boerwinkle E., und Risch N.,**
Ethnicity and human genetic linkage maps. *Am. J. Hum. Genet.* 76 (2005), 276-290.
82. **Jumrussirikul P., Dinerman J., Dawson T.M., Dawson V.L., Ekelund U., Georgakopoulos D., Schramm L.P., Calkins H., Snyder S.H., Hare J.M., und Berger R.D.,**
Interaction between neuronal nitric oxide synthase and inhibitory G protein activity in heart rate regulation in conscious mice. *J. Clin. Invest* 102 (1998), 1279-1285.
83. **Jurinke C., van den B.D., Cantor C.R., und Koster H.,**
Automated genotyping using the DNA MassArray technology. *Methods Mol. Biol.* 170 (2001), 103-116.
84. **Jurinke C., van den B.D., Cantor C.R., und Koster H.,**
Automated genotyping using the DNA MassArray technology. *Methods Mol. Biol.* 187 (2002), 179-192.
85. **Jurinke C., van den B.D., Cantor C.R., und Koster H.,**
The use of MassARRAY technology for high throughput genotyping. *Adv. Biochem. Eng Biotechnol.* 77 (2002), 57-74.
86. **Kaab S. und Schulze-Bahr E.,**
Susceptibility genes and modifiers for cardiac arrhythmias. *Cardiovasc. Res.* 67 (2005), 397-413.

- 87. Kannel W.B., Abbott R.D., Savage D.D., und McNamara P.M.,**
Epidemiologic features of chronic atrial fibrillation: the Framingham study. *N. Engl. J. Med.* 306 (1982), 1018-1022.
- 88. Karas M. und Hillenkamp F.,**
Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* 60 (1988), 2299-2301.
- 89. Keef K.D., Hume J.R., und Zhong J.,**
Regulation of cardiac and smooth muscle Ca(2+) channels (Ca(V)1.2a,b) by protein kinases. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 281 (2001), C1743-C1756.
- 90. Kent W.J., Sugnet C.W., Furey T.S., Roskin K.M., Pringle T.H., Zahler A.M., und Haussler D.,**
The human genome browser at UCSC. *Genome Res.* 12 (2002), 996-1006.
- 91. Kiehn J., Lacerda A.E., Wible B., und Brown A.M.,**
Molecular physiology and pharmacology of HERG. Single-channel currents and block by dofetilide. *Circulation* 94 (1996), 2572-2579.
- 92. Kishimoto T., Misawa Y., Kaetu A., Nagai M., Osaki Y., Okamoto M., Yoshida S., Kurosawa Y., und Fukumoto S.,**
eNOS Glu298Asp polymorphism and hypertension in a cohort study in Japanese. *Prev. Med.* 39 (2004), 927-931.
- 93. Kolb C., Nurnberger S., Ndrepepa G., Zrenner B., Schomig A., und Schmitt C.,**
Modes of initiation of paroxysmal atrial fibrillation from analysis of spontaneously occurring episodes using a 12-lead Holter monitoring system. *Am. J. Cardiol.* 88 (2001), 853-857.
- 94. Kompetenznetz-Vorhofflimmern,**
Vorhofflimmern - Herz aus dem Takt. www.kompetenznetz-vorhofflimmern.de (01.12.2006), 1-52.
- 95. Koshland D.E., Jr.,**
The molecule of the year. *Science* 258 (1992), 1861.
- 96. Krahn A.D., Manfreda J., Tate R.B., Mathewson F.A., und Cuddy T.E.,**
The natural history of atrial fibrillation: incidence, risk factors, and prognosis in the Manitoba Follow-Up Study. *Am. J. Med.* 98 (1995), 476-484.
- 97. Kubota I., Han X., Opel D.J., Zhao Y.Y., Baliga R., Huang P., Fishman M.C., Shannon R.P., Michel T., und Kelly R.A.,**
Increased susceptibility to development of triggered activity in myocytes from mice with targeted disruption of endothelial nitric oxide synthase. *J. Mol. Cell Cardiol.* 32 (2000), 1239-1248.
- 98. Kutuyavin I.V., Lukhtanov E.A., Gamper H.B., und Meyer R.B.,**
Oligonucleotides with conjugated dihydropyrroloindole tripeptides: base composition and backbone effects on hybridization. *Nucleic Acids Res.* 25 (1997), 3718-3723.

99. **Lai L.P., Lin J.L., and Huang S.K.,**
Molecular genetic studies in atrial fibrillation. *Cardiology* 100 (2003), 109-113.
100. **Lai L.P., Su M.J., Yeh H.M., Lin J.L., Chiang F.T., Hwang J.J., Hsu K.L., Tseng C.D., Lien W.P., Tseng Y.Z., and Huang S.K.,**
Association of the human minK gene 38G allele with atrial fibrillation: evidence of possible genetic control on the pathogenesis of atrial fibrillation. *Am. Heart J.* 144 (2002), 485-490.
101. **Lamas S., Marsden P.A., Li G.K., Tempst P., and Michel T.,**
Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89 (1992), 6348-6352.
102. **Lee L.G., Connell C.R., and Bloch W.,**
Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* 21 (1993), 3761-3766.
103. **Lee W.C.,**
Case-control association studies with matching and genomic controlling. *Genet. Epidemiol.* 27 (2004), 1-13.
104. **Lembo G., De Luca N., Battagli C., Iovino G., Aretini A., Musicco M., Frati G., Pompeio F., Vecchione C., and Trimarco B.,**
A common variant of endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) is an independent risk factor for carotid atherosclerosis. *Stroke* 32 (2001), 735-740.
105. **Leung T.F., Liu E.K., Tang N.L., Ko F.W., Li C.Y., Lam C.W., and Wong G.W.,**
Nitric oxide synthase polymorphisms and asthma phenotypes in Chinese children. *Clin. Exp. Allergy* 35 (2005), 1288-1294.
106. **Levecque C., Elbaz A., Clavel J., Richard F., Vidal J.S., Amouyel P., Tzourio C., Alperovitch A., and Chartier-Harlin M.C.,**
Association between Parkinson's disease and polymorphisms in the nNOS and iNOS genes in a community-based case-control study. *Hum. Mol. Genet.* 12 (2003), 79-86.
107. **Lewis C.M.,**
Genetic association studies: design, analysis and interpretation. *Brief. Bioinform.* 3 (2002), 146-153.
108. **Lewis T., Drury A.N., and Ilescu C.C.,**
A demonstration of circus movement in clinical fibrillation of the auricles. *Heart* 8 (1921), 361-389.
109. **Livak K.J.,**
Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genet. Anal.* 14 (1999), 143-149.
110. **Livak K.J., Flood S.J., Marmaro J., Giusti W., and 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.* 4 (1995), 357-362.

111. **Livak K.J., Marmaro J., and Todd J.A.,**
Towards fully automated genome-wide polymorphism screening. *Nat. Genet.* 9 (1995), 341-342.
112. **Longo M.C., Berninger M.S., and Hartley J.L.,**
Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* 93 (1990), 125-128.
113. **Maisel W.H., Rawn J.D., and Stevenson W.G.,**
Atrial fibrillation after cardiac surgery. *Ann. Intern. Med.* 135 (2001), 1061-1073.
114. **Malhotra S., Poole J., Davis H., Dong Y., Pollock J., Snieder H., and Treiber F.,**
Effects of NOS3 Glu298Asp polymorphism on hemodynamic reactivity to stress: influences of ethnicity and obesity. *Hypertension* 44 (2004), 866-871.
115. **Marsden P.A., Heng H.H., Scherer S.W., Stewart R.J., Hall A.V., Shi X.M., Tsui L.C., and Schappert K.T.,**
Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J. Biol. Chem.* 268 (1993), 17478-17488.
116. **Massion P.B. and Balligand J.L.,**
Modulation of cardiac contraction, relaxation and rate by the endothelial nitric oxide synthase (eNOS): lessons from genetically modified mice. *J. Physiol* 546 (2003), 63-75.
117. **Massion P.B., Feron O., Dessy C., and Balligand J.L.,**
Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. *Circ. Res.* 93 (2003), 388-398.
118. **McMichael J.,**
History of atrial fibrillation 1628-1819 Harvey - de Senac - Laennec. *Br. Heart J.* 48 (1982), 193-197.
119. **McNamara D.M., Holubkov R., Postava L., Ramani R., Janosko K., Mathier M., MacGowan G.A., Murali S., Feldman A.M., and London B.,**
Effect of the Asp298 variant of endothelial nitric oxide synthase on survival for patients with congestive heart failure. *Circulation* 107 (2003), 1598-1602.

- 120. McPherson J.D., Marra M., Hillier L., Waterston R.H., Chinwalla A., Wallis J., Sekhon M., Wylie K., Mardis E.R., Wilson R.K., Fulton R., Kucaba T.A., Wagner-McPherson C., Barbazuk W.B., Gregory S.G., Humphray S.J., French L., Evans R.S., Bethel G., Whittaker A., Holden J.L., McCann O.T., Dunham A., Soderlund C., Scott C.E., Bentley D.R., Schuler G., Chen H.C., Jang W., Green E.D., Idol J.R., Maduro V.V., Montgomery K.T., Lee E., Miller A., Emerling S., Kucherlapati, Gibbs R., Scherer S., Gorrell J.H., Sodergren E., Clerc-Blankenburg K., Tabor P., Naylor S., Garcia D., de Jong P.J., Catanese J.J., Nowak N., Osoegawa K., Qin S., Rowen L., Madan A., Dors M., Hood L., Trask B., Friedman C., Massa H., Cheung V.G., Kirsch I.R., Reid T., Yonescu R., Weissenbach J., Bruls T., Heilig R., Branscomb E., Olsen A., Doggett N., Cheng J.F., Hawkins T., Myers R.M., Shang J., Ramirez L., Schmutz J., Velasquez O., Dixon K., Stone N.E., Cox D.R., Haussler D., Kent W.J., Furey T., Rogic S., Kennedy S., Jones S., Rosenthal A., Wen G., Schilhabel M., Gloeckner G., Nyakatura G., Siebert R., Schlegelberger B., Korenberg J., Chen X.N., Fujiyama A., Hattori M., Toyoda A., Yada T., Park H.S., Sakaki Y., Shimizu N., Asakawa S., Kawasaki K., Sasaki T., Shintani A., Shimizu A., Shibuya K., Kudoh J., Minoshima S., Ramser J., Seranski P., Hoff C., Poustka A., Reinhardt R., und Lehrach H.,**
A physical map of the human genome. *Nature* 409 (2001), 934-941.
- 121. Miyamoto Y., Saito Y., Kajiyama N., Yoshimura M., Shimasaki Y., Nakayama M., Kamitani S., Harada M., Ishikawa M., Kuwahara K., Ogawa E., Hamanaka I., Takahashi N., Kaneshige T., Teraoka H., Akamizu T., Azuma N., Yoshimasa Y., Yoshimasa T., Itoh H., Masuda I., Yasue H., und Nakao K.,**
Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension* 32 (1998), 3-8.
- 122. Moe G.K.,**
On the multiple wavelet hypothesis of atrial fibrillation. *Arch. Int. Pharmacodyn. Therap.* 140 (1962), 183-188.
- 123. Mohan R.M., Heaton D.A., Danson E.J., Krishnan S.P., Cai S., Channon K.M., und Paterson D.J.,**
Neuronal nitric oxide synthase gene transfer promotes cardiac vagal gain of function. *Circ. Res.* 91 (2002), 1089-1091.
- 124. Monforte J.A. und Becker C.H.,**
High-throughput DNA analysis by time-of-flight mass spectrometry. *Nat. Med* 3 (1997), 360-362.
- 125. Moskvina V., Holmans P., Schmidt K.M., und Craddock N.,**
Design of case-controls studies with unscreened controls. *Ann. Hum. Genet.* 69 (2005), 566-576.
- 126. Mülhardt C.,**
Der Experimentator: Molekularbiologie. Spektrum, Akad. Verl. (2002), 21-22.
- 127. Mülhardt C.,**
Der Experimentator: Molekularbiologie. Spektrum, Akad. Verl. (2002), 93-98.

- 128. Mühlhardt C.,**
Der Experimentator: Molekularbiologie. Spektrum, Akad. Verl. (2002), 71-81.
- 129. Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., und Erlich H.,**
Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.
Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 51 Pt 1 (1986), 263-273.
- 130. Mullis K.B. und Faloona F.A.,**
Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.
Methods Enzymol. 155 (1987), 335-350.
- 131. Nakajima H., Nakajima H.O., Salcher O., Dittie A.S., Dembowsky K., Jing S.,
und Field L.J.,**
Atrial but not ventricular fibrosis in mice expressing a mutant transforming growth
factor-beta(1) transgene in the heart. Circ. Res. 86 (2000), 571-579.
- 132. Newton-Cheh C. und Hirschhorn J.N.,**
Genetic association studies of complex traits: design and analysis issues. Mutat. Res.
573 (2005), 54-69.
- 133. Oberti C., Wang L., Li L., Dong J., Rao S., Du W., und Wang Q.,**
Genome-wide linkage scan identifies a novel genetic locus on chromosome 5p13 for
neonatal atrial fibrillation associated with sudden death and variable
cardiomyopathy. Circulation 110 (2004), 3753-3759.
- 134. Olgin J.E. und Verheule S.,**
Transgenic and knockout mouse models of atrial arrhythmias. Cardiovasc. Res. 54
(2002), 280-286.
- 135. Pereira A.C., Sposito A.C., Mota G.F., Cunha R.S., Herkenhoff F.L., Mill J.G.,
und Krieger J.E.,**
Endothelial nitric oxide synthase gene variant modulates the relationship between
serum cholesterol levels and blood pressure in the general population: New
evidence for a direct effect of lipids in arterial blood pressure. Atherosclerosis
(2005),
- 136. Petroff M.G., Kim S.H., Pepe S., Dessy C., Marban E., Balligand J.L., und Sollott
S.J.,**
Endogenous nitric oxide mechanisms mediate the stretch dependence of Ca²⁺ release
in cardiomyocytes. Nat. Cell Biol. 3 (2001), 867-873.
- 137. Pfeufer A., Jalilzadeh S., Perz S., Mueller J.C., Hinterseer M., Illig T., Akyol M.,
Huth C., Schopfer-Wendels A., Kuch B., Steinbeck G., Holle R., Nabauer
M., Wichmann H.E., Meitinger T., und Kaab S.,**
Common variants in myocardial ion channel genes modify the QT interval in the
general population: results from the KORA study. Circ. Res. 96 (2005), 693-
701.
- 138. Pou S., Keaton L., Surichamorn W., und Rosen G.M.,**
Mechanism of superoxide generation by neuronal nitric-oxide synthase. J. Biol. Chem.
274 (1999), 9573-9580.

- 139. Pou S., Pou W.S., Brecht D.S., Snyder S.H., und Rosen G.M.,**
Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 267 (1992), 24173-24176.
- 140. Probst P., Goldschlager N., und Selzer A.,**
Left atrial size and atrial fibrillation in mitral stenosis. Factors influencing their relationship. *Circulation* 48 (1973), 1282-1287.
- 141. Psaty B.M., Manolio T.A., Kuller L.H., Kronmal R.A., Cushman M., Fried L.P., White R., Furberg C.D., und Rautaharju P.M.,**
Incidence of and risk factors for atrial fibrillation in older adults. *Circulation* 96 (1997), 2455-2461.
- 142. QIAGEN,**
Handbuch für QIAamp DNA Mini Kits und QIAamp DNA Blood Mini Kits. (2002), 1-72.
- 143. Rakhit A., Maguire C.T., Wakimoto H., Gehrman J., Li G.K., Kelly R.A., Michel T., und Berul C.I.,**
In vivo electrophysiologic studies in endothelial nitric oxide synthase (eNOS)-deficient mice. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 12 (2001), 1295-1301.
- 144. Ravn L.S., Hofman-Bang J., Dixen U., Larsen S.O., Jensen G., Haunso S., Svendsen J.H., und Christiansen M.,**
Relation of 97T polymorphism in KCNE5 to risk of atrial fibrillation. *Am. J. Cardiol.* 96 (2005), 405-407.
- 145. Riva A. und Kohane I.S.,**
A SNP-centric database for the investigation of the human genome. *BMC. Bioinformatics.* 5 (2004), 33.
- 146. Rothberger C.J. und Winterberg H.,**
Vorhofflimmern und arrhythmia perpetua. *Wien Klin. Wschr.* 22 (1909), 839-844.
- 147. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., und Arnheim N.,**
Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. 1985. *Biotechnology* 24 (1992), 476-480.
- 148. Sanger F., Nicklen S., und Coulson A.R.,**
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 74 (1977), 5463-5467.
- 149. Sanguinetti M.C. und Tristani-Firouzi M.,**
hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature* 440 (2006), 463-469.
- 150. Sasieni P.D.,**
From genotypes to genes: doubling the sample size. *Biometrics* 53 (1997), 1253-1261.

- 151. Sauer S. und Gut I.G.,**
Genotyping single-nucleotide polymorphisms by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 782 (2002), 73-87.
- 152. Saur D., Neuhuber W.L., Gengenbach B., Huber A., Schusdziarra V., und Allescher H.D.,**
Site-specific gene expression of nNOS variants in distinct functional regions of rat gastrointestinal tract. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 282 (2002), G349-G358.
- 153. Saur D., Paehge H., Schusdziarra V., und Allescher H.D.,**
Distinct expression of splice variants of neuronal nitric oxide synthase in the human gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 118 (2000), 849-858.
- 154. Saur D., Seidler B., Paehge H., Schusdziarra V., und Allescher H.D.,**
Complex regulation of human neuronal nitric-oxide synthase exon 1c gene transcription. Essential role of Sp and ZNF family members of transcription factors. *J. Biol. Chem.* 277 (2002), 25798-25814.
- 155. Saur D., Vanderwinden J.M., Seidler B., Schmid R.M., De Laet M.H., und Allescher H.D.,**
Single-nucleotide promoter polymorphism alters transcription of neuronal nitric oxide synthase exon 1c in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101 (2004), 1662-1667.
- 156. Schrieck J., Dostal S., von Beckerath N., Wacker A., Flory M., Weyerbrock S., Koch W., Schomig A., und Schmitt C.,**
C825T polymorphism of the G-protein beta3 subunit gene and atrial fibrillation: association of the TT genotype with a reduced risk for atrial fibrillation. *Am. Heart J.* 148 (2004), 545-550.
- 157. Sears C.E., Bryant S.M., Ashley E.A., Lygate C.A., Rakovic S., Wallis H.L., Neubauer S., Terrar D.A., und Casadei B.,**
Cardiac neuronal nitric oxide synthase isoform regulates myocardial contraction and calcium handling. *Circ. Res.* 92 (2003), e52-e59.
- 158. Sharp P.A.,**
TATA-binding protein is a classless factor. *Cell* 68 (1992), 819-821.
- 159. Shen H., Liu Y., Liu P., Recker R.R., und Deng H.W.,**
Nonreplication in genetic studies of complex diseases--lessons learned from studies of osteoporosis and tentative remedies. *J. Bone Miner. Res.* 20 (2005), 365-376.
- 160. Sherry S.T., Ward M.H., Kholodov M., Baker J., Phan L., Smigielski E.M., und Sirotkin K.,**
dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* 29 (2001), 308-311.
- 161. Shinkai T., Ohmori O., Hori H., und Nakamura J.,**
Allelic association of the neuronal nitric oxide synthase (NOS1) gene with schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 7 (2002), 560-563.

- 162. Silverman M.E.,**
From rebellious palpitations to the discovery of auricular fibrillation: contributions of Mackenzie, Lewis and Einthoven. *Am. J. Cardiol.* 73 (1994), 384-389.
- 163. Skol A.D., Scott L.J., Abecasis G.R., and Boehnke M.,**
Joint analysis is more efficient than replication-based analysis for two-stage genome-wide association studies. *Nat. Genet.* 38 (2006), 209-213.
- 164. Sosunov A.A., Hassall C.J., Loesch A., Turmaine M., and Burnstock G.,**
Nitric oxide synthase-containing neurones and nerve fibres within cardiac ganglia of rat and guinea-pig: an electron-microscopic immunocytochemical study. *Cell Tissue Res.* 284 (1996), 19-28.
- 165. Stranger B.E., Forrest M.S., Clark A.G., Minichiello M.J., Deutsch S., Lyle R., Hunt S., Kahl B., Antonarakis S.E., Tavare S., Deloukas P., and Dermitzakis E.T.,**
Genome-wide associations of gene expression variation in humans. *PLoS. Genet.* 1 (2005), e78.
- 166. Su Z., Blazing M.A., Fan D., and George S.E.,**
The calmodulin-nitric oxide synthase interaction. Critical role of the calmodulin latch domain in enzyme activation. *J. Biol. Chem.* 270 (1995), 29117-29122.
- 167. Syvanen A.C.,**
Assessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nat. Rev. Genet.* 2 (2001), 930-942.
- 168. Tang H., Quertermous T., Rodriguez B., Kardia S.L., Zhu X., Brown A., Pankow J.S., Province M.A., Hunt S.C., Boerwinkle E., Schork N.J., and Risch N.J.,**
Genetic structure, self-identified race/ethnicity, and confounding in case-control association studies. *Am. J. Hum. Genet.* 76 (2005), 268-275.
- 169. Tesauro M., Thompson W.C., Rogliani P., Qi L., Chaudhary P.P., and Moss J.,**
Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97 (2000), 2832-2835.
- 170. The International HapMap Consortium,**
The International HapMap Project. *Nature* 426 (2003), 789-796.
- 171. Thorisson G.A., Smith A.V., Krishnan L., and Stein L.D.,**
The International HapMap Project Web site. *Genome Res.* 15 (2005), 1592-1593.
- 172. Tsai C.T., Lai L.P., Lin J.L., Chiang F.T., Hwang J.J., Ritchie M.D., Moore J.H., Hsu K.L., Tseng C.D., Liao C.S., and Tseng Y.Z.,**
Renin-angiotensin system gene polymorphisms and atrial fibrillation. *Circulation* 109 (2004), 1640-1646.
- 173. Vaziri S.M., Larson M.G., Benjamin E.J., and Levy D.,**
Echocardiographic predictors of nonrheumatic atrial fibrillation. The Framingham Heart Study. *Circulation* 89 (1994), 724-730.

174. **Verheule S., Sato T., Everett T., Engle S.K., Otten D., Rubart-von der L.M., Nakajima H.O., Nakajima H., Field L.J., and Olgin J.E.,**
Increased vulnerability to atrial fibrillation in transgenic mice with selective atrial fibrosis caused by overexpression of TGF-beta1. *Circ. Res.* 94 (2004), 1458-1465.
175. **Verheule S., van Batenburg C.A., Coenjaerts F.E., Kirchhoff S., Willecke K., and Jongsma H.J.,**
Cardiac conduction abnormalities in mice lacking the gap junction protein connexin40. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 10 (1999), 1380-1389.
176. **Villareal R.P., Hariharan R., Liu B.C., Kar B., Lee V.V., Elayda M., Lopez J.A., Rasekh A., Wilson J.M., and Massumi A.,**
Postoperative atrial fibrillation and mortality after coronary artery bypass surgery. *J. Am. Coll. Cardiol.* 43 (2004), 742-748.
177. **Wang Q., Curran M.E., Splawski I., Burn T.C., Millholland J.M., VanRaay T.J., Shen J., Timothy K.W., Vincent G.M., de Jager T., Schwartz P.J., Toubin J.A., Moss A.J., Atkinson D.L., Landes G.M., Connors T.D., and Keating M.T.,**
Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat. Genet.* 12 (1996), 17-23.
178. **Wang T.J., Parise H., Levy D., D'Agostino R.B., Sr., Wolf P.A., Vasan R.S., and Benjamin E.J.,**
Obesity and the risk of new-onset atrial fibrillation. *JAMA* 292 (2004), 2471-2477.
179. **Wang X.L., Mahaney M.C., Sim A.S., Wang J., Wang J., Blangero J., Almasy L., Badenhop R.B., and Wilcken D.E.,**
Genetic contribution of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide levels. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17 (1997), 3147-3153.
180. **Wang Y., Newton D.C., and Marsden P.A.,**
Neuronal NOS: gene structure, mRNA diversity, and functional relevance. *Crit Rev. Neurobiol.* 13 (1999), 21-43.
181. **Wang Y., Newton D.C., Robb G.B., Kau C.L., Miller T.L., Cheung A.H., Hall A.V., VanDamme S., Wilcox J.N., and Marsden P.A.,**
RNA diversity has profound effects on the translation of neuronal nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96 (1999), 12150-12155.
182. **Watkins H. and Farrall M.,**
Genetic susceptibility to coronary artery disease: from promise to progress. *Nat. Rev. Genet.* 7 (2006), 163-173.
183. **Wei C., Jiang S., Lust J.A., Daly R.C., and McGregor C.G.,**
Genetic expression of endothelial nitric oxide synthase in human atrial myocardium. *Mayo Clin. Proc.* 71 (1996), 346-350.
184. **Weinberg W.,**
Über Vererbung beim Menschen. *Z Abst u Vererbl* 1 (1909), 377-393,-440-460.

- 185. Wichmann H.E., Gieger C., und Illig T.,**
KORA-gen--resource for population genetics, controls and a broad spectrum of disease phenotypes. *Gesundheitswesen* 67 Suppl 1 (2005), S26-S30.
- 186. Wiesfeld A.C., Hemels M.E., Van Tintelen J.P., Van den Berg M.P., van Veldhuisen D.J., und van Gelder I.C.,**
Genetic aspects of atrial fibrillation. *Cardiovasc. Res.* (2005),
- 187. Wjst M.,**
Target SNP selection in complex disease association studies. *BMC. Bioinformatics.* 5 (2004), 92.
- 188. Wolff B., Grabe H.J., Schluter C., Popowski K., Volzke H., Ludemann J., John U., Felix S.B., und Cascorbi I.,**
Endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp gene polymorphism, blood pressure and hypertension in a general population sample. *J. Hypertens.* 23 (2005), 1361-1366.
- 189. Wong C.K., White H.D., Wilcox R.G., Criger D.A., Califf R.M., Topol E.J., und Ohman E.M.,**
New atrial fibrillation after acute myocardial infarction independently predicts death: the GUSTO-III experience. *Am. Heart J.* 140 (2000), 878-885.
- 190. Wymore R.S., Gintant G.A., Wymore R.T., Dixon J.E., McKinnon D., und Cohen I.S.,**
Tissue and species distribution of mRNA for the IKr-like K⁺ channel, *erg.* *Circ. Res.* 80 (1997), 261-268.
- 191. Xia M., Jin Q., Bendahhou S., He Y., Larroque M.M., Chen Y., Zhou Q., Yang Y., Liu Y., Liu B., Zhu Q., Zhou Y., Lin J., Liang B., Li L., Dong X., Pan Z., Wang R., Wan H., Qiu W., Xu W., Eurlings P., Barhanin J., und Chen Y.,**
A Kir2.1 gain-of-function mutation underlies familial atrial fibrillation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332 (2005), 1012-1019.
- 192. Xie Q.W., Cho H.J., Calaycay J., Mumford R.A., Swiderek K.M., Lee T.D., Ding A., Troso T., und Nathan C.,**
Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 256 (1992), 225-228.
- 193. Xu K.Y., Huso D.L., Dawson T.M., Brecht D.S., und Becker L.C.,**
Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999), 657-662.
- 194. Xu L., Eu J.P., Meissner G., und Stamler J.S.,**
Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science* 279 (1998), 234-237.
- 195. Yamashita T., Hayami N., Ajiki K., Oikawa N., Sezaki K., Inoue M., Omata M., und Murakawa Y.,**
Is ACE gene polymorphism associated with lone atrial fibrillation? *Jpn. Heart J.* 38 (1997), 637-641.

196. **Yang Y., Xia M., Jin Q., Bendahhou S., Shi J., Chen Y., Liang B., Lin J., Liu Y., Liu B., Zhou Q., Zhang D., Wang R., Ma N., Su X., Niu K., Pei Y., Xu W., Chen Z., Wan H., Cui J., Barhanin J., and Chen Y.,**
Identification of a KCNE2 gain-of-function mutation in patients with familial atrial fibrillation. *Am. J. Hum. Genet.* 75 (2004), 899-905.
197. **Zahradnikova A., Minarovic I., Venema R.C., and Meszaros L.G.,**
Inactivation of the cardiac ryanodine receptor calcium release channel by nitric oxide. *Cell Calcium* 22 (1997), 447-454.
198. **Zintzaras E., Kitsios G., and Stefanidis I.,**
Endothelial NO Synthase Gene Polymorphisms and Hypertension. A Meta-Analysis. *Hypertension* (2006),

13. Danksagung

Auch wenn die Dissertation die eigene wissenschaftliche Leistung widerspiegelt, so gibt es doch bei einem jeden solchen Unterfangen immer eine Vielzahl von Menschen, die mehr oder weniger direkt zum Gelingen desselben beitragen. Ihnen allen möchte ich an dieser Stelle von ganzem Herzen dafür danken, dass sie mich in den vergangenen Jahren mit so viel persönlichem Einsatz unterstützt haben.

Und so gilt an erster Stelle mein ganz besonderer Dank meiner Doktormutter Frau PD Dr. med. Isabel Deisenhofer für die Überlassung eines höchst interessanten Forschungsthemas, aus dem diese Dissertation hervorging, sowie Herrn Prof. Dr. med. Albert Schömig, dem Direktor der Klinik für Herz- und Kreislauferkrankungen am Deutschen Herzzentrum und der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, der die von ihm geleiteten Laborräume zur Verfügung stellte.

Der Betreuerin meiner Arbeit, Frau Dr. med. Annette Wacker, möchte ich ausdrücklich danken für die viele Unterstützung während der vergangenen Jahre, sei es durch Vermittlung von wertvollen Kontakten, medizinisch-technischen Ratschlägen, unbürokratischer Abwicklung der finanziellen Anforderungen eines Forschungsvorhabens oder viele freundschaftliche Kontakte. Oder einfach nur dafür, dass sie immer irgendwie zu erreichen war.

Unschätzbar auch die Hilfe in technische und logistische Fragen, die ich von den Kollegen Dr. med. Sonja Weyerbrog, Dr. med. Dieter Saur und Dr. med. Wolfgang Huber sowie hinsichtlich der statistischen Auswertung von Frau Regina Hollweck erfahren habe.

Eine Ausarbeitung der Arbeit auf dem aktuellsten Stand der medizinischen Genetik wäre nicht möglich gewesen ohne die mehr als kompetente, ausführliche und freundliche Beratung durch PD Dr. med. Stefan Käab aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik der LMU München, Klinikum Großhadern und Dr. med. Dipl. Ing. Arne Pfeufer vom Institut für Humangenetik der GSF und der TU München. Ihnen beiden bin ich auch sehr dankbar für die Durchsicht der Arbeit zur Korrektur.

Zum Schluss, aber keineswegs als letztes gilt mein größter Dank meinen Eltern Marlies und Hans-Ulrich Sinner sowie meiner Freundin Anna, die mir unschätzbare Dienste bei der Korrektur der Arbeit erwiesen haben. Vor allem aber haben sie mich über all die Jahre durch alle Höhen und Tiefen der Arbeit hindurch bedingungslos unterstützt. Und dieser Beitrag ist wirklich unschätzbar.

Ihnen allen meinen herzlichsten Dank.

14. Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Moritz Felix Sinner
Geboren: 23.07.1978
Geburtsort: München

Eltern: Marlies Sinner
Hans-Ulrich Sinner, MSc

Schulbildung:

1986 – 1989: Grundschule am Marsplatz, München
1989 – 1998: Wittelsbacher Gymnasium, München
Humanistischer Zweig
Allgemeine Hochschulreife 5/1998: Note 1,6

Zivildienst:

1998 – 1999: Rettungsdienst des Bayerischen Roten Kreuzes, München

Universitäre Ausbildung:

1999 – 2005: Ludwig-Maximilians-Universität, München
Studium der Humanmedizin
Ärztliche Vorprüfung: 8/2001: Note: gut
I. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: 8/2002: Note: gut
II. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: 9/2004: Note: gut

Praktisches Jahr am Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität, München und am Massachusetts General Hospital der Harvard Medical School, Boston, MA, USA

III. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: 12/2005: Note: gut

Beruflicher Werdegang:

2/2006 – 12/2006: Wissenschaftlicher Mitarbeiter am
Institut für Humangenetik
GSF – Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit
Neuherberg
Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Meitinger

Seit 1/2007: Wissenschaftlicher Assistent
Medizinische Klinik und Poliklinik I
Universitätsklinikum Großhadern
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Gerhard Steinbeck

Publikationen und Vorträge:

Sinner MF, Pfeufer A, Kaab S. Genetics of atrial fibrillation: rare mutations, common variants and clinical relevance? *Herzschrittmacherther Elektrophysiol* 2006;17:95-105

Akyol M, Jalilzadeh S, **Sinner MF** et al. The Common Non-Synonymous Variant G38S of the KCNE1-(minK)-Gene is not associated to QT interval in Central European Caucasians: Results from the KORA study. *Eur Heart J* 2007; 38:305-309

Sinner MF, Pfeufer A, Akyol M et al. The common E298D-Variant of the Endothelial Nitric Oxide Synthase is Associated with Atrial Fibrillation in a Large Linkage-Disequilibrium Based Approach. AHA 2006. *Circulation Supplement II* 2006; 114:II-723