

Aus dem Experimental and Clinical Research Center,  
einer gemeinsamen Einrichtung des  
Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin und der  
Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchungen zu Mutationen in *KCNE* Genen und deren  
Auswirkung auf das Ablationsergebnis in einem „Real-life“  
Patientenkollektiv mit Vorhofflimmern

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

David Munding

aus Essen

Datum der Promotion: 17.09.2021

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AF	Atrial fibrillation (Vorhofflimmern)
Ala	Alanin
AP	Aktionspotenzial
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
AV-Knoten	Atrioventrikularknoten
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
BMI	Body-Mass-Index
Bzw.	Beziehungsweise
bp	Basenpaare
C	Cytosin
°C	Celsius
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium(ion)
CHA <sub>2</sub> DS <sub>2</sub>	chronische Herzinsuffizienz, arterielle Hypertonie, Alter > 75, Diabetes mellitus, Schlaganfall
CHO	Chinese Hamster Ovary
DAD	Delayed Afterpolarisation (späte Nachdepolarisation)
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>Desoxyribonucleic acid</i> )
ddNTP	Didesoxyribonukleotide
dNTP	Desoxyribonukleotide
EAD	Early Afterdepolarisation (frühe Nachdepolarisation)
ED	Erstdiagnose
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHRA	European Heart Association
EKG	Elektrokardiogramm
EPHX2	Epoxidhydrolase 2 ( <i>soluble Epoxide Hydrolase 2</i> )
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ESC	European Society of Cardiology
G	Guanin

g	Gramm
GJA	Gap junction Protein A
Gln	Glutamin
Gly	Glycin
GoF	Gain of Function (Funktionssteigerung)
GRCh38	Genome Reference Consortium Human Build 38
HAS-BLED	arterielle Hypertonie, Leber-/ Nierenfunktionsstörung, Schlaganfall, Blutung, labile INR, Alter > 65, Plättchenaggregationshemmer/Alkohol
His	Histidin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatografie ( <i>high performance liquid chromatography</i> )
I <sub>Kr</sub>	auswärts gerichtete K <sup>+</sup> -Strom (schnell - <i>rapid</i> )
I <sub>Ks</sub>	auswärts gerichtete K <sup>+</sup> -Strom (langsam - <i>slow</i> )
I <sub>Kur</sub>	auswärts gerichtete K <sup>+</sup> -Strom (sehr schnell – <i>ultra rapid</i> )
I <sub>Na</sub>	Na <sup>+</sup> -Einstrom durch spannungsabhängige Na <sup>+</sup> -Kanäle
I <sub>to</sub>	transienter K <sup>+</sup> -Ausstrom
IL	Interleukin
INR	International Normalized Ratio
K <sup>+</sup>	Kalium(ion)
KCNE	Spannungsabhängige Kaliumkanal Untereinheit E ( <i>Potassium Voltage-gated Channel Subfamily E</i> )
KCNQ	Gruppe von Kaliumkanaluntereinheiten (K <sub>V</sub> -Long QT)
K <sub>V</sub> -Kanal	spannungsabhängiger Kaliumkanal ( <i>V=voltage-gated</i> )
KHK	Koronare Herzkrankheit
LA	linker Vorhof ( <i>left atrium</i> )
LoF	Loss of Function (Funktionsverlust)
Lone AF	Vorhofflimmern ohne strukturelle kardiale oder extrakardiale Ursache
LQTS	Langes QT-Syndrom ( <i>Long QT-Syndrom</i> )
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium(ion)
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mV	Millivolt

Na <sup>+</sup>	Natrium(ion)
NPPA	Natriuretisches Peptid A
nsSNP	nicht-synonymer Single Nukleotid Polymorphismus
NUP	Nucleoporin
OR	Chancenverhältnis ( <i>Odds Ratio</i> )
p	p-Wert (Signifikanzwert)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
pH	Wasserstoffionenkonzentration ( <i>potentia hydrogenii</i> )
Pro	Prolin
RR	Blutdruck ( <i>Riva-Rocci</i> )
SCN5A	spannungsabhängige Natriumkanal Alpha-Untereinheit 5 ( <i>Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit 5</i> )
Ser	Serin
SNP	Single Nukleotid Polymorphismus
sSNP	synonymer Single Nukleotid Polymorphismus
T	Thymin
taq-Polymerase	hitze stabile DNA-Polymerase des Bacterium thermus aquaticus
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TIA	Transistorisch ischämische Attacke
Thr	Threonin
TKM	Pufferlösung
Tyr	Tyrosin
UV	Ultraviolett
VASc	Gefäßerkrankung, Alter > 65, weibliches Geschlecht
VHF	Vorhofflimmern
vs.	Versus, gegenüber
VSD	Voltage sensing domaine
μl	Mikroliter

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abstrakt</b> .....	<b>8</b>
Methodik:.....	8
Ergebnisse:.....	8
Schlussfolgerung:.....	9
<b>Abstract</b> .....	<b>10</b>
Methods.....	10
Results:.....	10
Conclusion:.....	10
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>12</b>
1.1 Vorhofflimmern.....	12
1.1.1 Epidemiologie.....	12
1.1.2 Ätiologie und Pathogenese.....	13
1.1.3 Klinik.....	14
1.1.4 Therapie von Vorhofflimmern.....	16
1.2 Genetik von Vorhofflimmern.....	17
1.3 KCNE - Familie.....	19
1.3.1 KCNE und Vorhofflimmern.....	20
1.4 Fragestellung.....	22
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>24</b>
2.1 Materialien.....	24
2.1.1 Geräte.....	24
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	24
2.1.3 Chemikalien.....	25
2.1.4 Enzyme und Nukleotide.....	25
2.1.5 Kits.....	26
2.1.6 Wasser.....	26
2.1.7 Molekulargewichtsmarker.....	26
2.1.8 Patientenkollektiv.....	27
2.1.9 Ein- und Ausschlusskriterien.....	27
2.2 Software und URLs.....	27
2.2.1 Sequencher 4.1 DNA Sequence Assembly Software.....	27
2.2.2 IBM SPSS Statistics 22.0.....	28
2.2.3 NCBI Gene ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene">www.ncbi.nlm.nih.gov /sites/entrez?db=gene</a> ).....	28
2.2.4 Ensembl Genome Browser ( <a href="http://www.ensembl.org">www.ensembl.org</a> ).....	28
2.2.5 1000-Genome-Projekt und NHLBI Exom-Sequenzierungs-Projekt.....	28

2.3 Methoden.....	29
2.3.1 Vorbemerkung.....	29
2.3.2 DNA-Extraktion.....	29
2.3.3 Primer Design.....	30
2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion .....	32
2.3.5 Gelelektrophorese .....	33
2.3.6 Enzymatische Aufreinigung .....	34
2.3.7 Sequenzierung .....	35
2.3.8 Sephadex Aufreinigung .....	36
2.3.9 Auswertung der Sequenzierung.....	36
2.3.10 Katheterablation und Follow-up .....	36
2.4 Benennung von Varianten.....	37
2.5 Statistik .....	38
2.6 Fließschema zum Arbeitsablauf .....	40
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>41</b>
3.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs.....	41
3.2 PCR-Optimierung.....	41
3.3 Auswertung der Sequenzierungen der Patienten .....	43
3.3.1 KCNE1 .....	43
3.3.2 KCNE2 .....	47
3.3.3 KCNE3 .....	48
3.3.4 KCNE4 .....	50
3.3.5 KCNE5 .....	53
3.4 Ablationsergebnisse.....	55
3.4.1 KCNE1 .....	55
3.4.2 KCNE2 .....	60
3.4.3 KCNE3 .....	61
3.4.4 KCNE4 .....	62
3.4.5 KCNE5 .....	64
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>66</b>
4.1 Überblick.....	66
4.2 Patientenkollektiv .....	67
4.3 Methoden.....	69
4.3.1 PCR und Sequenzierung .....	69
4.3.2 Katheterablation .....	69
4.4 Prävalenzen der gefundenen Variationen .....	70

4.4.1 sSNPs .....	70
4.4.2 nsSNPs .....	71
4.5 Variationen und Ablationsergebnisse .....	75
4.6 Limitationen .....	78
4.7 Schlussfolgerung .....	79
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>81</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>82</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>91</b>
<b>Curriculum Vitae   David Munding .....</b>	<b>92</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>94</b>

## **Abstrakt**

### Einleitung:

Vorhofflimmern ist die häufigste Herzrhythmusstörung des Menschen. In den letzten Jahren ergaben sich zunehmend Hinweise auf einen genetischen Hintergrund für die Erkrankung, insbesondere auch bei jüngeren Patienten ohne klassische Risikofaktoren. KCNE1-5 sind eine Gruppe von Proteinen, die als  $\beta$ -Untereinheiten von Kaliumkanälen maßgeblichem Einfluss auf die Repolarisation und den Verlauf des Aktionspotenzials u.a. am Herzen haben. Die Zielsetzung dieser Arbeit war es, den Einfluss genetischer Variationen in den kodierenden Exons der Gene KCNE1-5 auf das Auftreten von Vorhofflimmern und den Therapieerfolg nach Ablation bei Patienten ohne höhergradige Risikofaktoren zu untersuchen („Real-Life-Patienten“).

### Methodik:

Die kodierenden Exons der Gene KCNE1-5 wurden nach durchgeführter PCR bei 206 Patienten mit Vorhofflimmern ohne höhergradige Risikofaktoren („Real-Life Kohorte“) sequenziert und die Genotypenverteilung der gefundenen Polymorphismen erfasst. Diese Daten wurden mit europäischen bzw. europäisch-stämmigen Kollektiven des 1000-Genome-Projekts sowie des NHLBI Exome-Sequenzierungs-Projekt verglichen. Anschließend wurde bei 180 Patienten mit durchgeführter Katheterablation der Erfolg der Intervention nach 12 und 24 Monaten erfasst und hinsichtlich einer möglichen Assoziation mit den gefundenen Polymorphismen analysiert.

### Ergebnisse:

Es konnten keine neuen Mutationen entdeckt werden. Fünf synonyme sowie acht nicht-synonyme vorbeschriebene Varianten wurden nachgewiesen. Das Allel 97T der Variation rs17003955 (KCNE5) lässt sich im Rahmen dieser Untersuchung möglicherweise mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten von VHF assoziieren ( $p < 0.001$ ). Weiterhin liefert die vorliegende Arbeit Hinweise darauf, dass das Allel 588G des SNP rs12621643 (KCNE4) einen protektiven Einfluss auf das Rezidivrisiko nach Ablation des Vorhofs nach 24 Monaten hat ( $p = 0.019$ ). Gleiches gilt für den GG-Genotyp des schon genannten Polymorphismus rs170039557 aus KCNE5 12 Monate postinterventionell ( $p = 0.045$ ).

### Schlussfolgerung:

Das Allel 97T der Variation rs17003955 (KCNE5) lässt sich möglicherweise mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten von VHF assoziieren. Allerdings liefern vorhergehende Publikationen Hinweise auf eine abweichende Genotypenverteilung, weshalb weitere Studien zur Risikoevaluierung unverzichtbar sind.

Erstmalig wurden bei Variationen der cDNA der Gene KCNE1 bis KCNE5 der Einfluss auf den Interventionserfolg nach Katheterablation aufgrund von VHF untersucht. Die Varianten rs12621643 (KCNE4) und rs170039557 (KCNE5) haben möglicherweise einen protektiven Einfluss auf den Therapieerfolg nach 12 und 24 Monaten, während die Wildtypen das Risiko für ein Rezidiv eventuell steigern könnten. Diese Erkenntnisse stehen jedoch bei rs170039557 konträr zu den obengenannten Ergebnissen, die ein erhöhtes Erkrankungsrisiko mit der Variante assoziieren.

Weitere Untersuchungen sind gerade im Hinblick auf eine zukünftig eventuell mögliche individuelle präinterventionelle genetische Risikoevaluierung bei Patienten mit VHF angezeigt.

## **Abstract**

### Background

Atrial fibrillation (AF) is the most common cardiac rhythm disorder in humans. In recent years more and more signs unfolded pointing towards a genetic background for AF, especially in young patients without common risk factors. Human KCNE genes encode for a small family of potassium channel ancillary subunits who modify repolarization and the course of action potentials in the heart and other tissues. The study aimed to look at the impact of genetic variations in the coding regions of KCNE1-5 on the occurrence of AF as well as the therapy response after catheter ablation in AF-patients with moderate risk factors (real-life cohort).

### Methods

The coding regions of KCNE1 - 5 were sequenced in 206 AF patients without severe structural heart disease and compared to a background population of European ancestry of the 100-genome-project and NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP). Subsequently the therapy response in 180 patients who underwent catheter ablation for drug-refractory AF was reviewed after 12 and 24 months and analyzed concerning possible associations with regard to the found polymorphisms

### Results:

No new polymorphisms could be identified. Five synonymous and eight known non-synonymous variations were identified. Allele 97T of variation rs17003955 (KCNE5) could potentially be associated with a higher risk for occurrence of atrial fibrillation ( $p < 0.001$ ). Furthermore, this study indicates a protective effect on the risk of relapse 24 months after atrial ablation ( $p = 0.019$ ) for allele 588G of SNP rs 12621643 (KCNE4). The same seems to apply for the GG-genotype of mentioned rs 17003955 of KCNE5 12 months after intervention ( $p = 0.045$ ).

### Conclusion:

Allele 97T of SNP rs17003955 (KCNE5) could potentially be associated with higher risk for occurrence of AF. However, earlier publications note divergent distributions, which is why further studies are necessary for better risk-evaluation.

For the first time variations within the cDNA of KCNE1 – 5 were analyzed concerning its influence on success of atrial catheter ablation for atrial fibrillation. SNPs

rs12621643 (KCNE4) and rs170039557 (KCNE5) could potentially have a protective impact on success of therapy after 12 and 24 months, while the respective wild-types could possibly increase the risk for relapse. However concerning rs170039557 these findings are contrary to the above mentioned results, suggesting a higher association of atrial fibrillation.

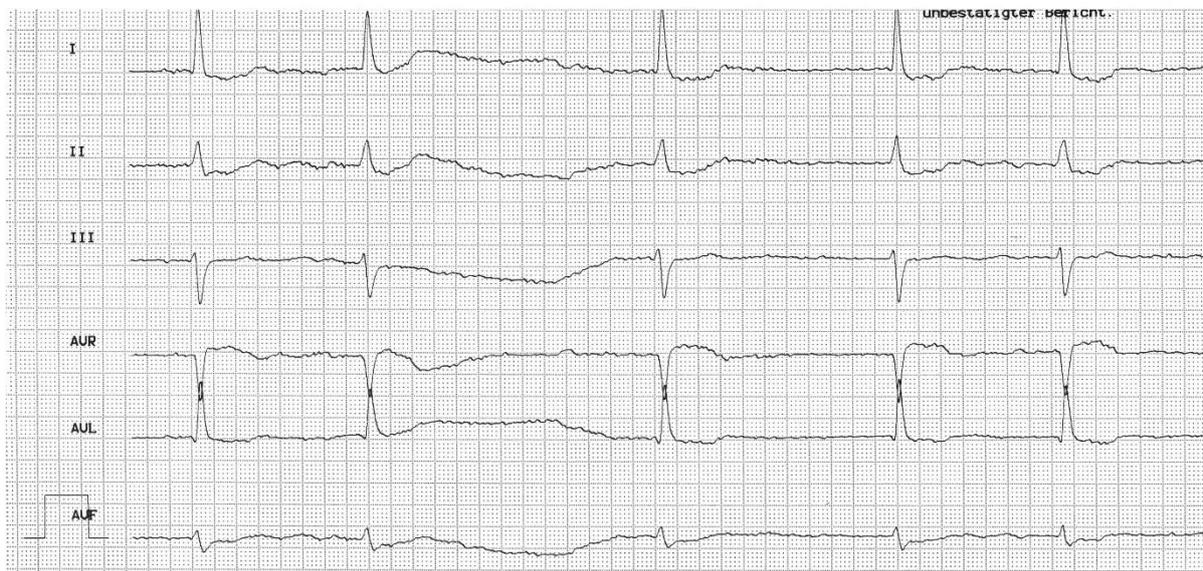
Further studies are necessary, especially with regard to possible individual genetic risk evaluation in patients with atrial fibrillation preinterventionally.

# 1. Einleitung

## 1.1 Vorhofflimmern

Beim Vorhofflimmern (VHF) handelt es sich um eine supraventrikuläre Rhythmusstörung, die durch unkoordinierte Erregungen mit einhergehender mechanischer Funktionsminderung der kardialen Vorhöfe gekennzeichnet ist.

Das Elektrokardiogramm (EKG) ist beim VHF durch das Fehlen von für die Vorhoferregung typischen regelmäßigen P-Wellen charakterisiert, an deren Stelle Flimmerwellen mit variierender Amplitude, Form und zeitlichem Erscheinen treten. Die QRS-Komplexe als Korrelat für die Kammererregung sind bei intaktem AV-Knoten zeitlich unregelmäßig angeordnet.<sup>2</sup>



**Abbildung 1.1: EKG-Verlauf beim Vorhofflimmern.** Flimmern der Grundlinie, fehlende P-Wellen und Arrhythmie.

### 1.1.1 Epidemiologie

VHF gilt als die häufigste Herzrhythmusstörung des Menschen und wird bei 1 – 2 % der Allgemeinbevölkerung beobachtet.<sup>3,4</sup> Das durchschnittliche Alter der Patienten beträgt 73,1 Jahre. Männer sind mit 55,5 % mehrheitlich betroffen.<sup>4,5</sup> Die Prävalenz steigt altersabhängig von 0,1 % bei unter 55-Jährigen bis auf 9% bei über 80-Jährigen an.<sup>3</sup> Mit zunehmendem Alter der Gesamtbevölkerung werden im Jahre 2060 nach Schätzungen 17,9 Millionen Menschen alleine in Europa von VHF betroffen sein.<sup>6</sup>

### 1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

In 15 bis 36 % der Fälle liegen keine fassbaren Ursachen vor. Man spricht dann von einem ideopathischen Vorhofflimmern bzw. „lone atrial fibrillation“ (Lone AF).

In der Mehrzahl der Fälle liegen jedoch prädisponierende Erkrankungen bzw. strukturelle Schäden zu Grunde. Hierzu gehören Koronare Herzkrankheit, Klappenvitien, Herzinsuffizienz, Kardiomyopathien und Hypertonus. Aber auch extrakardiale Ursachen im Rahmen von Schilddrüsenüberfunktion, Alkoholkonsum oder Adipositas gelten als Risikofaktoren. <sup>5</sup> Als weitere Risikofaktoren gelten Diabetes mellitus, hohes Lebensalter und akute oder temporär vorhandene Ursachen wie Myokardinfarkt, Myokarditis, Perikarditis, Herzoperationen oder Stromschlag. <sup>2</sup>

Kaliumkanäle spielen eine bedeutende Rolle bei der Repolarisation von erregbaren Zellen und somit in der Pathogenese von Vorhofflimmern. Während eines Aktionspotenzials im Vorhofmyokard erfolgt die Membrandepolarisierung initial durch einen  $\text{Na}^+$ -Einstrom durch spannungsabhängige  $\text{Na}^+$ -Kanäle ( $I_{\text{Na}}$ ). Dem wirkt ein transients  $\text{K}^+$ -Ausstrom ( $I_{\text{to}}$ ) entgegen, der somit die initiale Repolarisierung einleitet. Im weiteren Verlauf wird der durch Kalziumkanäle (L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle) bedingte  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom zuerst durch den auswärts gerichteten  $\text{K}^+$ -Strom ( $I_{\text{Kur}}$ ), und später durch die gleichartig gerichteten  $I_{\text{Kr}}$  und  $I_{\text{Ks}}$  ausgeglichen und der schnelle Abfall der Membranpolarität verursacht. Hierdurch werden die Stärke der Kontraktion sowie die Dauer des Aktionspotenzials kontrolliert. <sup>1</sup>

Die Vorgänge bei der Entstehung von VHF sind komplex. Die beiden am weitesten akzeptierten Theorien sind die fokale ektope Automatie und die kreisende Erregung (Reentry), wobei sich beide Mechanismen nicht gegenseitig ausschließen. <sup>7</sup> Als wesentliche Entstehungsorte für Vorhofflimmern konnten 1998 die Pulmonalvenen identifiziert werden. <sup>8</sup>

Bei der Theorie der fokalen Automatie wird davon ausgegangen, dass sich ein ektopter, spontan aktiver und rasch entladender Fokus in den Vorhöfen befindet, der das VHF initiiert. Dabei können die Myokardzellen, ähnlich wie im Sinusknoten, einer repetitiven diastolischen Depolarisation unterliegen oder im Anschluss an ein Aktionspotenzial (AP) nachdepolarisiert werden (Afterdepolarisation). <sup>7,9</sup>

Die Möglichkeit eines Reentry-Mechanismus entsteht im Bereich von Grenzzonen zwischen zwei Geweben (z.B. Narben). Bei gestörter Erregungsleitung oder

Erregungsrückbildung kann somit die gleiche Erregungswelle erneut auf Gewebe treffen, das nun nicht mehr refraktär ist. Somit können kreisende Erregungen entstehen, die zu insuffizienter Erregung und Kontraktion des Myokards führen und dem Aufrechterhalten des VHF zugrunde gelegt werden. <sup>7,9</sup>

Künstlich induziertes VHF besteht im Tierversuch nur kurzzeitig und ist selbstlimitierend. <sup>10</sup> Zu persistierenden Verläufen beitragen können Veränderungen der strukturellen und elektrophysiologischen Eigenschaften im Bereich der kardialen Vorhöfe, das sogenannten Remodeling. Dies kann durch kardiale Begleiterkrankungen wie hypertensiver Kardiomyopathie, Herzinsuffizienz oder Mitralklappenpathologien bedingt sein. Aber auch VHF selbst kann Veränderungen herbeiführen, die VHF begünstigen. Man unterscheidet elektrisches von strukturellem Remodeling. Bei ersterem wird durch eine veränderte Elektrophysiologie des Gewebes die effektive Refraktärperiode verkürzt, was eine Entstehung von VHF im Rahmen eines Reentry-Mechanismus begünstigen kann. <sup>11</sup> Bei strukturellem Remodelling bedingen morphologische Veränderungen (z.B. Fibrosierung, Verlust von Sarkomeren) kardiale Erregungsbildungs- oder Erregungsleitungsstörungen. <sup>12</sup>

### 1.1.3 Klinik

Die Symptome sind vielfältig und wenig speziell. Häufig klagen Patienten über Herzstolpern oder Herzklopfen. Damit können auch Brustschmerzen oder Angstgefühle einhergehen. Abhängig vom Herzminutenvolumen können Schwindelgefühle bis hin zur Synkope auftreten. Bedingt durch die ANP-Wirkung kann auch über Harndrang berichtet werden. <sup>2</sup> Oftmals sind VHF-Episoden jedoch klinisch inapparent. <sup>13</sup> Die Symptomatik der Patienten lässt sich mit Hilfe des EHRA-Scores, der den Schweregrad der Symptome klassifiziert, vereinfachen.

EHRA-Klasse	Erklärung
EHRA I	keine Symptome
EHRA II	leichte Symptome; die normale Alltagstätigkeit ist nicht beeinflusst
EHRA III	schwere Symptome; die Alltagstätigkeit ist beeinträchtigt
EHRA IV	massiv behindernde Symptome; die Alltagstätigkeit kann nicht mehr wahrgenommen werden

Abbildung 1.2: EHRA-Klassifikation aus ESC Leitlinien Vorhofflimmern 2010 <sup>14</sup>

Jede erstmalige Vorstellung mit VHF wird als erste Episode bezeichnet. Das paroxysmale Vorhofflimmern ist durch eine spontane Terminierung nach maximal 7 Tagen, meist jedoch innerhalb der ersten 48 Stunden, gekennzeichnet. Hält die Episode länger als 7 Tage an oder wird vom Arzt medikamentös oder durch Kardioversion beendet, gilt das VHF als persistierend. Lange Episoden (> 1 Jahr) gelten als lang anhaltendes persistierendes VHF. Beim permanenten VHF werden keine rhythmus-erhaltenden Maßnahmen mehr durchgeführt. <sup>14</sup>

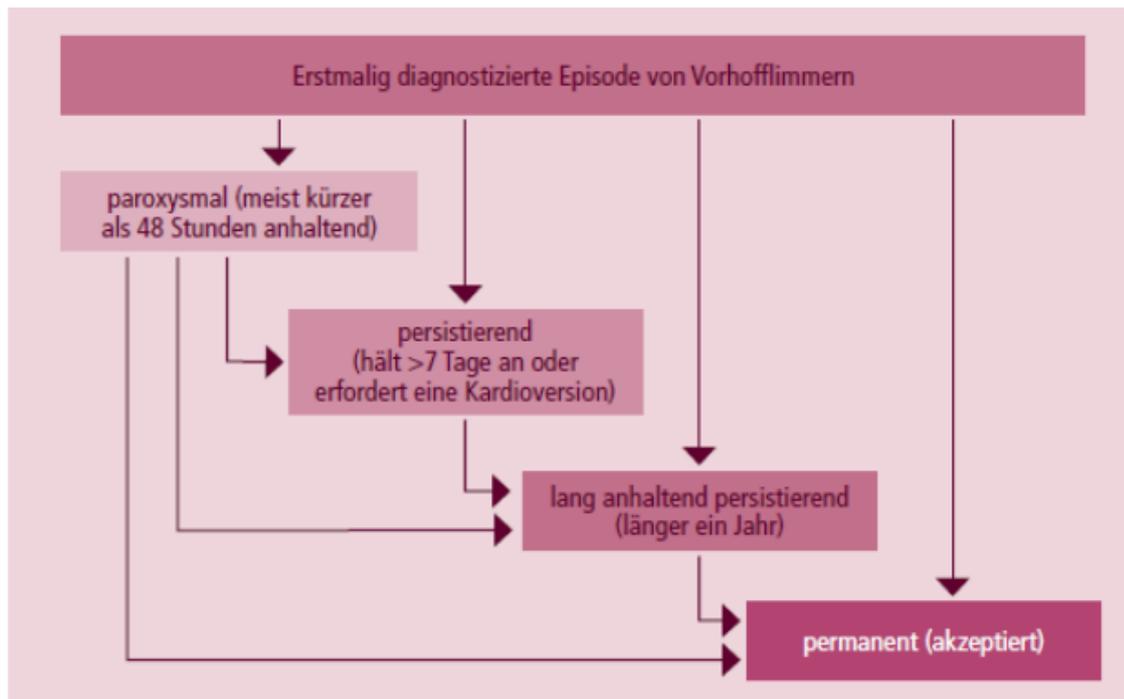


Abbildung 1.3: Typen von Vorhofflimmern aus ESC Leitlinien Vorhofflimmern 2010 <sup>14</sup>

VHF ist mit einem erhöhten Langzeitrisiko für Schlaganfälle und Herzinsuffizienz assoziiert. Die Mortalitätsrate ist bei Patienten mit VHF doppelt so hoch wie bei Patienten ohne VHF und hängt vom Schweregrad der kardiovaskulären Grunderkrankung ab. <sup>15</sup> Herzinsuffizienz und VHF sind eng miteinander verbunden und können sich gegenseitig fördern. <sup>16</sup> Des Weiteren ist das Schlaganfallrisiko um das 3 – 5-fache erhöht, während bis zu 25 % aller Schlaganfälle mit VHF assoziiert werden. <sup>17,18</sup> Zusätzliche Risikofaktoren für einen Schlaganfall bei Patienten mit VHF sind fortgeschrittenes Alter, früher stattgefundenene Schlaganfälle oder transitorische ischämische Attacken (TIA), arterielle Hypertonie, Herzinsuffizienz und Diabetes mellitus. <sup>19</sup>

### 1.1.4 Therapie von Vorhofflimmern

Die Therapie von Vorhofflimmern basiert im Wesentlichen auf 2 Säulen:

1. Thromboembolieprophylaxe
2. Behandlung der Rhythmusstörung

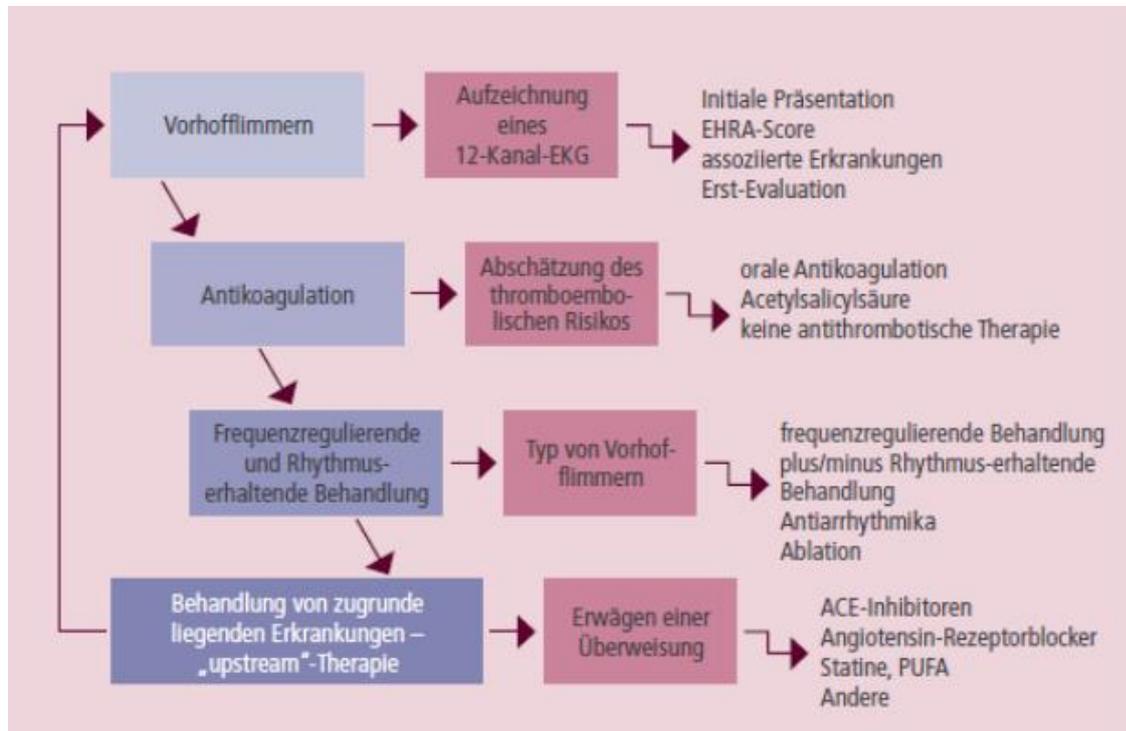


Abbildung 1.4: Behandlungskaskade bei VHF aus ESC Leitlinien Vorhofflimmern 2010 <sup>14</sup>

Die positive Wirkung einer Antikoagulation auf das Thromboembolierisiko wurde in mehreren Studien nachgewiesen und meta-analytisch bestätigt. <sup>20</sup> Diese wird in Abhängigkeit des Schlaganfall- und Blutungsrisikos durchgeführt. Die einfachste Methode zur Abschätzung des Schlaganfallrisikos stellt der CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-Score (chronische Herzinsuffizienz, arterielle Hypertonie, Alter > 75, Diabetes mellitus, Schlaganfall) dar, welcher durch zusätzliche Risikofaktoren erweitert wird: CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VAsc (Gefäßerkrankung, Alter > 65, weibliches Geschlecht). Zusätzlich erfolgt die Erfassung des Blutungsrisikos durch den HAS-BLED-Score (arterielle Hypertonie, Leber-/ Nierenfunktionsstörung, Schlaganfall, Blutung, labile INR, Alter > 65, Plättchenaggregationshemmer/Alkohol). <sup>14</sup>

Die Behandlung der Rhythmusstörung erfolgt nach den Prinzipien der Frequenz- oder Rhythmuskontrolle, wobei sich beide Strategien nicht gegenseitig ausschließen. <sup>21</sup> Bei der Frequenzadaptation wird das Vorhofflimmern akzeptiert und die Ventrikelfrequenz durch Kontrolle der AV-Überleitungsfrequenz durch negativ chronotrope Substanzen

wie Betablocker, Kalziumantagonisten vom nicht-Dihydropyridin-Typ und Digitalis normalisiert.

Die Wiederherstellung des Sinusrhythmus mittels pharmakologischer Therapie, üblicherweise durch Einsatz von Klasse Ic-Antiarrhythmika wie Flecainid oder Propafenon sowie Klasse III-Antiarrhythmika wie Amiodaron, Dronedaron oder Vernakalant, durch elektrische Kardioversion oder durch Ablation (Pulmonalvenenisolation) beschreibt den kurativen Therapieansatz der Rhythmuskontrolle.

Die Überlegenheit einer Strategie gegenüber der anderen konnte bisher in mehreren Studien nicht eindeutig belegt werden.<sup>22-24</sup> Bei VHF-Patienten mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz und hochgradig reduzierter LVEF konnte jedoch kürzlich ein Mortalitätsvorteil bei durchgeführter Ablation gegenüber einer rein medikamentösen Therapie nachgewiesen werden.<sup>25</sup> Hinweise auf einen signifikanten Vorteil einer antiarrhythmischen Therapie mit Dronedaron gegenüber Placebo müssen weiter validiert werden.<sup>26</sup> Bezüglich des Ablationsverfahrens konnten in einer großen Meta-Analyse ein vergrößerter Vorhof, klappenassoziiertes VHF und Auftreten von Rezidiven innerhalb von 30 Tagen als Prädiktoren bezüglich des Therapieerfolgs erkannt werden. Zusätzlich scheint das Rezidivrisiko bei persistierendem VHF höher als bei der paroxysmalen Form zu sein. Die Dauer des Therapieerfolges mit Rezidivraten bis zu 50 % innerhalb eines Jahres bleibt jedoch weiterhin oftmals schwer vorherzusehen.<sup>27</sup> Weitere Untersuchungen sind noch nicht abgeschlossen.<sup>28,29</sup> Somit basiert die Therapieentscheidung derzeit maßgeblich auf der klinischen Symptomatik des Patienten.

Im Rahmen der „Upstream-Therapie“ ist darüber hinaus für eine optimale Behandlung der kardiovaskulären Begleiterkrankungen zu sorgen.<sup>14</sup>

## **1.2 Genetik von Vorhofflimmern**

Die meisten Patienten mit VHF sind ältere Patienten mit begünstigenden Risikofaktoren für VHF. In 10-30 % der Fälle entwickeln jedoch auch jüngere Patienten VHF ohne Vorliegen bekannter Risikofaktoren.<sup>30</sup> Zudem mehren sich die Berichte, in denen Mutationen vor allem in Ionenkanal-Genen beschrieben worden sind, sodass eine genetische Prädisposition zu VHF angenommen werden muss.

Erste Hinweise auf eine familiäre Häufung beim Vorhofflimmern lieferte im Jahre 1943 Wolff, der ein autosomal-dominantes Vererbungsmuster bei einer Familie beschrieb.

<sup>31</sup> Weitere Studien unterstützen den Ansatz, dass eine familiäre Häufung bei Lone AF

sowie ein erhöhtes Erkrankungsrisiko mit näherliegendem Verwandtschaftsgrad und jüngerem Erkrankungsalter einhergehen. <sup>32-36</sup>

Durch die Ergebnisse genannter epidemiologischer Studien verstärkte sich der Eindruck, dass genetische Ursachen sowohl bei Lone AF als auch bei sekundärem VHF eine entscheidende Rolle in der Entwicklung spielen könnten. <sup>37</sup> Aufgrund dieser Hinweise wurden in der jüngeren Vergangenheit vermehrt Studien zur Identifizierung verantwortlicher Gene durchgeführt. Hierbei wurden im Wesentlichen zwei Untersuchungsansätze angewendet. Um monogene Formen der Erkrankung erfassen zu können, muss zunächst ein Indexpatient identifiziert werden. Im Anschluss wird eine möglichst lückenlose familiäre Stammbaumanalyse durchgeführt und mittels Kopplungsanalyse nach Mutationen gefahndet, die nur bei phänotypisch betroffenen Familienmitgliedern vorkommen. Die für VHF ursächlich in Frage kommenden Gene beeinflussen oftmals Ionenkanäle sowie deren Untereinheiten und damit die kardialen Erregungsabläufe. <sup>5</sup> So wurden bisher in verschiedenen Untereinheiten von Ionenkanälen Variationen bei Familien mit VHF gefunden (KCNQ1, KCNE2, KCNE5, KCNEJ2, KCNA5, SCN5A, SCN1B, SCN2B). Es konnten auch Variationen des Connexin40-Gens, in Genen des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und Atrialen Natriuretischen Peptids (ANP) erfasst werden, die keinen direkten Einfluss auf das Aktionspotenzial haben (NUP155, GJA5, NPPA). <sup>38</sup>

Bei nicht familienbasierten Formen von VHF werden sogenannte Single Nucleotide Polymorphismen (SNPs) untersucht. Dies sind einzelne Basenpaare der DNA-Sequenz, die für mehrere Varianten (Allele) einer Population bestehen, dabei aber mindestens mit einer Häufigkeit von 1 % vorkommen. <sup>39</sup> Um den Einfluss von SNPs auf die Entwicklung von VHF zu untersuchen, werden Assoziationsstudien durchgeführt. Dazu werden Allelfrequenzen von SNPs in Kandidatengenen einer an VHF erkrankten Population mit einer gesunden Kontrollgruppe verglichen. Mit diesem Ansatz sind bereits Assoziationen von VHF mit Genen verschiedener Kaliumkanal-Untereinheiten (KCNE1, KCNE5, KCNH2, SCN5A) erfasst worden. Zusätzlich konnten auch hier Varianten bei primär nicht am Aktionspotenzial beteiligten Genen nachgewiesen werden (u.a. ACE, AGT, GNB3). Auch bei Genen, die im Rahmen entzündlichen Prozessen beteiligt sind, wurden Verknüpfungen mit VHF beschrieben (u.a. IL6, IL10, eNOS). Interessanterweise konnten in manchen Assoziationsstudien genetische Polymorphismen identifiziert werden, bei denen davon ausgegangen wird,

dass sie Veränderungen in den gleichen Ionenkanaluntereinheiten bewirken können, die auch bei monogenetischen Formen von VHF gefunden wurden. Hierzu zählen auch KCNE1 und KCNE5, die Mitglieder einer Gruppe von Kaliumkanaluntereinheiten sind, welche insbesondere die repolarisierenden Ströme beeinflussen können. <sup>38</sup>

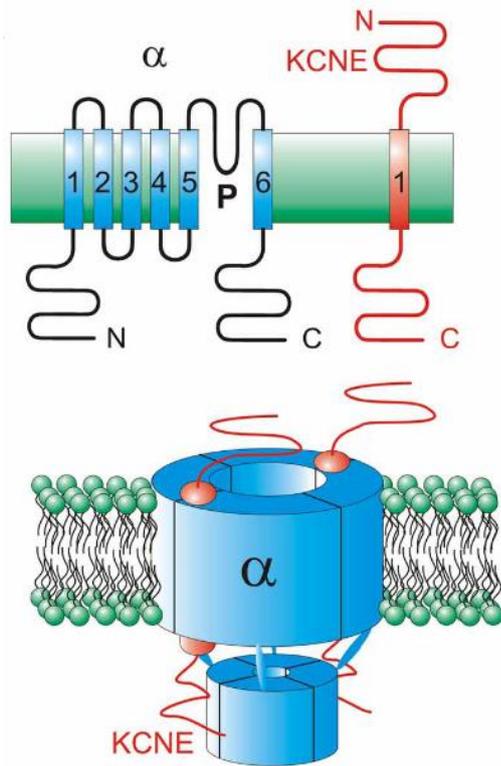
### 1.3 KCNE - Familie

Die Gene KCNE1 – 5 kodieren für eine kleine Familie von Kaliumkanaluntereinheiten, die heteromere Komplexe mit den  $\alpha$ -Untereinheiten des Kaliumkanals bilden und deren funktionelle Eigenschaften modifizieren können. <sup>40</sup> KCNE1-5 durchspannen die Zellmembran einmal und wirken hierbei als Hilfsuntereinheit, ohne jedoch eigene Ströme generieren zu können. <sup>41</sup>

KCNE	Größe Proteinprodukt (AS)	Chromosom
KCNE1	129	21
KCNE2	123	21
KCNE3	103	11
KCNE4	221	2
KCNE5	142	X

**Tabelle 1.1:** Proteingröße und Chromosomenlokalisierung KCNE1-5 (www.ensembl.org); AS=Aminosäuren

Abbildung 1.2 zeigt eine mögliche Anordnung von  $K_v$ -KCNE-Komplexen.



**Abbildung 1.2:** Oben, transmembranöse Topologie von  $Kv\alpha$  und KCNE als  $\beta$ -Untereinheiten mit nummerierten transmembranösen Segmenten; Unten, mögliche Stoichiometrie eines  $Kv\alpha$ -Komplex. Die extrazelluläre Seite ist jeweils obenliegend (aus Crump und Abbott et al. 2014 <sup>1</sup>)

Da KCNE1 zu Beginn als ein molekulares Korrelat zu  $I_{Ks}$  zugeordnet werden konnte, lag der Schwerpunkt der Erforschung der KCNE-Familie auf dem Herz. <sup>1</sup> Mutationen in KCNE-Genen konnten mit einer Reihe von kardialen Arrhythmien, insbesondere dem Long-QT-Syndrom verknüpft werden. <sup>42-51</sup> Weiterhin ließen sich Assoziationen zu frühzeitig auftretendem Myokardinfarkt belegen. <sup>52,53</sup> In der Zwischenzeit wurden im Rahmen von Untersuchungen an Mäusen KCNEs auch in extrakardialen epithelialen Geweben (Niere, Gastrointestinaltrakt/Magen, Trachea, Innenohr, Plexus choroideus, Schilddrüse) wissenschaftlich nachgewiesen und funktionell untersucht. <sup>54-63</sup> Weiterhin ergaben sich Hinweise auf potenzielle Assoziationen mit dem Auftreten von Epilepsie, Veränderungen im Haushalt der Magensäure mit einhergehendem Entartungsrisiko sowie Arteriosklerose. <sup>64-67</sup> In KCNE2- depletierten Mäusen ließen sich extrakardiale Veränderungen (Diabetes mellitus, Hyperkaliämie, Hypercholesterinämie, Anämie und erhöhte Konzentrationen von Angiotensin 2) mit konsekutiv erhöhtem Risiko für plötzlichen Herztod nachweisen. <sup>68</sup>

### 1.3.1 KCNE und Vorhofflimmern

Bis heute konnten bei allen fünf Formen von KCNE Varianten mit Assoziationen zu VHF nachgewiesen werden. In mehreren Studien untersucht wurde die Variation p.S38G von KCNE1, die zu einem Funktionsverlust (Loss-of-Function, LoF) von KCNQ1-KCNE1 und damit einem reduzierten Stromfluss  $I_{Ks}$  führt. Neben VHF wirkt

p.S38G auch prädisponierend für LQTS<sup>69-72</sup> und Herzinsuffizienz.<sup>73</sup> Ebenso wurde nachgewiesen, dass die Oberflächenexpression von KCNQ1 und damit auch die Stärke von  $I_{Ks}$  bei CHO-Zellen (Chinese hamster ovary) mit der 38G-Variation in KCNE1 verringert ist.<sup>74</sup>

Erst kürzlich konnten Olesen et al. bei einer Untersuchung von 209 Patienten mit ideopathischem VHF die Variationen p.G25V und p.G60D nachweisen, die in der Kontrollgruppe nicht präsent waren. Die elektrophysiologische Nachuntersuchung ergab für beide Varianten eine Zunahme (Gain-of-Function, GoF) des Stromfluss  $I_{Ks}$ .<sup>75</sup>

Die erstmalige Erfassung einer Assoziation von KCNE und VHF gelang 2004 durch Yang et al. In 28 nicht miteinander verwandten Patienten mit VHF wurde zweimal ein Arginin/Cystein-Austausch an Position 27 des Proteins KCNE2 gefunden, die eine funktionsverstärkende Wirkung auf KCNQ1-KCNE2 in den Expressionsstudien hatte. Diese Variante konnte bei der nachfolgenden Familienuntersuchung bei allen ebenfalls an VHF-erkrankten Verwandten nachgewiesen werden, während die Kontrollgruppe negativ blieb.<sup>76</sup> In einer aktuellen Untersuchung bei Patienten mit Lone AF durch Nielsen konnten zwei weitere Mutationen (p.M23L, p.I57T) in KCNE2 nachgewiesen werden, die in den elektrophysiologischen Untersuchungen eine Zunahme von  $I_{Ks}$  bewirkten.<sup>77</sup>

Bisher konnten zwei Variationen in KCNE3 mit VHF in Zusammenhang gebracht werden.<sup>78,79</sup> Hierbei ergaben die elektrophysiologischen Studien der Variante p.V17M eine Zunahme von  $I_{to}$  und  $I_{Kr}$ , was eine Verkürzung des Aktionspotenzials mit einhergehender Anfälligkeit für Re-Entry-Kreisläufe zur Folge haben könnte.<sup>78</sup>

Zeng et al. konnten 2007 belegen, dass KCNE4 p.E145D bei chinesischen Patienten mit VHF häufiger als in der Kontrollgruppen (34% vs. 27.1%) vorzufinden ist.<sup>80</sup>

Auch Mutationen in KCNE5 könnten mit VHF assoziiert sein. Die Variation p.L65F wies nach einer Untersuchung durch Ravn et al. eine Aktivitätszunahme von  $I_{Ks}$  auf.<sup>81</sup> Demgegenüber scheint der Polymorphismus p.P33S eine protektive Wirkung in Bezug auf die Entstehung von VHF haben.<sup>82</sup>

Gen	Mutation	In vitro-Effekte	Referenz
KCNE1	p.G25V	Aktivitätszunahme $I_{Ks}$	Olesen et al. 2012 <sup>75</sup>
	p.S38G	Aktivitätsverlust $I_{Ks}$ , ↓ Expression KCNQ1-Kanalkomplexe	Ehrlich et al. 2005 <sup>74</sup> , Fatini et al. 2006 <sup>69</sup> , Prystupa et al. 2006 <sup>72</sup> , Xu et al. 2008 <sup>70</sup> , Husser et al. 2009 <sup>71</sup>
	p.G60D	Aktivitätszunahme $I_{Ks}$ , beschleunigte Deaktivierung	Olesen et al. 2012 <sup>75</sup>
KCNE2	p.M23L	Aktivitätszunahme $I_{Ks}$	Nielsen et al. 2014 <sup>77</sup>
	p.R27C	Aktivitätszunahme $I_{Q1-E2}$	Yang et al. 2004 <sup>76</sup>
	p.I57T	Aktivitätszunahme $I_{Ks}$	Nielsen et al. 2014 <sup>77</sup>
KCNE3	p.V17M	Aktivitätszunahme	Lundby et al. 2008 <sup>78</sup>
	p.R53H	Aktivitätszunahme $I_{Q1-E3}$	Zhang et al. 2006 <sup>79</sup>
KCNE4	p.E145D	Aktivitätszunahme $I_{Q1-E4}$	Zeng et al. 2004 <sup>80</sup>
KCNE5	p.P33S	-	Ravn et al. 2005 <sup>82</sup>
	p.L65F	Aktivitätszunahme $I_{Ks}$	Ravn et al. 2008 <sup>81</sup>

**Tabelle 1.2:** Übersicht bekannter Assoziation zwischen KCNE und VHF, Chr: = Chromosom

Da KCNE ubiquitär nachgewiesen werden konnte, lassen Mutationen in extrakardialen Gewebe auch eine Relevanz für die Entstehung von Vorhofflimmern naheliegend erscheinen. So konnte kürzlich im Mausmodell ein Zusammenhang zwischen KCNE3-Depletion und Hyperaldosteronismus-induziertem VHF beschrieben werden. <sup>83</sup> Nachdem bereits der Einfluss von KCNE2 auf die Schilddrüsenfunktion beschrieben wurde, erscheint auch eine hieraus resultierende Anfälligkeit für Herzrhythmusstörungen zumindest denkbar. <sup>62,84</sup>

## 1.4 Fragestellung

Vorhofflimmern ist die häufigste Herzrhythmusstörung des Menschen. Neben prädisponierenden Erkrankungen und Risikofaktoren liegen Hinweise für genetische Einflüsse vor.

KCNE1-5 sind integrale Proteine der Zellmembran, die für sich genommen nicht dazu in der Lage sind, eigene Stromflüsse zu erzeugen. Als  $\beta$ -Untereinheiten besitzen sie jedoch die Fähigkeit, modulierend auf Kaliumkanalproteine ( $\alpha$ -Untereinheiten) einzuwirken und deren funktionelle Eigenschaften zu verändern. Mutationen in Ionenkanalproteinen und speziell in KCNEs wurden mit kardialen Rhythmusstörungen und insbesondere VHF assoziiert. Da KCNEs jedoch ubiquitär im Körper vorkommen,

könnten auch extrakardiale Mechanismen zu Herzrhythmusstörungen führen und beitragen.

Der Therapieerfolg des Ablationsverfahrens bleibt weiterhin oftmals schwer vorherzusagen und scheint von multiplen, teils noch nicht genau erfassten Parametern abzuhängen.

Die daraus resultierende Zielsetzung dieser Arbeit war:

1. Die Identifikation von neuen Variationen in den Exons von KCNE1-5 bei Patienten ohne höhergradige Risikofaktoren („Real-Life-VHF-Kollektiv“) sowie ein Vergleich der Verteilung der Allele bei vorbekannten Variationen mit der Normalbevölkerung.
2. Den Einfluss der im untersuchten Kollektiv erfassten KCNE-Variationen auf den Ablationserfolg zu untersuchen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Automatischer DNA-Sequenzer (ABI 3100)	Perkin Elmer
Eismaschine AF-100	Scotsman
Elektrophorese-Kammer Multiphor II	Pharmacia
Elektrophorese-Netzgerät PS 9009	Gibco BRL
Flachbettgelkammer Horizon 58	Gibco BRL
Fotoanlage Herolab E.A.S.Y	Herolab Enhanced Analysis System
Gelkammer Horizon®58	Biometra
Kühlzentrifuge Sigma 3K30	Biometra
LaserJet 4000N	Hewlett Packard
Magnetrührer RCT basic	IKA Labortechnik
Mikrowelle	AEG
pH-Meter 765 Calimatic	Omnilab
Picofuge	Stratagene
Pipetten (0,1 - 10 µl, 10 - 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf
Pipette, 8-Kanal (0,5 - 10 µl, 5 -50 µl)	Biozym, Abimed
Schüttler GFL 3015	GFL 3015
Thermocycler UNO	Biometra
Thermocycler PTC- 200	MJ-Research, Biozym
Thermostat DRI-Block DB·2A	Techne
Vortex REAX 2000	Heidolph
Waage 510 - 37	Kern

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
96-Well Reaction Plate MicroAmp™	Applied Biosystems
96-Well Assay System MultiScreen®	Millipore
Cellophanfolie	Folia/Festa
Gel Fix for PAG	Serva
Glasplatten	Amersham

Glaswannen	Assistent
Handschuhe Manufix sensitiv	Braun
Handschuhe rotiprotect Nitril	Roth
Injektionsspritzen, 20ml	B Braun
Paket-Klebeband	Tesa
Parafilm	Roth
PCR Caps	Biozym/Brand
PCR Softstrips 0,2 ml	Biozym/Brand
Pipettenspitzen	Cotech
Reaktionsgefäße 2ml, 1,5ml, 0,6ml	Biozym
Stripette 5ml, 10ml	Costar

### 2.1.3 Chemikalien

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Agarose	Biozym
Ammoniumpersulphat	Pharmacia Biotech
Borsäure	Roth
Bromphenolblau	Pierce
EDTA	Pierce
Gelgreen	Biotium
Glycerin	Serva
HI-DI Formamid	Merck
HPLC-Wasser	Roth
Natriumcarbonat	Roth
Natriumhydroxid	Merck
Salzsäure	Merck
SeaKem® LE Agarose	Biozym
Sephadex™ G-50 Superfine	GE Healthcare
Tris(base)	Roth
Xylencyanol	Pierce

### 2.1.4 Enzyme und Nukleotide

Alkaline Shrimp Phosphatase	Roche
DNA-Primerpaare	BioTeZ

2mM dNTP-Mix(dATP,dGTP,dCTP,dTTP)	Roth
Exonuklease I	Roche

### 2.1.5 Kits

#### *PCR-Kit (Perkin Elmer)*

- 10x PCR-Probenpuffer(100mM Tris-HCL pH 8,3; 500mM KCl)
- MgCl<sub>2</sub> (25mM)
- Taq-DNA-Polymerase (5U /μL)

#### *BigDye Terminator Kit v 1.1 (ABI-Chemie)*

- BigDye-Ready-Reaction-Mix (A-, C-, G-, T-Dye Terminator, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Tris-HCL(pH 9), MgCl<sub>2</sub>, hitzeresistente Pyrophosphatase, AmpliTaq-DNA-Polymerase)
- 5x Sequenzierungspuffer

### 2.1.6 Wasser

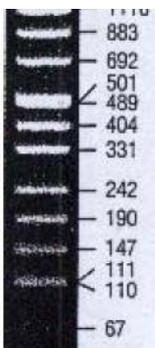
Bei der Herstellung von Puffern wurde deionisiertes Wasser (dH<sub>2</sub>O) benutzt.

Für die Gelelektrophorese war destilliertes Wasser ausreichend. Zur Herstellung der Puffer für die Sequenzierung wurde HPLC-Wasser benutzt.

### 2.1.7 Molekulargewichtsmarker

DNA-Molekulargewichtsmarker VIII Roche

**Abb. 2.1** Verwendeter DNA-Molekulargewichtsmarker vom Typ VIII



### 2.1.8 Patientenkollektiv

Das zu untersuchende Kollektiv setzte sich aus 206 Patienten der Charité Universitätsmedizin Berlin zusammen. Für die genetische Untersuchung gaben alle Patienten ihr Einverständnis. Ein positives Votum der Ethikkommission liegt vor (Ethikantrag: EA2/108/11).

### 2.1.9 Ein- und Ausschlusskriterien

Um in die Studie aufgenommen werden zu können, musste bei den Patienten in mindestens EKG Vorhofflimmern verzeichnet worden sein oder aufgrund eines anamnestisch bekannten VHF eine orale Antikoagulation bestehen.

VHF wurde definiert als der Ersatz von für eine normale Vorhoferregung typischen P-Wellen durch irreguläre Flimmerwellen und arrhythmisch auftretende Kammerkomplexe im Oberflächen-EKG. Des Weiteren mussten die Patienten im Rahmen dieses oder eines vorhergehenden stationären oder ambulanten Aufenthaltes in der Charité Universitätsmedizin Berlin (Campus Virchow Klinikum) ein transthorakales Echokardiogramm erhalten haben, um Parameter der Vorhof-, Kammer- und Klappenfunktionen erhalten zu können.

Die Patienten wurden entsprechend ihrer klinischen Diagnosen und echokardiographischen Befunde unter Berücksichtigung der wichtigsten Risikofaktoren (Herzhypertrophie, Klappenitien, Koronare Herzkrankheit, Herzinsuffizienz) ausgewählt. Dabei galten Patienten mit einer echokardiographisch gemessenen Septumdicke von mehr als 13 mm, mit einem oder mehreren Herzklappenitien II° oder höher, einer bestehenden KHK, einem echokardiographisch gemessenen Durchmesser des linken Vorhofs von mehr als 50 mm oder einer LVEF unter 45% als strukturell herzkrank und wurden ausgeschlossen. Wenn keines dieser Kriterien vorlag, galten die Patienten als strukturell herzgesund und wurden in die Studie eingeschlossen.

## **2.2 Software und URLs**

### 2.2.1 Sequencher 4.1 DNA Sequence Assembly Software

Zum Auswerten und Vergleichen der bei der Sequenzierung erzeugten Chromatogramme mit der Referenzsequenz wurde die Software Sequencher 4.1 der Firma Gene Codes Corporation verwendet.

### 2.2.2 IBM SPSS Statistics 22.0

Die Software SPSS 22.0 der Firma SPSS Inc. diente der statistischen Auswertung der Ergebnisse. Dazu wurden die Daten aller Patienten in die Tabelle eingegeben und mit Hilfe der verschiedenen Funktionen des Programms ausgewertet.

### 2.2.3 NCBI Gene ([www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene))

Von der NCBI Datenbank Gene wurden die genomischen Sequenzen entnommen. Sie dienten als Referenzsequenzen bei der Auswertung der Chromatogramme. Die untersuchten Gene sind unter folgenden Einträgen zu finden: KCNE1 (ID 3753), KCNE2 (ID 9992), KCNE3 (ID 10008), KCNE4 (ID 23704) und KCNE5 (ID 23630).

### 2.2.4 Ensembl Genome Browser ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org))

Eine Zusammenstellung aller Exons, Translationen und Varianten der einzelnen Gene und Aminosäuresequenzen findet sich in der Datenbank Ensembl. Diese wurde verwendet, um bereits bekannte Varianten mit in den Sequenzierungen gefundenen Auffälligkeiten zu vergleichen. Die in dieser Arbeit als bekannt angesehenen Varianten wurden dem Ensembl Release 81 im Juli 2015 entnommen. Die untersuchten Gene sind unter folgenden Einträgen zu finden:

KCNE1 Gen: ENSG00000180509, Transkript: KCNE1-201: ENST00000337385

KCNE2 Gen: ENSG00000159197, Transkript: KCNE2-001: ENST00000290310

KCNE3 Gen: ENSG00000175538, Transkript: KCNE3-001: ENST00000310128

KCNE4 Gen: ENSG00000152049, Transkript: KCNE4-001: ENST00000281830

KCNE5 Gen: ENSG00000176076, Transkript: KCNE5-001: ENST00000372101

### 2.2.5 1000-Genome-Projekt und NHLBI Exom-Sequenzierungs-Projekt

Um die gefundenen Variationen und ihre Verteilung mit einer Normalpopulation vergleichen zu können, wurden die Daten des 1000-Genome-Projekts genutzt ([www.1000genomes.org](http://www.1000genomes.org)). Dabei handelt es sich um ein internationales Projekt, in dem bisher die Genome von 2535 (Phase 3) Menschen weltweit sequenziert wurden, um daraus einen detaillierten Katalog menschlicher genetischer Variationen zu erstellen. Dabei werden die Teilnehmer bewusst randomisiert ausgewählt ohne klinische Hintergrundinformationen zu erfragen, um eine möglichst grundlegende Allgemeinpopulation abzubilden.<sup>85</sup> Der in dieser Arbeit genutzte Teil Datenbank bestand aus 503 europäischen Teilnehmern.

Sofern hier für die gefundene Variante keine Information vorzufinden war, wurden alternativ die Daten des NHLBI Exom-Sequenzierungs-Projekt (ESP6500) zum

Vergleich herangezogen (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>). Hierbei handelt es sich um Daten eines amerikanischen Sequenzierungsprojekts, dessen Population phänotypisch ebenfalls sehr breit aufgestellt ist. In dieser Arbeit wurden die Daten von Teilnehmern mit europäischer Abstammung genutzt.

## **2.3 Methoden**

### 2.3.1 Vorbemerkung

Nach Herstellung des Master-Mix und nach Zugabe des in den einzelnen Arbeitsschritten benötigten Untersuchungsmaterials wurde der Ansatz immer mit einem Vortex (Firma Heidolph) gemischt, sowie mit einer Picofuge der Firma Stratagene zentrifugiert. Das Arbeiten mit Enzymen erfolgte immer auf Eis.

### 2.3.2 DNA-Extraktion

Die DNA wurde aus EDTA-Blut isoliert, dem EDTA als Lösung in einer Konzentration von 1,2-2 mg EDTA/ml Blut in einer Monovette (Sarstedt) vorgelegt wurde. Die Verdünnung durch das flüssige EDTA betrug maximal 1%. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Die DNA der Patienten des Kollektivs wurde mittels einer Standard-DNA-Extraktions-Methode nach Lahiri extrahiert.<sup>86</sup> Bei dieser Methode werden die Lymphozyten mittels Detergenz lysiert und somit giftige organische Lösungsmittel wie Phenol oder Chloroform vermieden.

Die zellulären Proteine werden ausgesalzt und die DNA mit Hilfe von Ethanol gefällt. Nach Resuspension mit einem geeigneten Puffer steht das DNA-Extrakt zur Verfügung und wird abschließend einer Konzentrations- und Qualitätsbestimmung durch Photometrie unterzogen.

Im Folgenden werden die einzelnen Schritte der DNA-Isolation beschrieben:

1. Isolierung der Zellkerne durch Zentrifugation:

5 ml der Blutprobe, 5 ml Puffer TKM1 (10 mM Tris, pH 7,6; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 2 mM EDTA) und 100 µl Triton X-100 wurden vermischt und 20 Minuten bei 2500 U/min zentrifugiert.

2. Lyse der Lymphozyten:

Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet mit 800 µl Puffer TKM2 (10 mM Tris, pH 7,7; 10 mM KCL; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 2 mM EDTA) und 50 µl 10% SDS resuspendiert, vermischt und bei 55 °C 10 Minuten im Wasserbad inkubiert.

3. Fällung der Proteine:

100 µl 5 M NaCl wurden hinzupipettiert, vermischt und 5 min bei 1200 U/min zentrifugiert. Der Überstand mit der DNA (ca. 1 ml) wurde in ein neues Gefäß überführt und mit dem doppelten Volumen reinen Alkohols (ca. 2 µl) bei Raumtemperatur vermischt. Das Gefäß wurde mehrfach gedreht, bis die DNA sichtbar wurde.

#### 4. Alkoholfällung der DNA:

Im nächsten Schritt wurde die DNA in ein Gefäß überführt, das 1 ml 70 % Ethanol enthielt, und 5 Minuten bei 1200 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet 10 Minuten in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 500 µl Tris-Puffer (10 mM, pH 8,0) 15 Minuten bei 65 °C resuspendiert. Das Resultat konnte als DNA-Stammlösung genutzt werden.

Die genomische DNA der Patientenproben mit einer Konzentration von ca. 25 ng/µl lag für diese Untersuchung bereits vor Versuchsbeginn auf 96-Loch Arbeitsplatten vor. Sie wurde von Mitarbeitern des Kardiogenetischen Labors mit Hilfe eines Extraktionsautomaten des Typs AUTOPURE LS der Firma QIAGEN isoliert.

#### 2.3.3 Primer Design

Primer sind kurze DNA-Fragmente, die zur Amplifizierung einzelner Abschnitte eines Gens benötigt werden. Sie dienen als Startpunkt der DNA-Polymerase und setzen kurz vor oder nach dem zu amplifizierenden Exon an (Forward Primer, F; Reverse Primer, R).

Die für die kodierenden Exone von KCNE1 bis 5 benötigten Primer für die PCR wurden von der Firma BioTeZ hergestellt. Zur Ermittlung der optimalen Annealing-Temperatur der jeweiligen Primer wurden für jedes Primerpaar normale PCR-Ansätze mit Test-DNA hergestellt und im Thermocycler einem Temperaturgradienten unterzogen. Hierbei werden insgesamt 12 gleiche PCR-Ansätze mit gleicher DNA unter verschiedenen Annealing-Temperaturen getestet. Das passende Programm, aus dem auch die einzelnen Temperaturstufen entnommen werden konnten, stellte der Thermocycler zur Verfügung.

Um ein gutes Ergebnis zu erlangen, sollten folgende Richtlinien beim Primerdesign nach Möglichkeit eingehalten werden:

- Die Länge der Primer sollte zwischen 18 und 24 bp liegen
- Der Abstand zum zu untersuchenden Exon sollte zwischen 30 und 40 bp liegen

- Das Produkt sollte möglichst nicht länger als 600 bp lang sein, um eine Auswertung in gesamter Länge zu ermöglichen
- Die beiden Primer eines Primerpaares sollten sich im Schmelzpunkt um nicht mehr als 5° unterscheiden, um das Annealing zu optimieren.
- Die Schmelzpunkte sollten zwischen 50 und 70 °C liegen.
- Die beiden Primer eines Primerpaares und auch jeder Primer selbst sollten maximal drei komplementäre Basen enthalten, um die Bildung von Loops oder Duplexe zu verhindern.

In der folgenden Tabelle 2.1 sind die Sequenzen, die Schmelztemperatur und die Produktlänge aufgeführt. Der Tabelle ist zu entnehmen, dass die Produktlängen bei KCNE3 bis KCNE5 länger als in den Richtlinien beschrieben sind. Hier konnten die Auswertungsschwierigkeiten durch Vorwärts- und Rückwärtssequenzierung behoben werden.

Primer	Sequenz (5' => 3')	TM	Produktlänge
KCNE_1.1F	GCAGCAGTGGAAACCTTAATG	60 °C	226 bp
KCNE_1.1R	CGGATGTAGCTCAGCATGAT	60 °C	
KCNE_1.2F	CTTCGGCTTCTTCACCCTG	60 °C	249 bp
KCNE_1.2R	TTAGCCAGTGGTGGGGTTC	60 °C	
KCNE_2.1F	TCCGTTTTCTAACCTTGTTTC	60 °C	255 bp
KCNE_2.1R	GCCACGATGATGAAAGAGAAC	62 °C	
KCNE_2.2F	GATGCTGAGAACTTCTACTATG	62 °C	289 bp
KCNE_2.2R	GTCTGGACGTCAGATGTTAG	60 °C	
KCNE_3F	GCTAAGATTTTACCTGGGATCTGA	68 °C	626 bp
KCNE_3R	TATGCACAAGGCTTCGGTCTAC	66 °C	
KCNE_4F	CTCTTGTCAGCTGTTTGGCGAACC	74 °C	886 bp
KCNE_4R	CACAGGCACCTCCCGGACTC	68 °C	
KCNE_5F	CTGGGTGCTACCGCTGTT	58 °C	690 bp
KCNE_5R	CTCCTGGCCTCTCACCATTA	62 °C	

**Tabelle 2.1:** Basensequenz der ermittelten und verwendeten Primer mit Sequenz, Schmelztemperatur (TM), und Produktlänge (bp = Basenpaare, F = forward/vorwärts, R = reverse/rückwärts)

### 2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der *Polymerase Chain Reaction* (PCR) können ausgewählte DNA-Abschnitte amplifiziert werden. Dabei synthetisiert eine DNA-Polymerase entlang einer vorhandenen Nukleinsäure-Matrize einen komplementären DNA-Tochterstrang. Durch Zugabe und komplementäre Anlagerung der erwähnten Oligonukleotid-Primern mit einer Länge von etwa 20 bp wird zuvor der interessante DNA-Bereich herausgriffen.

Als Matrize dient die aus dem Patientenblut gewonnene DNA (template). Zur Herstellung der Primer muss die Sequenz des zu vervielfältigenden DNA-Abschnitts bekannt sein. Sie werden so gewählt, dass sie sich an der Nukleotidsequenz etwas über- und unterhalb des entsprechenden DNA-Abschnitts durch partielle Doppelstrangbildung mit den DNA-Einzelsträngen anlagern und so als Startpunkte für die DNA-Polymerase dienen können.

Zusätzlich benötigt es Desoxyribonukleotide (dNTP's) für die Synthese des Tochterstranges sowie ein geeignetes Puffersystem. Dieses sorgt für ein Milieu, welches die Polymerase optimal arbeiten lässt. Ein hierfür benötigtes weiteres essentielles Co-Substrat sind  $Mg^{2+}$ -Ionen, die über Komplexbildung die DNA, dNTP's und die DNA-Polymerase in Lösung halten.

Die Reaktion wird mit Hilfe eines automatischen Thermocyclers durchgeführt. Da hierbei Temperaturen über 90 °C entstehen, benötigt man eine hitzestabile DNA-Polymerase aus thermophilen *Bacterium Thermus Aquaticus* (taq).

Zuerst wird die DNA bei 94 °C *denaturiert* und damit in ihre Einzelstränge aufgeschmolzen. Durch das nun folgende schnelle Abkühlen auf die *Annealing*-Temperatur (je nach Primer zwischen 40 – 70 °C) wird zum einen die Reassoziaton der DNA-Einzelstränge verhindert, zum anderen können die Primer nun mit den komplementären Sequenzen hybridisieren. Bei der sich anschließenden *Elongation* wird von den Primern ausgehend der Tochterstrang durch die *taq*-Polymerase gebildet. Dieser Zyklus aus Denaturierung, Annealing und Tochterstrang-Synthese wird nun in mehreren, meistens um die 40, Zyklen wiederholt.

Die für die PCR nötigen Komponenten sind in Tab.1 zusammengefasst. Sie wurden bei -20 °C gelagert und für die PCR auf einem Thermoblock aufgetaut. Für die Proben wurde ein Master-Mix angesetzt und hiervon 24 µl mit 1 µl genomischer DNA-Lösung in die Reaktionsgefäße (PCR-Softstripes), die auf einem Eisblock gekühlt wurden, pipettiert. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle bestehend aus dem PCR-Ansatz

ohne genomische DNA mitgeführt. Das für die PCR verwendete Programm kann aus Tab. 2.3 entnommen werden.

<b>Komponente</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Volumen</b>
HPLC-Wasser	-	17,5 µl
PCR-Probenpuffer	10x	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub>	50 mmol/l	1,5 µl
Primer vorwärts	5 pmol/µl	1 µl
Primer rückwärts	5 pmol/µl	1 µl
dNTPs	25 mmol/l	0,3 µl
Taq-DNA-Polymerase	5 U/µl	0,2 µl
DNA-Vorlage	25 ng/µl	1 µl

**Tabelle 2.2:** PCR-Ansatz

<b>Schritt</b>	<b>T</b>	<b>Zeit</b>
1. Anfangsdenaturierung	94 °C	5 min
2. Denaturierung	94 °C	0,5 min
3. Primerhybridisierung	s.Tab.1	0,5 min
4. Primerextension	72 °C	1,5 min
5. abschließende Primerextension	72 °C	5 min

**Tabelle 2.3:** PCR-Programm (T=Temperatur)

### 2.3.5 Gelelektrophorese

Zur Kontrolle der PCR wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Hierzu wurde ein 3 % Agarosegel hergestellt. Die Agarose und der TBE-Puffer wurden in der Mikrowelle aufgekocht und danach Gelgreen hinzugegeben. Anschließend wurde das Gel in die Elektrophoresekammer gegossen, wo es ca. 45 Minuten zum Polymerisieren benötigte. Nicht gleich weiter verwendete Gele konnten zur Lagerung bei 4° C in TBE-Puffer aufbewahrt werden. Für die Gelelektrophorese wurden die Gele ebenfalls mit TBE-Puffer überschichtet.

Nun wurden jeweils 2µl PCR-Produkt mit 2µl Auftragspuffer vermischt und in die Gelkammern pipettiert. Um die Größe des jeweiligen Fragments abschätzen zu können, wurde ein DNA-Molekulargewichtsmarker, der mit 10 mM Trispuffer (pH 8) im Verhältnis 1:10 verdünnt wurde, mit aufgetragen. Bei einer Spannung von 80mV wurde die Elektrophorese ca. 45 Minuten lang durchgeführt. Bei größeren Fragmenten verlängerte sich diese Zeit bis auf 60 Minuten, um klare Banden zu erhalten.

Abschließend wurde das Gel in einem Fotometer unter UV-Licht fotografiert und ausgewertet.

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
Tris(Base)	54 g
Borsäure	27,5 g
0,5M EDTA	20 ml
dH <sub>2</sub> O	ad. 1000 ml

**Tabelle 2.4:** TBE-Puffer

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
Agarose	3 g
1x TBE-Puffer	ad. 100 ml
Gelgreen	2,5 µl

**Tabelle 2.5:** 3%iges Agarosegel (1Gel)

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
Glycerin	3 ml
HPLC-Wasser	7 ml
Bromphenolblau	0,025 g
Xylencyanol	0,025 g

**Tabelle 2.6:** Auftragspuffer

### 2.3.6 Enzymatische Aufreinigung

Da für die weitere Verarbeitung die PCR-Produkte in bestmöglicher Qualität vorliegen sollten, wurde vor der Sequenzierung eine enzymatische Aufreinigung durchgeführt, bei der überschüssige Primer und dNTPs abgebaut werden. Hierfür wurde wieder ein Master-Mix hergestellt und danach für 30 Minuten bei 37 °C und anschließend 15 Minuten bei 72°C im Thermocycler inkubiert. Unmittelbar nach der Aufreinigung erfolgte das Cycle-Sequenzieren.

Komponente	Volumen
Exonuklease I	0,09 µl
Shrimp Alkaline Phosphatase	0,32 µl
HPLC-Wasser	2,59 µl
PCR-Produkt	7 µl

**Tabelle 2.7:** Komponenten für die enzymatische Aufreinigung

### 2.3.7 Sequenzierung

Um die Patientenproben auf Mutationen zu untersuchen, muss die Basenabfolge der einzelnen Exons sichtbar gemacht werden. Dazu dient die automatische Sequenzierung nach Sanger. In eine Richtung wird hierbei der Komplementärstrang zur DNA gebildet, der durch Fluoreszenzfarbstoff-markierte Didesoxynukleotidbasen (ddNTPs) terminiert wird. Für jede Base wurde dafür ein Farbstoff mit einem anderen Absorptionsmaximum verwendet. Mit einem mikroprozessorgesteuerten Sequenzierungsgerät mit Elektrophorese- und Fluoreszenz-Detektionsfunktion kann nun durch die Markierung die genaue Basenabfolge der amplifizierten DNA-Sequenz ausgelesen und als Elektropherogramm dargestellt werden.

Analog zur Aufreinigung wurde ein Mastermix hergestellt. Für die Cycle Sequenz wurde entweder der Vorwärts- oder Rückwärts- Primer verwendet. Bei KCNE4 war es aufgrund der Fragmentlänge nötig sowohl vorwärts als auch rückwärts zu sequenzieren.

Komponente	Volumen
BigDye Ready Reaction	0,5 µl
5x Sequenzierungspuffer	1,75 µl
Forward- oder Reverse-Primer	1 µl
HPLC-Wasser	4,75 µl
PCR-Produkt	2 µl

**Tabelle 2.8:** Ansatz für die Sequenzierung

Schritt	T	Zeit
1-Anfangsdenaturierung	96 °C	1:00 min
2-Denaturierung	96 °C	0:10 min
3-Primerhybridisierung	50 °C	0:30 min
4-Primerextension	60 °C	4:00 min
5-abschl. Primerextension	20 °C	5:00 min

**Tabelle 2.9:** Programm für die Sequenzierung (T=Temperatur)

### 2.3.8 Sephadex Aufreinigung

Zur Aufreinigung der DNA wurde „Sephadex™ G-50 Superfine“ in eine 96 Well-Plate des MultiScreen® Assay Systems mittels einer Füllhilfe eingebracht. Pro Well wurde 300 µl HPLC-Wasser hinzugefügt. Die Quellzeit betrug 24 Stunden bei 4 °C. Die gequollen Platten wurden für 5 Minuten bei 1000 g zentrifugiert, wiederum mit 150 µl HPLC-Wasser pro Well befüllt und anschließend wieder bei 1000 g 5 Minuten lang zentrifugiert. Das filtrierte HPLC-Wasser wurde verworfen. Zuletzt erfolgte die Zugabe von 10 µl Sequenzierprodukt pro Well und eine letzte Zentrifugation unter analogen Bedingungen. Die gereinigten Produkte wurden schließlich in einem Sequenzierwell aufgefangen, das zuvor mit 13 µl HiDi-Formamid proWell gefüllt worden war und bei -20°C gelagert. Die Sequenzierung erfolgte anschließend mit einem automatischen DNA-Sequencer.

### 2.3.9 Auswertung der Sequenzierung

Die erhaltenen Elektropherogramme wurden zur Auswertung mit dem Programm „SEQUENCHER 4.1“ mit der Referenzsequenz verglichen, welche aus der Datenbank NCBI Gene ([www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene)) entnommen wurde.

### 2.3.10 Katheterablation und Follow-up

Die Ablation erfolgte durch das ärztliche Personal der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie an der Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow, wie vorbeschrieben nach Aufklärung und vorangegangener Nüchternheit von mindestens 8 Stunden.<sup>87</sup> Alle Patienten erhielten vor der Intervention sowohl eine transthorakale als auch transösophageale Echokardiographie, um mögliche atriale Thromben auszuschließen. Nach Etablierung eines venösen Zugangs durch die Venae femoralis und doppelter transseptaler Punktion unter radiologischer

Durchleuchtung, wurden ein wassergekühlter Ablationskatheter (NAVISTAR Thermocool, Biosense Webster, Diamond Bar, CA, USA oder CoolPath, IBI/St. Jude Medical, St. Paul, MN, USA) sowie ein zirkumferentieller Mappingkatheter (Lasso, Biosense Webster, oder Optima, IBI/St. Jude Medical, Connecticut, USA) im linken Vorhof positioniert. Nun wurde eine Angiographie des Vorhofs und der Pulmonalvenen unter Adenosin-induzierter Asystolie durchgeführt. Die Geometrie des Vorhofs wurde durch ein 3D-Kartierungs-System rekonstruiert (CARTO, Biosense Webster, oder Ensite NavX, ST. Jude Medical). Die zirkumferentielle Pulmonalvenenablationen wurden mit Hilfe des wassergekühlten Ablationskatheters (3,5 mm) und eines Stockert 70 Radiofrequenz-Generators (Biosense Webster) durchgeführt. Die maximale Temperatur betrug 43 °C und die Leistung maximal 35 Watt. Als Endpunkt der Intervention galt eine komplette Isolation der Pulmonalvenen. In dieser Arbeit wurden Erstablationen betrachtet.

Die Patienten wurden 3, 12 und 24 Monaten postinterventionell in der kardiologischen Ambulanz durch das ärztliche Personal nachuntersucht. Neben einem 12-Kanal-EKG wurde auch ein Langzeit-EKG durchgeführt bzw. bei Vorhandensein eines implantierten Rekorders die Daten ausgelesen. Außerplanmäßige Untersuchungen fanden statt, wenn Patienten über VHF-verdächtige Symptome klagten. VHF-Episoden, die länger als 30 Sekunden andauerten, wurden als Rezidiv angesehen. Geschah dies innerhalb der ersten drei Monate nach Ablation, galt dies noch nicht als Rezidiv. Eine vormals eingenommene antiarrhythmische Medikation wurde die ersten drei Monate nach der Intervention fortgesetzt und danach ausgeschlichen. Im Falle einer Wiederkehr des VHF mit einer Dauer > 48 Stunden und/oder klinischen Symptomen wurde eine elektrische Kardioversion durchgeführt, während eine evtl. zusätzliche oder erneute medikamentöse Therapie durch den zuständigen Arzt eingeleitet wurde.

## **2.4 Benennung von Varianten**

Bei der Nomenklatur der gefundenen Varianten wurde sich an den Empfehlungen der Human Gene Variant Society ([www.hgvs.org](http://www.hgvs.org)) gehalten. Dabei werden Varianten auf Ebene der kodierenden DNA mit „c“ (cDNA) und Varianten auf Proteinebene mit „p“ gekennzeichnet. Auf cDNA-Ebene werden die Varianten im Format „c.112A>G“ angegeben. Die Zahl (112) beschreibt die Position in der cDNA und die

Buchstabenkombination das Nukleotid. Das Zeichen „>“ beschreibt einen Basenaustausch.

Auf Proteinebene wird die obengenannte Variante im Format „p.S38G“ bzw. „p.Ser38Gly“ wiedergegeben. Die Zahl steht für die Position der Variante im Protein. Die vor der Zahl stehende AS beschreibt den Wildtyp, die AS nach der Zahl die Variante. Die betreffenden AS werden hier durch Buchstaben oder einen dreiteiligen Buchstabencode abgekürzt (siehe Abkürzungsverzeichnis).

Die Benennung der Position innerhalb des Basenstrangs bzw. der Aminosäuresequenz erfolgt nach GRCh38. Hierbei handelt es sich um die humane Referenzsequenz des Genome Referenz Konsortiums (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/assembly/grc/human/>), die weltweit in Datenbanken genutzt wird. Bis 2013 wurde GRCh37 genutzt, durch die Umstellung kommt es nun teilweise zu neuen Lokalisationsangaben. Sofern relevant, da beispielsweise vorherige Publikationen noch die alte Einteilung nutzen, wird die ältere Bezeichnung in Klammern aufgeführt.

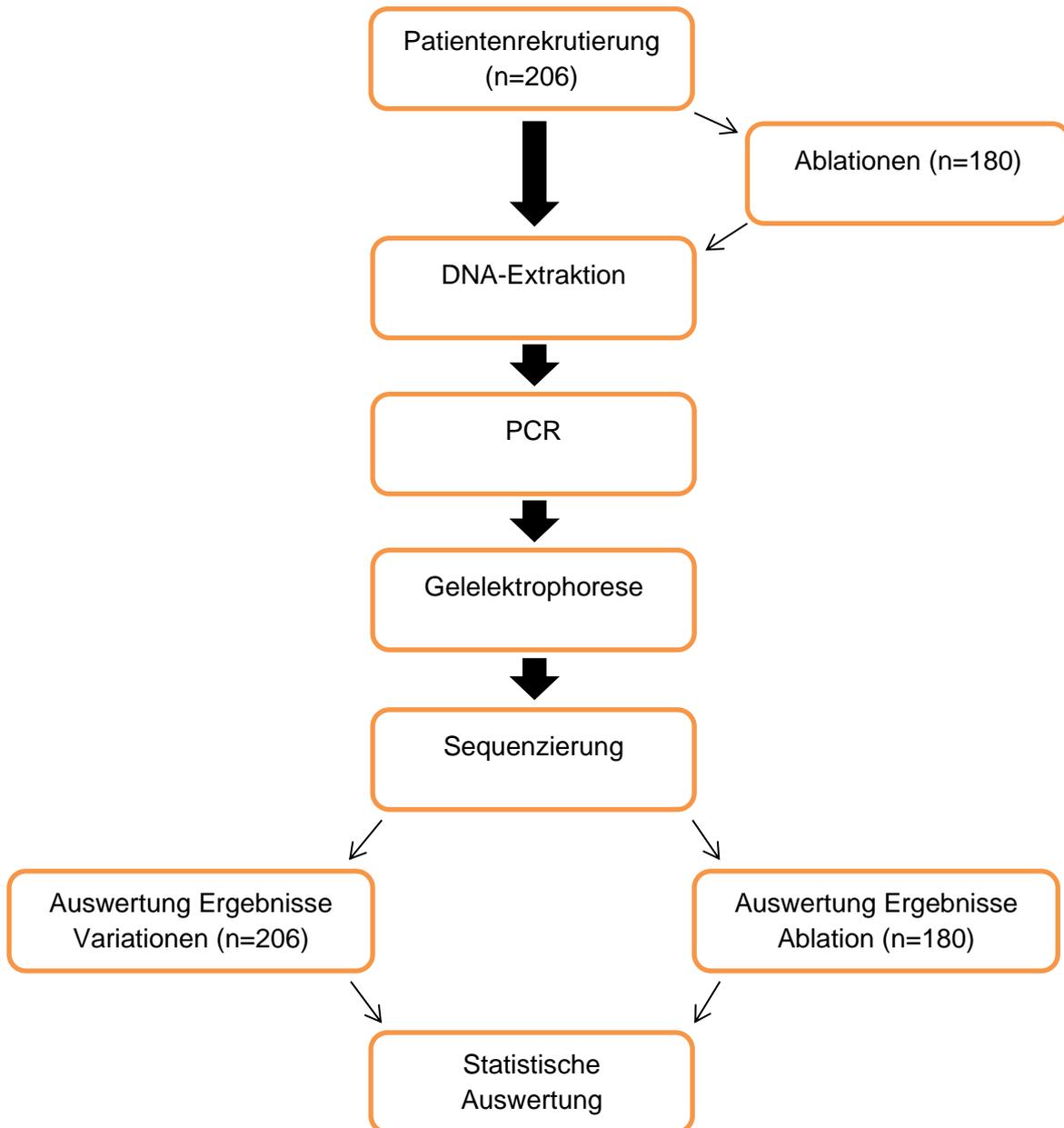
## 2.5 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software IBM SPSS Statistics 22.0. Die erfassten Daten der Patienten sowie die gefundenen Genotypen wurden in Tabellen eingegeben. Die Häufigkeiten und Mediane wurden durch das Programm errechnet und in Tabellen und Diagrammen dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels Chi<sup>2</sup>-Test ermittelt. Die Ermittlung der Odds Ratios (OR) erfolgte zur Kontrolle zusätzlich mit Hilfe eines Online-Tools ([https://www.medcalc.org/calc/odds\\_ratio.php](https://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php)). Zusätzlich zum Vergleich der Genotypen wurden auch dominante bzw. rezessive Modelle für alle nsSNPs berechnet. Eine Konsultation mit dem Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie der Charité Universitätsmedizin Berlin, fand im Anschluss an die statistischen Berechnungen statt. Für die nicht-synonymen Varianten wurde die Gültigkeit des Hardy-Weinberg-Gesetzes überprüft (<http://www.tufts.edu/~mcourt01/Documents/Court%20lab%20-%20HW%20calculator.xls>).

Die HARDY-WEINBERG-Verteilung gibt das Zahlenverhältnis der Genotypen in einer Population aus diploiden Organismen bei verschiedenen Allelfrequenzen an einem Locus an und besagt, dass genetische Variationen in einem idealisierten Modell über

die Generationen gleich bleiben. Dazu müssen bestimmte Voraussetzungen gegeben sein (u.a. bisexuelle Fortpflanzung in der Population, gleiche Allelfrequenzen bei männlichen und weiblichen Mitgliedern der Population, Zufallspaarung, keine neuen Mutationen oder Genimport oder –export). Liegt eine Population nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, muss davon ausgegangen werden, dass nicht alle Voraussetzungen erfüllt sind.

## 2.6 Fließschema zum Arbeitsablauf



### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs

206 Patienten entsprachen den Auswahlkriterien und wurden in die Studie eingeschlossen. Eine Übersicht des Patientenkollektivs kann Tabelle 4.1 entnommen werden.

Geschlecht männlich/weiblich	142 (68.9 %) / 64 (31.1 %)
Max Alter / min. Alter bei ED (in Jahren)	75/10
Ø-Alter bei ED (in Jahren)	50.3 ± 11.7
Medianes Alter bei ED (in Jahren)	52.5
Medianer BMI (in kg)	26.2
Mediane Größe (in cm)	178
Ø RR systolisch (mmHg)	120.1 ± 14.6
Ø RR diastolisch (mmHg)	73.5 ± 9.4
Ø LA-Diameter (in mm)	40.9 ± 5
LVEF (%)	59.4 ± 5.3
Arterieller Hypertonus	75/206 (36.4 %)
VHF-Art	
Erste Episode	1/206 (0.5 %)
paroxysmal	145/206 (70.4 %)
persistierend	60/206 (29.1 %)
Ablation durchgeführt	180/206

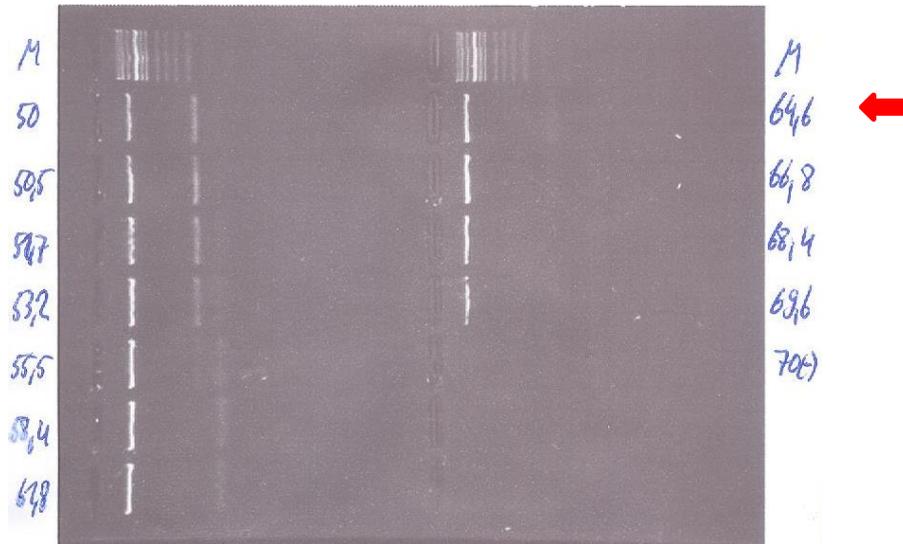
Tabelle 3.1: Eigenschaften des Patientenkollektivs

#### 3.2 PCR-Optimierung

Alle Primer wurden wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben einer Optimierung unterzogen. Exemplarisch für alle Primerpaare sollen im Folgenden die Ergebnisse am Beispiel KCNE3 detailliert dargestellt werden. Eine Übersicht aller Ergebnisse der PCR-Optimierung wird in Tabelle 3.2 dargestellt.

Bei der Betrachtung des PCR-Gradienten von KCNE3 nach 40 Zyklen in Abbildung 3.1 sind bei fast allen Temperaturen gut sichtbare Banden zu erkennen. Allerdings zeigen sich insbesondere bei niedrigeren Annealing-Temperaturen unscharfe Banden als Folge von Nebenprodukt. Bei höheren Temperaturen nimmt die Stärke der Bande

wiederum ab. In diesem Beispiel wurden 40 Zyklen und eine Temperatur von 65 °C als zukünftige Einstellung gewählt, da bei 64,6 °C eine kräftige Bande bei gleichzeitig kaum vorhandenem Nebenprodukt besteht.



**Abbildung 3.1:** PCR-Produkt des Primerpaares für KCNE3 nach 40 Zyklen. M=Marker VIII, 70(-)= Negativprobe bei 70 °C

Die Anwendung der so ermittelten Einstellungen für die Zyklusanzahl und Temperatur für die PCR bestätigten die Richtigkeit der Parameter (siehe Abb. 3.2)



**Abbildung 3.2:** PCR-Produkt von KCNE3 nach Anwendung ermittelter Temperatur- und Zykluseinstellungen (Pfeil = Marker VIII)

Nach gleicher Art erfolgte die Optimierung der PCR für alle genannten Primerpaare. Bei KCNE5 war es nötig, die Anzahl der Zyklen auf 37 zu reduzieren. Somit konnten

im Gegensatz zu 40 Zyklen kräftigere Banden ohne viel Nebenprodukt erreicht werden. Eine Übersicht über die Ergebnisse der PCR-Optimierung gibt Tabelle 3.2.

KCNE-Primer	Zyklen	Annealing-T
1.1	40	67 °C
1.2	40	67 °C
2.1	40	57 °C
2.2	40	62 °C
3	40	65 °C
4	40	67 °C
5	37	60 °C

### 3.3 Auswertung der Sequenzierungen der Patienten

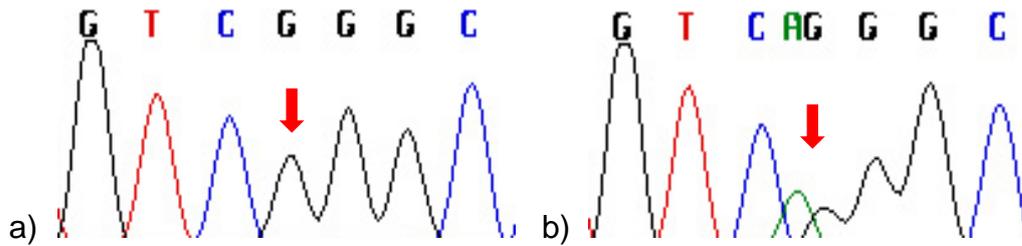
Es wurden insgesamt fünf verschiedene synonyme Einzelnukleotid-Polymorphismen (sSNPs) und acht verschiedene nicht-synonyme Einzelnukleotid-Polymorphismen (nsSNPs) gefunden. Als SNP bezeichnet man den Austausch einer Base der DNA-Sequenz. Unterschieden wird zwischen sSNPs, bei denen der Basenaustausch keine Veränderung der Aminosäuresequenz bewirkt und nsSNPs, bei welchen durch den Basenaustausch das Basentriplett so verändert wird, dass die hierdurch kodierte Aminosäure eine andere ist als zuvor.

Alle gefundenen Variationen sind vorbeschrieben. Neue Mutationen konnten nicht identifiziert werden.

#### 3.3.1 KCNE1

##### *3.3.1.1 Synonyme Variationen*

Ein Patient zeigte den sSNP rs17173510, bei dem die Base Guanin an Position 84 der cDNA durch Adenin ersetzt wird (c.84G>A). Die Änderung des Basentriplets von TCG zu TCA bleibt ohne Folgen für die Aminosäuresequenz. Es handelt sich um eine heterozygote Variante.



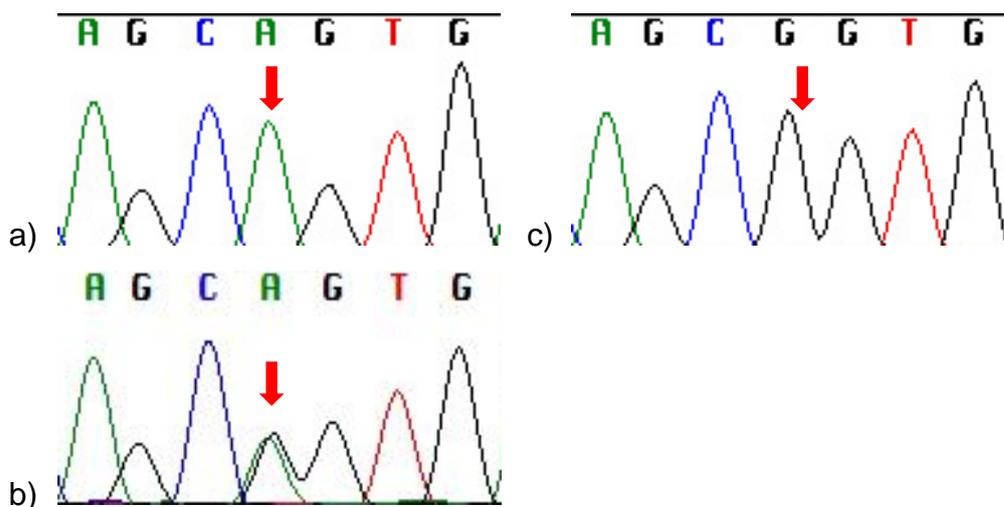
**Abbildung 3.3:** Chromatogramm der Variante c.84G>a. a) Wildtyp GG b) Heterozygotie AG

### 3.3.1.2 Nicht-synonyme Variationen

Die nicht-synonyme Varianten rs1805127, rs1805128 und rs150454912 konnten identifiziert werden. Die Genotypenverteilung befand sich in allen drei Fällen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

#### rs1805127

Bei rs1805127 wird Adenin durch Guanin an der 112. Position der cDNA ersetzt. Infolgedessen verändert sich auch die Aminosäuresequenz, indem Serin und Glycin an Position 38 ausgetauscht werden.



**Abbildung 3.4:** Chromatogramm der Variante c.112A>G (p.Ser38Gly). a) Wildtyp AA b) Heterozygotie AG c) Homozygotie GG

Bei der Verteilung der Genotypen und Allele zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der untersuchten VHF-Kohorte und der Kontrollpopulation des 1000-Genome-Projekts.

rs1805127		VHF	1000-Genome	p-Wert
<b>c.112A&gt;G</b> (p.Ser38Gly)	AA	26 (12.6 %)	67 (13.3 %)	0.946
	AG	99 (48.1 %)	244 (48.5 %)	
	GG	81 (39.3 %)	192 (38.2 %)	
<b>Allelverteilung</b>	A	151 (36.7 %)	378 (37.6 %)	0.744
	G	261 (63.3 %)	628 (62.4 %)	

**Tabelle 3.3:** Genotypen- und Allelverteilung von c.112A>G bei Patienten mit VHF und in der Kontrollpopulation

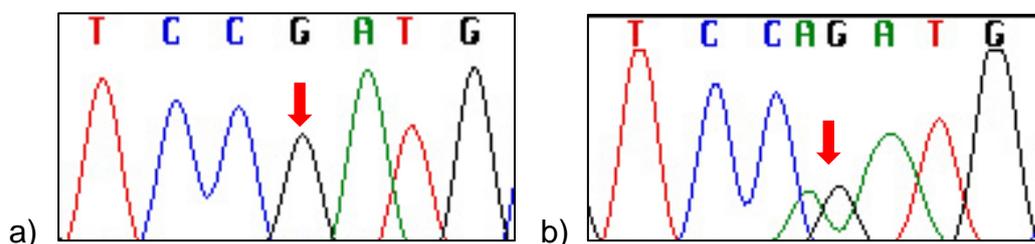
Im dominanten und rezessiven Modell konnte ebenfalls kein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden.

rs1805127	OR (95 % KI)	p-Wert
<b>c.112A&gt;G</b> (p.Ser38Gly)		
Dominant (AA/AG vs. GG)	1.064 (0.655-1.728)	0.802
Rezessiv (AA vs. AG/GG)	1.050 (0.753-1.464)	0.775

**Tabelle 3.4:** Interaktion zwischen VHF und rs1805127 im dominanten und rezessiven Modell. (OR = Odds Ratio; 95 % KI = 95 %-Konfidenzintervall)

### rs1805128

Bei der Variation rs1805128 kommt es an Position 253 der cDNA zu einem Austausch von Guanin durch Adenin. In der Aminosäureabfolge wird Aspartat an Position 85 nun durch Asparagin ersetzt. Es konnten neben dem Wildtyp 5 heterozygote Genotypen erfasst werden.



**Abbildung 3.5:** Chromatogramm der Variante c.253G>A (p.Asp38Asn). a) Wildtyp GG b) Heterozygotie AG

Bei der Verteilung der Genotypen sowie der Allele konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der untersuchten VHF-Kohorte und der Kontrollpopulation des 1000-Genome-Projekts nachgewiesen werden.

rs1805128		VHF	1000-Genome	p-Wert
<b>c.253G&gt;A</b> (p.Asp85Asn)	GG	201 (97.6%)	494 (98.2 %)	0.579
	AG	5 (2.4 %)	9 (1.8 %)	
<b>Allele</b>	G	407 (98.8 %)	997 (99.1 %)	0.581
	A	5 (1.2 %)	9 (0.9 %)	

**Tabelle 3.5:** Genotypen- und Allelverteilung von c.253G>A bei Patienten mit VHF und in der Kontrollpopulation

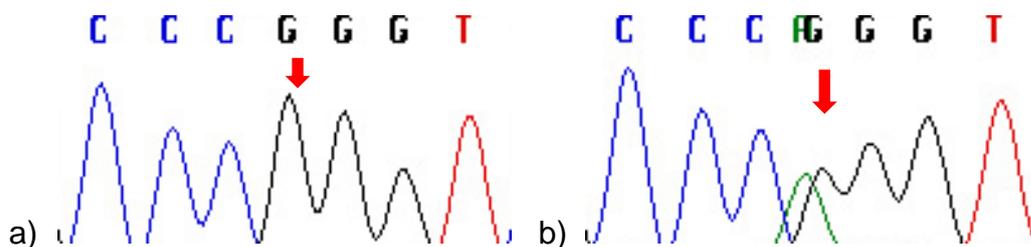
Im dominanten Modell zeigte sich kein Unterschied zwischen dem untersuchten Kollektiv und der Kontrollpopulation. Ein rezessives Modell konnte wegen fehlender Homozygotie der Variante (Genotyp AA) nicht berechnet werden.

rs1805128	OR (95 % KI)	p-Wert
<b>c.253G&gt;A</b> (p.Asp85Asn)		
Dominant (AG vs. GG)	1.365 (0.452-4.124)	0.581

**Tabelle 3.6:** Interaktion zwischen VHF und rs1805128 im dominanten Modell. (OR = Odds Ratio; 95 % KI = 95 %-Konfidenzintervall)

### rs150454912

Die Variation mit der ID rs150454912 geht auf den Ersatz von Guanin durch Adenin an der 293. Stelle der cDNA zurück. Auf Proteinebene wird Arginin durch Glutamin auf Höhe der 98. Aminosäure des Proteins ersetzt. Bei einer Patientenprobe ließ sich ein heterozygoter Genotyp nachweisen.



**Abbildung 3.6:** Chromatogramm der Variante c.293G>A (p.Arg98Gln). a) Wildtyp GG b) Heterozygotie AG

Zu diesem nsSNP standen keine Daten aus dem 1000-Genome-Projekt zur Verfügung. Deshalb wurde auf die Datenbank des NHLBI Exom-Sequenzierungs-Projekt (ESP6500) zurückgegriffen. Sowohl bei der Verteilung der Genotypen als auch der Allele konnte die Variante signifikant häufiger nachgewiesen werden.

rs150454912		VHF	NHLBI (ESP6500)	p-Wert
<b>c.293G&gt;A</b> (p.Arg98Gln)	GG	205 (99.5 %)	4299 (100 %)	0.002
	AG	1 (0.5 %)	1 (0 %)	
<b>Allele</b>	G	411 (99.8 %)	8599 (100 %)	0.002
	A	1 (0.2 %)	1 (0 %)	

**Tabelle 3.7:** Genotypen- und Allelverteilung von c.293G>A bei Patienten mit VHF und in der Kontrollpopulation

Auch im dominanten Modell zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen dem untersuchten Kollektiv und der Kontrollpopulation. Ein rezessives Modell konnte wegen fehlender Homozygotie der Variante (Genotyp AA) nicht berechnet werden.

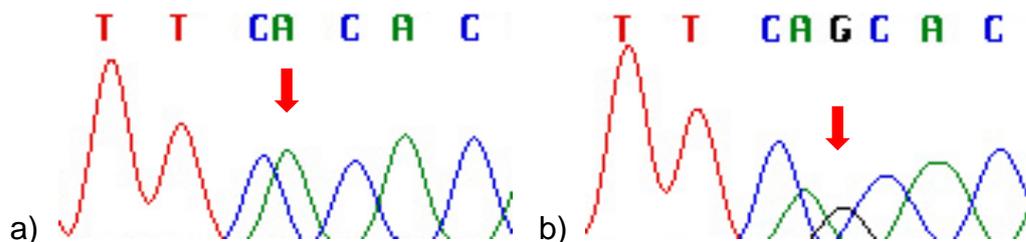
rs150454912	OR (95 % KI)	p-Wert
<b>c.293G&gt;A</b> (p.Arg98Gln)		
Dominant (AG vs. GG)	20.970 (1.307-336.476)	0.035

**Tabelle 3.8:** Interaktion zwischen VHF und rs150454912 im dominanten Modell. (OR = Odds Ratio; 95 % KI = 95 %-Konfidenzintervall)

### 3.3.2 KCNE2

#### 3.3.2.1 Nicht-synonyme Variationen

Im Bereich von KCNE2 konnte der nsSNP rs2234916 nachgewiesen werden. Hierbei kommt es zu einem Austausch von Adenin und Guanin an Position 22 der cDNA mit der Konsequenz, dass Threonin und Alanin an achter Stelle der Aminosäuresequenz ausgetauscht werden. Sechs Patienten zeigten einen heterozygoten Genotyp. Die Verteilung der Genotypen erfüllte das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.



**Abbildung 3.7:** Chromatogramm der Variante c.22A>G (p.Trh8Ala). a) Wildtyp AA b) Heterozygotie AG

Bei der Genotypen- und Allelverteilung zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der untersuchten VHF-Kohorte und der Kontrollpopulation.

rs2234916		VHF	1000-Genome	p-Wert
<b>c.22A&gt;G</b> (p.Thr8Ala)	AA	200 (97.1 %)	496 (98.6 %)	0.171
	AG	6 (2.9 %)	7 (1.4 %)	
<b>Allele</b>	A	406 (98.5 %)	999 (99.3 %)	0.173
	G	6 (1.5 %)	7 (0.7 %)	

**Tabelle 3.9:** Genotypen- und Allelverteilung von c.22A>G bei Patienten mit VHF und in der Kontrollpopulation

Das dominante Modell ergab ein erhöhtes Risiko für VHF bei Vorhandensein der Variante. Dieser Unterschied erreichte jedoch nicht das Signifikanzniveau. Ein rezessives Modell konnte wegen fehlender Homozygotie der Variante (Genotyp GG) nicht berechnet werden.

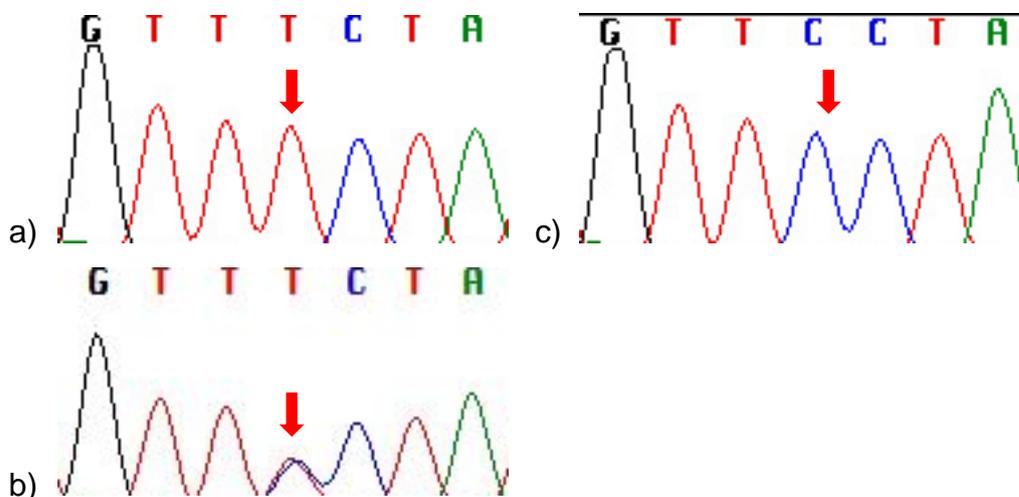
rs2234916	OR (95 % KI)	p-Wert
<b>c.22A&gt;G</b> (p.Thr8Ala)		
Dominant (AG vs. AA)	2.126 (0.706-6.404)	0.180

**Tabelle 3.10:** Interaktion zwischen VHF und rs2234916 im dominanten Modell. (OR = Odds Ratio; 95 % KI = 95 %-Konfidenzintervall)

### 3.3.3 KCNE3

#### 3.3.3.1 Synonyme Variationen

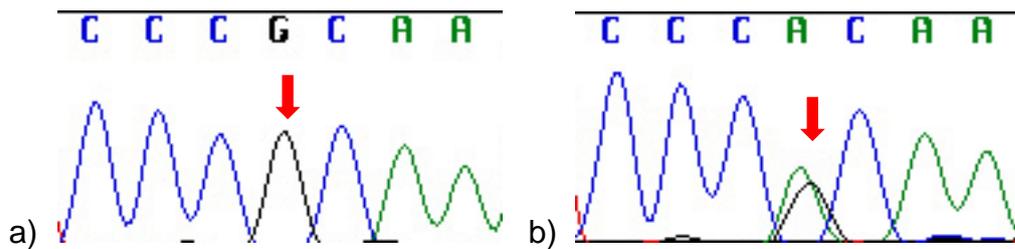
In 56 Fällen konnte der synonyme Polymorphismus rs2270676 nachgewiesen werden. Hierbei wird Thymin durch Cytosin ersetzt (c.198T>C). Dies hat keinen Einfluss auf die durch das Basentriplett kodierte Aminosäure. Die Variation kam zweimal in homozygoter und in 54 Fällen in heterozygoter Form vor.



**Abbildung 3.8:** Chromatogramm der Variante c.198T>C. a) Wildtyp TT b) Heterozygotie CT c) Homozygotie CC

### 3.3.3.2 Nicht-synonyme Variationen

Ebenfalls konnte der nsSNP rs17215437 bei vier Patienten identifiziert werden. An Position 248 der kodierenden DNA von KCNE3 kommt es hierbei zum Austausch von Guanin und Adenin (c.248G>A). In der Folge wird die Aminosäure Arginin durch Histidin an Position 83 der Aminosäurekette ersetzt. Drei heterozygote Genotypen wurden bei der untersuchten Kohorte gefunden. Die Genotyoenverteilung entsprach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.



**Abbildung 3.9:** Chromatogramm der Variante c.248G>A (p.Arg8His). a) Wildtyp GG b) Heterozygotie AG

Bei der Verteilung der Genotypen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der untersuchten VHF-Kohorte und der Kontrollpopulation.

rs17215437		VHF	1000-Genome	p-Wert
<b>c.248G&gt;A</b> (p.Arg83His)	GG	203 (98.5 %)	501 (99.6 %)	0.126
	AG	3 (1.5 %)	2 (0.4 %)	
<b>Allele</b>	G	409 (99.3 %)	1004 (99.8 %)	0.127
	A	3 (0.7 %)	2 (0.2 %)	

**Tabelle 3.11:** Genotypen- und Allelverteilung von c.248G>A bei Patienten mit VHF und in der Kontrollpopulation

Im dominanten Modell konnte ein erhöhtes Risiko für VHF bei Vorliegen der Variation nachgewiesen werden, welches jedoch das Signifikanzniveau nicht erreichte. Ein rezessives Modell konnte wegen fehlender Homozygotie der Variante (Genotyp GG) nicht berechnet werden.

rs17215437	OR (95 % KI)	p-Wert
<b>c.248G&gt;A</b> (p.Arg83His)		
Dominant (AG vs. GG)	3.702 (0.614-22.321)	0.153

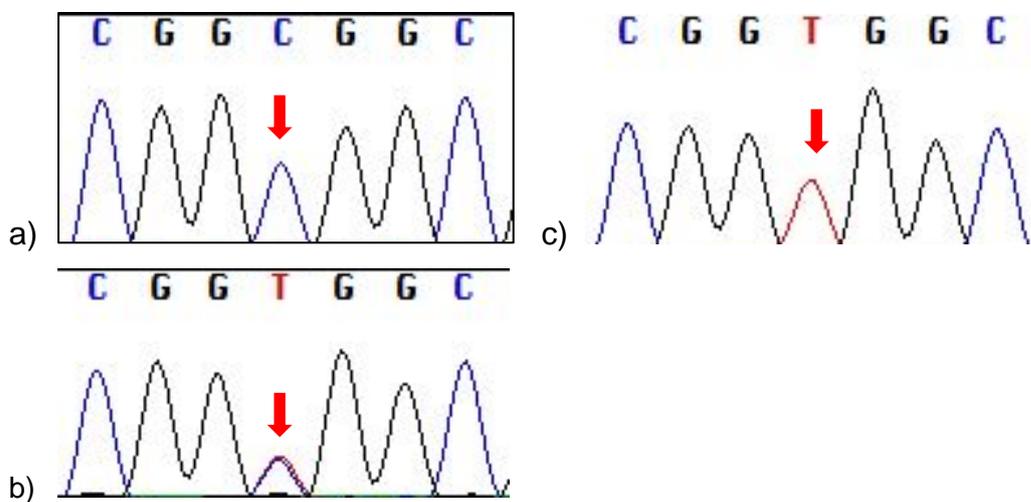
**Tabelle 3.12:** Interaktion zwischen VHF und rs17215437 im dominanten Modell. (OR = Odds Ratio; 95 % KI = 95 %-Konfidenzintervall)

### 3.3.4 KCNE4

#### 3.3.4.1 Synonyme Variationen

##### rs3795886

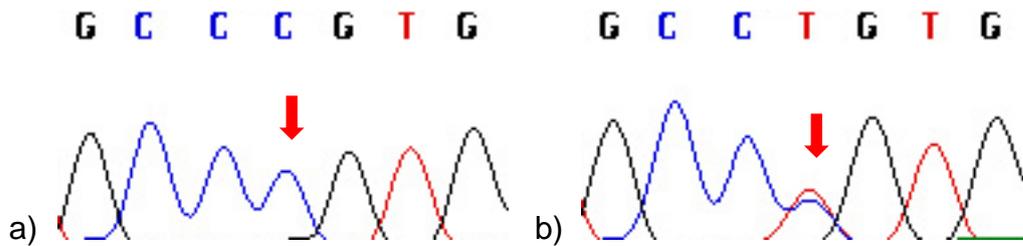
Die synonyme Variation rs3795886 ließ sich bei 192 Patienten und damit in der Mehrzahl der untersuchten Proben nachweisen. Hierbei erfolgt ein Austausch von Cytosin durch Thymin (c.234C>T). Das dadurch veränderte Basentriplett (GGC → GGT) kodiert ebenfalls für die Aminosäure Glycin, die an 78. Stelle der Aminosäuresequenz lokalisiert ist. Die homozygote Variante (Genotyp TT) lag in 101 und der heterozygote Genotyp in 91 Fällen vor.



**Abbildung 3.10:** Chromatogramm der Variante c.234C>T. a) Wildtyp CC b) Heterozygotie CT c) Homozygotie TT

##### rs10201907

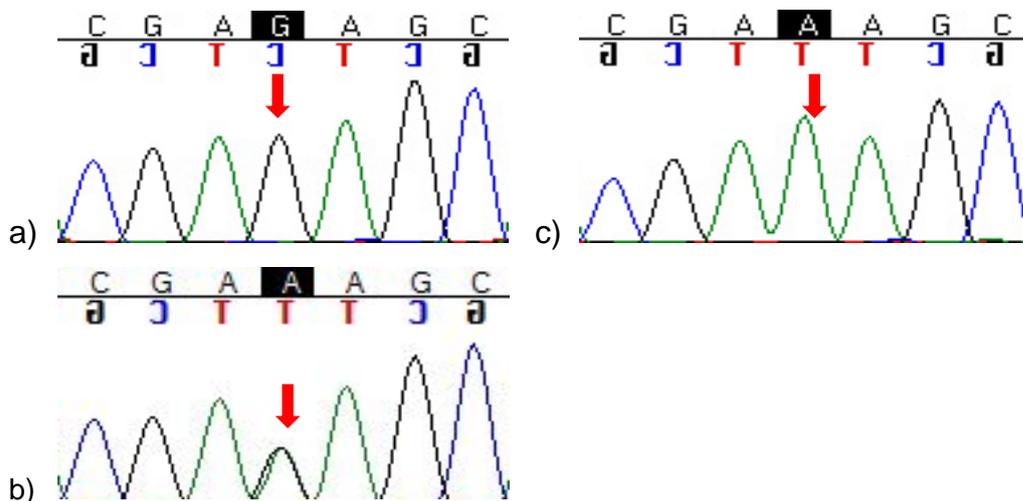
Bei allen Patienten wurde die Variation rs10201907 (c.417T>C) nachgewiesen. Auch hier kommt es durch den Ersatz der Base Thymin durch Cytosin zu einer Änderung des Basentriplets (CCT → CCC), die ohne Konsequenz auf Proteinebene bleibt. Durch beide Triplets wird die Aminosäure Prolin an Stelle 139 kodiert. In 182 Fällen lag der homozygote Genotyp CC vor. Bei den restlichen 24 Patienten ließ sich eine Heterozygotie (Genotyp CT) nachweisen. Der Wildtyp konnte nicht nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.11:** Chromatogramm der Variante c.417T>C. a) Homozygotie CC b) Heterozygotie CT

#### rs17221840

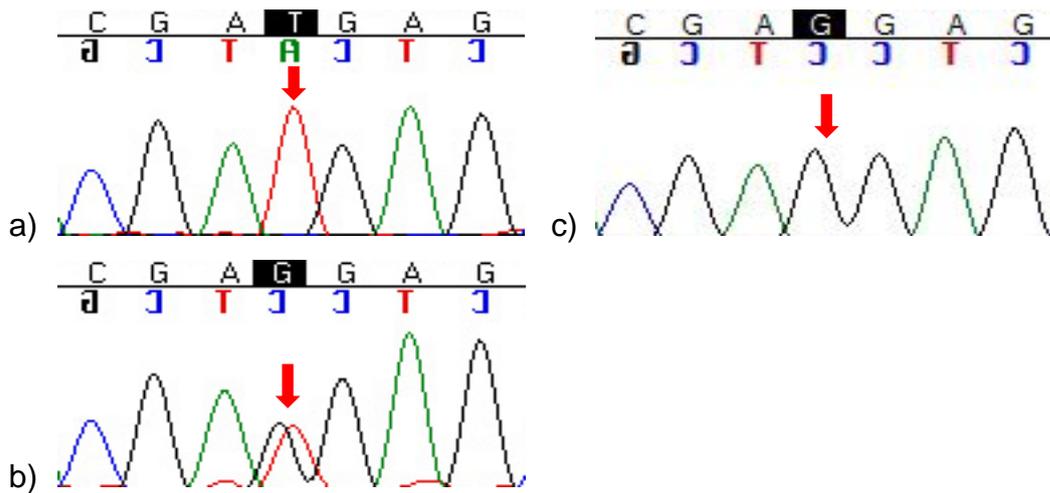
Ebenfalls erfasst werden konnte der synonyme SNP rs17221840, der durch den Basenaustausch von Guanin und Adenin (c.624G>A) gekennzeichnet ist. Die Aminosäure Glutamat an Position 208 bleibt unberührt. 11 Patienten zeigten eine Heterozygotie, eine Probe wies die homozygote Variante auf.



**Abbildung 3.12:** Chromatogramm der Variante c.624G>A. a) Wildtyp GG b) Heterozygotie AG c) Homozygotie AA

#### 3.3.4.2 Nicht-synonyme Variationen

Die einzige, in KCNE4 gefundene und auf Proteinebene für Veränderungen verantwortliche Variation, ist der nsSNP rs12621643. An Position 588 der cDNA kommt es zum Austausch von Thymin und Guanin, worauf hin die Aminosäure Aspartat durch Glutamat an 196. Stelle der Aminosäurekette ersetzt wird. Diese Variante wurde bis einschließlich Ensembl release 69 im Oktober 2012 im Rahmen von GRCh 37 als c488T>G (p.Asp145Glu) aufgeführt. Die Genotypenverteilung entsprach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.



**Abbildung 3.13:** Chromatogramm der Variante c.488T>G. a) Wildtyp TT b) Heterozygotie GT c) Homozygotie GG

Bei der Verteilung der Genotypen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der untersuchten VHF-Kohorte und der Kontrollpopulation.

rs12621643		VHF	1000-Genome	p-Wert
<b>c.588T&gt;G</b> (p.Asp196Glu)	TT	16 (7.8 %)	49 (9.7 %)	0.697
	GT	84 (40.8 %)	197 (39.2 %)	
	GG	106 (51.5 %)	257 (51.1 %)	
<b>Allele</b>	T	116 (28.2 %)	295 (29.3 %)	0.660
	G	296 (71.8 %)	711 (70.7 %)	

**Tabelle 3.13:** Genotypen- und Allelverteilung von c.588T>G bei Patienten mit VHF und in der Kontrollpopulation

Weder unter der Annahme eines dominanten noch rezessiven Vererbungsmusters konnten signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden.

rs12621643	OR (95 % KI)	p-Wert
<b>c.588T&gt;G</b> (p.Asp196Glu)		
Dominant	1.282 (0.711-2.310)	0.409
Rezessiv	1.015 (0.734-1.403)	0.930

**Tabelle 3.14:** Interaktion zwischen VHF und rs12621643 im dominanten und rezessiven Modell. (OR = Odds Ratio; 95 % KI = 95 %-Konfidenzintervall)

### 3.3.5 KCNE5

#### 3.3.5.1 Nicht-synonyme Variationen

Zwei nicht synonyme Variationen konnten im untersuchten Kollektiv nachgewiesen werden.

rs17221840

Beim Polymorphismus rs17003955 wird Cytosin an Position 97 durch Thymin ersetzt (c.97C>T). Als Konsequenz kommt es an Position 33 der Aminosäuresequenz zu einem Austausch von Prolin und Serin (p.Pro33Ser). Die Genotypenverteilung lag nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht vor.

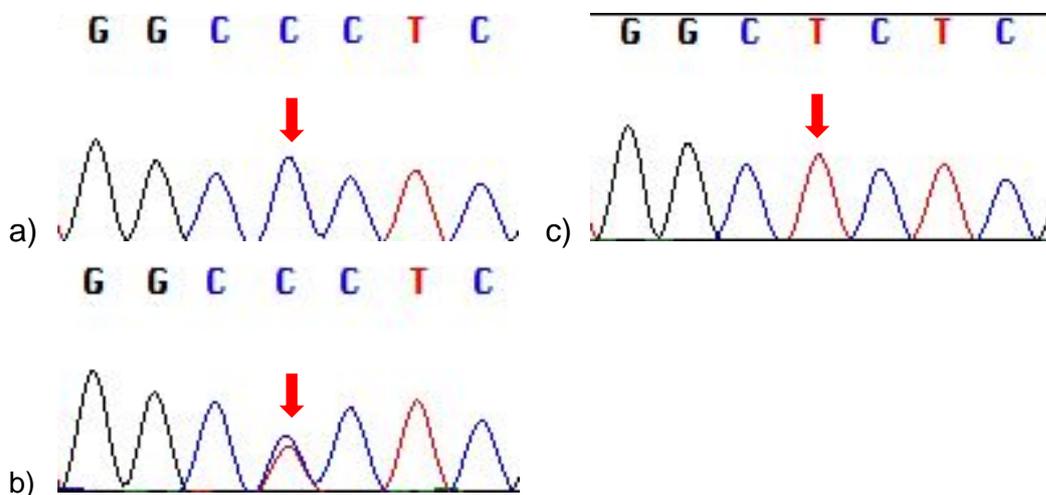


Abbildung 3.14: Chromatogramm der Variante c.97C>T. a) Wildtyp TT b) Heterozygotie CT c) Homozygotie CC

Zu diesem nsSNP standen keine Daten aus dem 1000-Genome-Projekt zur Verfügung. Deshalb wurde auf die Datenbank des NHLBI Exome-Sequenzierungs-Projekt (ESP6500 European\_American) zurückgegriffen. Der Wildtyp (Genotyp CC) trat im Vergleich zum untersuchten Kollektiv signifikant häufiger in der Kontrollpopulation auf, während für den Genotyp TT umgekehrtes gilt (CC: 71.6 % bei VHF vs. 78.5 % in der Kontrollpopulation, TT: 15.2 % vs. 7.5 %). Auch die Verteilung der Allele divergiert signifikant (C: 78.2% bei VHF vs. 85.8% in der Kontrollpopulation, T: 21.8% vs. 14.2%). Jedoch muss bedacht werden, dass KCNE5 auf dem X-Chromosom lokalisiert ist, weshalb männliche Patienten hemizygot sind und nur ein Allel besitzen. In diesem Modell wurden männliche Genotypen entsprechend den weiblichen Genotypen (z.B. CC anstatt C) behandelt. Zwei männliche Patienten hatten einen heterozygoten Genotyp und wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

rs17003955		VHF	NHLBI (ESP6500)	p-Wert
<b>c.97C&gt;T</b> (p.Pro33Ser)	CC	146 (71.6 %)	3332 (78.5 %)	<0.001
	CT	27 (13.2 %)	595 (14.0 %)	
	TT	31 (15.2 %)	316 (7.5 %)	
<b>Allele</b>	C	319 (78.2 %)	5695 (85.8 %)	<0.001
	T	89 (21.8 %)	946 (14.2 %)	

**Tabelle 3.15:** Genotypen- und Allelverteilung von c.97C>T bei Patienten mit VHF und in der Kontrollpopulation (Genotypen: n=204, Allele: n=408)

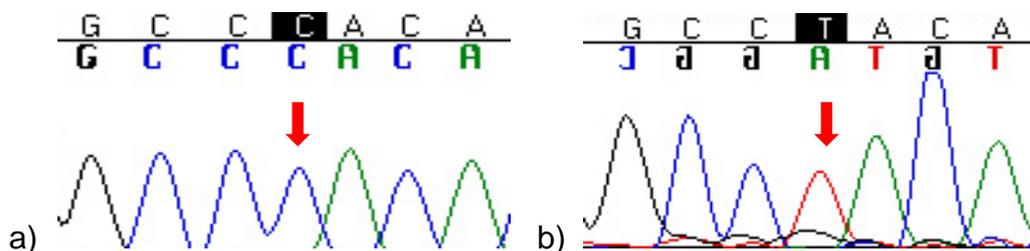
Sowohl die Annahme eines dominanten als auch eines rezessiven Vererbungsmusters bestätigten signifikant ein erhöhtes Risiko für VHF bei Vorliegen der Variation.

rs17003955	OR (95 % KI)	p-Wert
<b>c.97C&gt;T</b> (p.Pro33Ser)		
Dominant (TT/CT vs. CC)	1.453 (1.063-1.987)	0.019
Rezessiv (TT vs. CT/CC)	2.227 (1.494-3.319)	<0.001

**Tabelle 3.16:** Interaktion zwischen VHF und rs17003955 im dominanten und rezessiven Modell. (OR = Odds Ratio; 95 % KI = 95 %-Konfidenzintervall)

#### rs199924386

Bei einem männlichen Patienten asiatischer Herkunft konnte der Polymorphismus rs199924386 nachgewiesen werden. Hierbei wird Thymin an Position 241 durch Cytosin ersetzt (c.241T>C). Dadurch ändert sich die Aminosäure an Position 81, da Histidin nun an Stelle von Tyrosin eingebaut wird (p.Tyr81His).



**Abbildung 3.15:** Chromatogramm der Variante c.241T>C. a) Wildtyp CC b) Homozygotie TT

Es konnten keine Populationsstudien gefunden werden, die einen Vergleich der Verteilungen der Genotypen zulassen.

### 3.4 Ablationsergebnisse

Von 206 eingeschlossenen Patienten mit VHF wurde bei 180 Personen eine Ablation durchgeführt. Auswertbare Daten bezüglich des Therapieerfolgs nach 12 und 24 Monaten lagen in 169 bzw. 159 Fällen vor. Nach 12 Monaten konnte bei 66,3 % der Patienten ein anhaltender Erfolg der Intervention festgestellt werden. Nach 24 Monaten lag die Erfolgsrate bei 56,6 %.

Geschlecht männlich/weiblich	126 (70 %) / 54 (30 %)
Max Alter / min. Alter bei ED (in Jahren)	74 / 17
Ø-Alter bei ED (in Jahren)	50.38 ± 11.33
Medianes Alter bei ED (in Jahren)	52.67
Medianer BMI (in kg)	26.09
Mediane Größe (in cm)	178
Ø RR systolisch (mmHg)	119.66 ± 14.87
Ø RR diastolisch (mmHg)	73.12 ± 8.88
Ø LA-Diameter (in mm)	40.98 ± 4.98
LVEF (%)	58.86 ± 5.33
Ablation erfolgreich 12/24 Monaten	169 (66,3%) / 159 (56,6%)

**Tabelle 3.17:** Baseline-Daten aller Ablationen (n=180)

#### 3.4.1 KCNE1

##### *rs1805127*

Der Polymorphismus rs1805127 (c.112A>G; p.Ser38Gly) wies sowohl nach 12 als auch nach 24 Monaten keine Assoziation mit dem Auftreten von Rezidiven auf. Die zusammengefassten Ergebnisse nach 12 Monaten und 24 Monaten werden in Tabelle 3.18 bzw. 3.19 dargestellt.

<b>rs1805127</b>	<b>Rezidiv</b>	<b>Kein Rezidiv</b>	<b>p-Wert</b>
AA	5 (23.8 %)	16 (76.2 %)	
AG	28 (34.6 %)	53 (65.4 %)	

GG	24 (35.8 %)	43 (64.2 %)	
<b>Gesamt</b>	<b>57 (33.7 %)</b>	<b>112 (66.3 %)</b>	0.582
<b>Allele</b>			
A	38 (30.9 %)	85 (69.1 %)	
G	76 (65.3 %)	139 (64.7 %)	
<b>Gesamt</b>	<b>114 (33.7 %)</b>	<b>224 (66.3 %)</b>	0.405

**Tabelle 3.18:** Übersicht Ablationserfolge nach 12 Monaten bei rs1805127 (n=169)

rs1805127	Rezidiv	Kein Rezidiv	p-Wert
AA	7 (36.8 %)	12 (63.2 %)	
AG	35 (46.1 %)	41 (53.9 %)	
GG	27 (42.2 %)	37 (57.8 %)	
<b>Gesamt</b>	<b>69 (43.4 %)</b>	<b>90 (56.6 %)</b>	0.745
<b>Allele</b>			
A	49 (43.0 %)	65 (57.0 %)	
G	89 (43.6 %)	115 (56.4 %)	
<b>Gesamt</b>	<b>138 (43.4 %)</b>	<b>180 (56.6 %)</b>	0.911

**Tabelle 3.19:** Übersicht Ablationserfolge nach 24 Monaten für rs1805127 (n=159)

Auch im dominanten und rezessiven Modell konnte kein Einfluss auf die Rezidivrate festgestellt werden (Tabelle 3.20).

rs1805127	Rezidivrate VHF	p-Wert	OR (95 % KI)
12 Monate (n=169)			
dominant		0.304	1.733 (0.601-5.000)

	AA	5 (23.8 %)		
	GG/AG	52 (35.1 %)		
rezessiv			0.641	1.167 (0.610-2.234)
	AA/AG	33 (32.4 %)		
	GG	24 (35.8 %)		
<i>24 Monate (n=159)</i>				
dominant			0.539	1.363 (0.506-3.667)
	AA	7 (36.8 %)		
	GG/AG	62 (44.3 %)		
rezessiv			0.801	0.921 (0.485-1.747)
	AA/AG	42 (44.2 %)		
	GG	27 (42.2 %)		

**Tabelle 3.20:** Ablationserfolge nach 12 und 24 Monaten im dominanten und rezessiven Modell für rs1805127  
(OR = Odds Ratio; 95 % KI = 95 %-Konfidenzintervall)

### rs1805128

Die Variation rs1805128 (c.253G>A, p.Asp85Asn) wies sowohl nach 12 als auch nach 24 Monaten keinen Zusammenhang mit Rezidiven auf.

rs1805128	Rezidiv	Kein Rezidiv	p-Wert
GG	57 (34.5 %)	108 (65.5 %)	
AG	0 (0.0 %)	4 (100 %)	
<b>Gesamt</b>	<b>57 (33.7 %)</b>	<b>112 (66.3 %)</b>	0.149
<b>Allele</b>			
G	114 (34.1 %)	220 (65.9 %)	
A	0 (0.0 %)	4 (100 %)	
<b>Gesamt</b>	<b>114 (33.7 %)</b>	<b>224 (66.3 %)</b>	-

**Tabelle 3.21:** Übersicht Ablationserfolge nach 12 Monaten für rs1805128 (n=169)

rs1805128	Rezidiv	Kein Rezidiv	p-Wert
GG	68 (43.9 %)	87 (56.1%)	
AG	1 (25.0 %)	3 (75.0%)	

<b>Gesamt</b>	<b>69 (43.4 %)</b>	<b>90 (56.6%)</b>	0.452
<b>Allele</b>			
G	137 (43.6 %)	177 (56.4 %)	
A	1 (25.0 %)	3 (75.0 %)	
<b>Gesamt</b>	<b>138 (43.4 %)</b>	<b>180 (56.6 %)</b>	-

**Tabelle 3.22:** Übersicht Ablationserfolge nach 24 Monaten für rs1805128 (n=159)

Im dominanten Modell konnte kein signifikanter Einfluss auf die Rezidivrate festgestellt werden. Ein rezessives Modell konnte aufgrund fehlender Homozygotie der Variation nicht berechnet werden.

<b>rs1805128</b>	<b>Rezidivrate VHF</b>	<b>p-Wert</b>	<b>OR (95 % KI)</b>
<i>12 Monate (n=169)</i>			
dominant		0.149	1.528 (1.367-1.707)
AG	0 (0.0 %)		
GG	57 (34.5 %)		
<i>24 Monate (n=159)</i>			
dominant		0.452	0.426 (0.043-4.192)
AG	1 (25.0 %)		
GG	68 (43.9 %)		

**Tabelle 3.23:** Ablationserfolge nach 12 und 24 Monaten im dominanten Modell für rs1805127 (OR = Odds Ratio; 95% KI = 95%-Konfidenzintervall)

### *rs150454912*

Der nsSNP rs150454912 (c.293G>A, p.Arg98Gln) wies sowohl nach 12 als auch nach 24 Monaten keine Assoziation mit dem Auftreten von Rezidiven auf. Die zusammengefassten Ergebnisse nach 12 Monaten und 24 Monaten werden in Tabelle 3.24 bzw. 3.25 dargestellt.

<b>rs150454912</b>	<b>Rezidiv</b>	<b>Kein Rezidiv</b>	<b>p-Wert</b>
GG	57 (33.9 %)	111 (66.1 %)	
AG	0 (0.0 %)	1 (100 %)	

<b>Gesamt</b>	<b>57 (33.7 %)</b>	<b>112 (66.3 %)</b>	0.474
<b>Allele</b>			
G	114 (33.8 %)	223 (66.2 %)	
A	0 (0.0 %)	1 (100 %)	
<b>Gesamt</b>	<b>114 (33.7 %)</b>	<b>224 (66.3 %)</b>	-

**Tabelle 3.24:** Übersicht Ablationserfolge nach 12 Monaten für rs150454912 (n=169)

rs150454912	Rezidiv	Kein Rezidiv	p-Wert
GG	69 (43.7 %)	89 (56.3 %)	
AG	0 (0.0 %)	1 (100 %)	
<b>Gesamt</b>	<b>69 (43.4 %)</b>	<b>90 (56.6 %)</b>	0.380
<b>Allele</b>			
G	138 (43.7 %)	178 (56.3 %)	
A	0 (0.0 %)	2 (100 %)	
<b>Gesamt</b>	<b>138 (43.4 %)</b>	<b>180 (56.6 %)</b>	-

**Tabelle 3.25:** Übersicht Ablationserfolge nach 24 Monaten für rs150454912 (n=159)

Im dominanten Modell konnte kein signifikanter Einfluss auf die Rezidivrate festgestellt werden. Ein rezessives Modell konnte aufgrund fehlender Homozygotie der Variation nicht berechnet werden.

rs150454912	Rezidivrate VHF	p-Wert	OR (95 % KI)
<i>12 Monate (n=169)</i>			
dominant		0.474	1.514 (1.358-1.687)
AG	0 (0.0 %)		
GG	57 (33.9 %)		
<i>24 Monate (n=159)</i>			
dominant		0.380	1.775 (1.548-2.037)
AG	0 (0.0 %)		
GG	69 (43.4 %)		

**Tabelle 3.26:** Ablationserfolge nach 12 und 24 Monaten im dominanten Modell für rs150454912 (OR = Odds Ratio; 95 % KI = 95 %-Konfidenzintervall)

### 3.4.2 KCNE2

Der nsSNP rs2234916 (c.22A>G, p.Thr98A) wies sowohl nach 12 als auch nach 24 Monaten keine Assoziation mit dem Rezidivvorkommen auf. Die zusammengefassten Ergebnisse werden in Tabelle 3.27 bzw. 3.28 dargestellt.

rs2234916	Rezidiv	Kein Rezidiv	p-Wert
AA	57 (34.5 %)	108 (65.5 %)	
AG	0 (0.0 %)	4 (100 %)	
<b>Gesamt</b>	<b>57 (33.7 %)</b>	<b>112 (66.3 %)</b>	0.149
<b>Allele</b>			
A	114 (34.1 %)	220 (65.9 %)	
G	0 (0.0 %)	4 (100 %)	
<b>Gesamt</b>	<b>114 (33.7 %)</b>	<b>224 (66.3 %)</b>	-

Tabelle 3.27: Übersicht Ablationserfolge nach 12 Monaten für rs2234916 (n=169)

rs2234916	Rezidiv	Kein Rezidiv	p-Wert
AA	69 (44.2 %)	87 (55.8 %)	
AG	0 (0.0 %)	3 (100 %)	
<b>Gesamt</b>	<b>69 (43.4 %)</b>	<b>90 (56.6 %)</b>	0.126
<b>Allele</b>			
A	138 (44.2 %)	174 (55.8 %)	
G	0 (0.0 %)	6 (100 %)	
<b>Gesamt</b>	<b>138 (43.4 %)</b>	<b>180 (56.6 %)</b>	-

Tabelle 3.28: Übersicht Ablationserfolge nach 24 Monaten für rs2234916 (n=159)

Im dominanten Modell konnte kein signifikanter Einfluss auf die Rezidivhäufigkeit festgestellt werden. Ein rezessives Modell konnte aufgrund fehlender Homozygotie der Variation nicht berechnet werden (siehe Tabelle 3.29).

<b>rs2234916</b>	<b>Rezidivrate VHF</b>	<b>p-Wert</b>	<b>OR (95 % KI)</b>
<i>12 Monate (n=169)</i>			
dominant		0.149	1.528 (1.367-1.707)
AG	0 (0.0 %)		
AA	57 (34.5 %)		
<i>24 Monate (n=159)</i>			
dominant		0.126	1.793 (1.559-2.062)
AG	0 (0.0 %)		
AA	69 (44.2 %)		

**Tabelle 3.29:** Ablationserfolge nach 12 und 24 Monaten im dominanten Modell für rs2234916 (OR = Odds Ratio; 95 % KI = 95 %-Konfidenzintervall)

### 3.4.3 KCNE3

Der nsSNP rs17215437 (c.248G>A, p.Arg83His) wies sowohl nach 12 als auch nach 24 Monaten keine Korrelation mit dem Auftreten von Rezidiven auf (siehe Tabelle 3.30 und 3.31).

<b>rs17215437</b>	<b>Rezidiv</b>	<b>Kein Rezidiv</b>	<b>p-Wert</b>
GG	57 (34.3 %)	109 (65.7 %)	
AG	0 (0 %)	3 (100 %)	
<b>Gesamt</b>	<b>57 (33.7 %)</b>	<b>112 (66.3 %)</b>	0.212
<b>Allele</b>			
G	114 (34.0 %)	221 (66.0 %)	
A	0 (0.0 %)	3 (100 %)	
<b>Gesamt</b>	<b>114 (33.7 %)</b>	<b>224 (66.3 %)</b>	-

**Tabelle 3.30:** Übersicht Ablationserfolge nach 12 Monaten für rs17215437 (n=169)

<b>rs17215437</b>	<b>Rezidiv</b>	<b>Kein Rezidiv</b>	<b>p-Wert</b>
GG	69 (44.2 %)	87 (55.8 %)	
AG	0 (0.0 %)	3 (100 %)	
<b>Gesamt</b>	<b>69 (43.4 %)</b>	<b>90 (56.6 %)</b>	0.126
<b>Allele</b>			
G	138 (43.8 %)	177 (56.2 %)	
A	0 (0.0 %)	3 (100 %)	
<b>Gesamt</b>	<b>138 (43.4 %)</b>	<b>180 (56.6 %)</b>	-

**Tabelle 3.31:** Übersicht Ablationserfolge nach 24 Monaten für rs17215437 (n=159)

Im dominanten Modell konnte kein signifikanter Einfluss auf die Rezidivrate festgestellt werden. Ein rezessives Modell konnte aufgrund fehlender Homozygotie der Variation nicht berechnet werden (siehe Tabelle 3.32).

<b>rs17215437</b>	<b>Rezidivrate VHF</b>	<b>p-Wert</b>	<b>OR (95 % KI)</b>
<i>12 Monate (n=169)</i>			
dominant		0.212	1.523 (1.364-1.700)
AG	0 (0.0 %)		
GG	57 (34.5 %)		
<i>24 Monate (n=159)</i>			
dominant		0.126	1.793 (1.559-2.062)
AG	0 (0.0 %)		
GG	69 (44.2 %)		

**Tabelle 3.32:** Ablationserfolge nach 12 und 24 Monaten im dominanten Modell für rs17215437 (OR = Odds Ratio; 95% KI = 95%-Konfidenzintervall)

#### 3.4.4 KCNE4

Bei der Variation rs12621643 (c.588T>G, p.Asp196Glu) konnte nach 12 Monaten weder bei den Genotypen noch bei den Allelen eine signifikante Assoziation zu den aufgetretenen Rezidiven nachgewiesen werden. Die zusammengefassten Ergebnisse nach 12 Monaten sind in Tabelle 3.33 dargestellt.

<b>rs12621643</b>	<b>Rezidiv</b>	<b>Kein Rezidiv</b>	<b>p-Wert</b>
TT	5 (50.0 %)	5 (50.0 %)	
GT	28 (38.9 %)	44 (61.1 %)	
GG	24 (27.6 %)	63 (72.4 %)	
<b>Gesamt</b>	<b>57 (33.7 %)</b>	<b>112 (66.3 %)</b>	0.173
<b>Allele</b>			
T	38 (41.3 %)	54 (58.7 %)	
G	76 (30.9 %)	170 (69.1 %)	
<b>Gesamt</b>	<b>114 (33.7 %)</b>	<b>224 (66.3 %)</b>	0.309

**Tabelle 3.33:** Übersicht Ablationserfolge nach 12 Monaten für rs12621643 (n=169)

Nach 24 Monaten scheint der Genotyp GG mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit für ein Rezidiv assoziiert zu sein, während beim Genotyp TT der umgekehrte Fall vorliegt.

Gleiches gilt für die jeweiligen Allele. Die zusammengefassten Ergebnisse nach 24 Monaten können in Tabelle 3.34 betrachtet werden.

rs12621643	Rezidiv	Kein Rezidiv	p-Wert
TT	6 (66.7 %)	3 (33.3 %)	
GT	35 (50.7 %)	34 (49.3 %)	
GG	28 (34.6 %)	53 (65.4 %)	
<b>Gesamt</b>	<b>69 (43.4 %)</b>	<b>90 (56.6 %)</b>	0.048
<b>Allele</b>			
T	47 (54.0 %)	40 (46.0 %)	
G	91 (39.4 %)	140 (60.6 %)	
<b>Gesamt</b>	<b>138 (43.4 %)</b>	<b>180 (56.6 %)</b>	0.019

Tabelle 3.34: Übersicht Ablationserfolge nach 24 Monaten für rs12621643 (n=159)

Abbildung 4.16 stellt den prozentualen Ablationserfolg in Abhängigkeit der Genotypen bei rs12621643 als Diagramm dar.

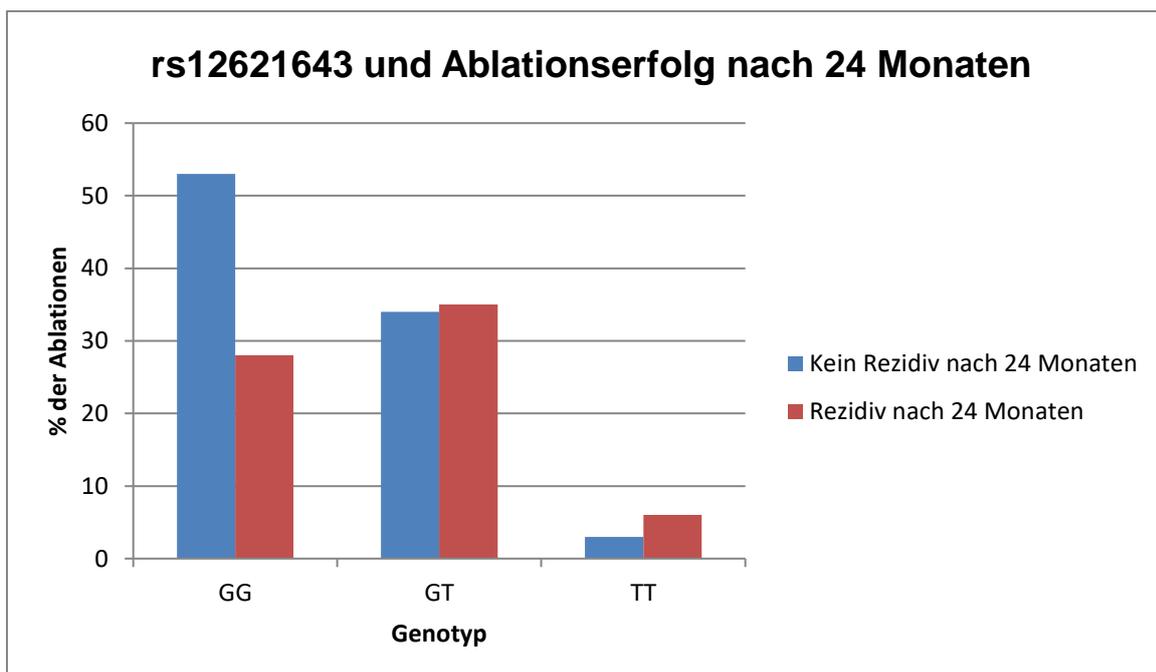


Abbildung 3.16: Prozentualer Ablationserfolg nach Genotypen sortiert 24 Monate nach Ablation bei rs12621643

Im dominanten und rezessiven Modell konnte kein signifikanter Einfluss auf die Rezidivrate festgestellt werden (siehe Tabelle 3.35).

rs12621643	Rezidivrate VHF	p-Wert	OR (95 % KI)
<i>12 Monate (n=169)</i>			
dominant		0.262	0.486 (0.135-1.753)
TT	5 (50 %)		
GG/GT	52 (32.7 %)		
rezessiv		0.082	0.566 (0.297-2.234)
TT/GT	33 (40.2 %)		
GG	24 (27.6 %)		
<i>24 Monate (n=159)</i>			
dominant		0.147	0.362 (0.087-1.078)
TT	6 (66.7 %)		
GG/GT	63 (42.0 %)		
rezessiv		0.022	0.477 (0.252-0.902)
TT/GT	41 (52.6 %)		
GG	28 (34.6 %)		

**Tabelle 3.36:** Ablationserfolge nach 12 und 24 Monaten im dominanten und rezessiven Modell für rs12621643 (OR = Odds Ratio; 95 % KI = 95 %-Konfidenzintervall)

### 3.4.5 KCNE5

#### *rs170039557*

Der Polymorphismus rs170039557 (c.97C>T; p.Pro33Ser) wies eine signifikante Assoziation mit dem Rezidivvorkommen nach 12 Monaten auf. Hier scheint der Genotyp CC mit einer erhöhten Rezidivneigung verknüpft zu sein. Die Untersuchung der Allele ergab keine signifikanten Assoziationen, obwohl das C-Allel prozentual deutlich häufiger in der Patientengruppe mit Rezidiv vorkommt. Wie in Kapitel 3.3.5 beschrieben, wurden die beiden männlichen Teilnehmer mit heterozygotem Genotyp nicht in die Auswertung miteingeschlossen. Bei einem dieser Teilnehmer gab es keine Daten bezüglich des Ablationserfolgs, weshalb die Anzahl n bei 168 nach 12 bzw. 158 nach 24 Monaten liegt. Die zusammengefassten Ergebnisse werden in Tabelle 3.37 bzw. 3.38 dargestellt.

rs170039557	Rezidiv	Kein Rezidiv	p-Wert
CC	44 (37.3 %)	74 (72.7 %)	
CT	2 (9.5 %)	19 (90.5 %)	
TT	10 (34.5 %)	19 (65.5 %)	
<b>Gesamt</b>	<b>56 (33.3 %)</b>	<b>112 (66.7 %)</b>	0.045
<b>Allele</b>			
C	90 (35.0 %)	167 (65.0 %)	
T	22 (27.8 %)	57 (72.2 %)	
<b>Gesamt</b>	<b>112 (33.3 %)</b>	<b>224 (67.7 %)</b>	0.237

Tabelle 3.37: Übersicht Ablationserfolge nach 12 Monaten für rs170039557 (n=168)

rs170039557	Rezidiv	Kein Rezidiv	p-Wert
CC	51 (46.8 %)	58 (53.2 %)	
CT	4 (19.0 %)	17 (81.0 %)	
TT	13 (46.4 %)	15 (53.6 %)	
<b>Gesamt</b>	<b>68 (43.0 %)</b>	<b>90 (57.0 %)</b>	0.058
<b>Allele</b>			
C	106 (44.4 %)	133 (55.6 %)	
T	30 (39.0 %)	47 (61.0 %)	
<b>Gesamt</b>	<b>136 (43.0 %)</b>	<b>180 (57.0 %)</b>	0.406

Tabelle 3.38: Übersicht Ablationserfolge nach 24 Monaten für rs170039557 (n=158)

Im dominanten und rezessiven Modell konnte kein signifikanter Einfluss auf die Rezidivrate festgestellt werden, obwohl auch hier das dominante Modell Hinweise auf ein erniedrigtes Rezidivrisiko im Zusammenhang mit der Variation liefert (siehe Tabelle 3.39).

rs170039557	Rezidivrate VHF	p-Wert	OR (95 % KI)
<i>12 Monate (n=168)</i>			
dominant		0.095	0.531 (0.251-1.123)
CC	44 (37.3 %)		
TT/CT	12 (24.0 %)		
rezessiv		0.885	1.064 (0.458-2.473)
CC/CT	46 (33.1 %)		
TT	10 (34.5 %)		
<i>24 Monate (n=158)</i>			
dominant		0.156	0.604 (0.301-1.215)
CC	51 (46.8 %)		
TT/CT	17 (34.7 %)		
rezessiv		0.690	1.182 (2.684)
CC/CT	55 (42.3 %)		
TT	13 (46.4 %)		

**Tabelle 3.39:** Ablationserfolge nach 12 und 24 Monaten im dominanten und rezessiven Modell für rs170039557 (OR = Odds Ratio; 95 % KI = 95 %-Konfidenzintervall)

## 4. Diskussion

### 4.1 Überblick

In dieser Arbeit wurden 206 strukturell herzgesunde Patienten mit VHF auf Variationen in den Exons von KCNE1 bis KCNE5 untersucht, die mit der Erkrankung in Zusammenhang stehen könnten. Dazu wurden die kodierenden Bereiche sequenziert und ausgewertet. Es ließen sich insgesamt acht nicht-synonyme Varianten mit einhergehender Veränderung auf Proteinebene nachweisen. Zusätzlich konnten fünf synonyme Polymorphismen identifiziert werden, die keinen Einfluss auf die Aminosäuresequenz haben. Neue oder bisher nicht beschriebene Variationen konnten nicht erfasst werden.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden bei den Patienten der obengenannten Kohorte, die eine Ablation erhalten hatten (n=180), untersucht, ob die im ersten Teil der Studie identifizierten nicht-synonymen Variationen einen Einfluss auf den Ablationserfolg nach 12 und 24 Monaten haben. Hier konnte für je eine Variation in KCNE 4 und 5 eine mögliche Assoziation beschrieben werden.

## 4.2 Patientenkollektiv

Wie in Kapitel 1.1.3 beschrieben, wird VHF ätiologisch in zwei Formen unterteilt: In der Mehrzahl der Fälle sind insbesondere kardiovaskuläre Risikofaktoren und strukturelle Herzerkrankungen maßgeblich an der Entstehung der Erkrankung beteiligt (sekundäres VHF). Bei Patienten, für die in weitergehenden Untersuchungen keine Herzerkrankung oder Risikofaktoren festgestellt werden konnte, wurde 1954 der Begriff „Lone AF“ (lone atrial fibrillation, damals noch lone auricular fibrillation) oder ideopathisches VHF durch Evans und Swann eingeführt.<sup>88</sup> In der Folge wurde dieser Begriff vor allem für meist jüngere Patienten mit VHF verwendet, bei denen keine erkennbare und insbesondere keine kardiovaskuläre Ursache für das Auftreten der Rhythmusstörung festgestellt werden konnte. Somit rückte die Genetik als wahrscheinliche Ursache in den Mittelpunkt. In der letzten Zeit gab es jedoch Stimmen, die den Begriff „lone AF“ kritisch betrachten.<sup>89-91</sup> In den aktuellen Leitlinien ist lone AF als VHF bei jüngeren Patienten (<60 Jahre) ohne echokardiographischen Nachweis einer kardiovaskulären oder pulmonalen Begleiterkrankung bzw. akuten Trigger definiert.<sup>14,92</sup> Diese weitgefasste Definition führte zu einer breiten Anzahl von Zuständen (Alter, echokardiographische Definitionen, „signifikante“ Arteriosklerose, Ausschluss anderer Begleiterkrankungen u.v.m), die durch Autoren als „lone AF“ bezeichnet wurden. Zusätzlich konnte die Forschung insbesondere in den letzten 20 Jahren ein enormes Wissen zu zahlreichen neuen Mechanismen, Ätiologien und neuartige Formen von Herzkrankheiten beitragen. In der Folge sank der Anteil der Patienten, die vormals noch als Lone AF definiert waren. Es ist ebenfalls zu bedenken, dass viele Erkrankungen, die als Risikofaktoren für VHF gelten, einem schleichenden Entwicklungsprozess über viele Jahre unterliegen. Und auch wenn der medizinische und technische Fortschritt ein früheres Erkennen von Pathologien ermöglicht, stellt sich dennoch die Frage, ob Lone AF ein VHF ohne Vorerkrankung ist, oder ein VHF darstellt, bei dem die assoziierte Erkrankung schon besteht, jedoch noch subklinisch abläuft.<sup>91</sup> Auch die Annahme, dass Patienten mit Lone AF eine bessere Prognose aufweisen, so lange sie keine zusätzlichen Erkrankungen entwickeln, konnte nicht immer bestätigt werden.<sup>93</sup> Ein beträchtlicher Anteil des Wissens bezüglich Ätiologie, Pathophysiologie und Prognose von VHF liefert Hinweise, dass die meisten derjenigen VHF-Patienten, die klinisch gesund erscheinen, tatsächlich jedoch zumindest subklinische Einschränkung der kardialen Funktion und/oder Struktur mit sich tragen, deren Einfluss auf die Prognose bisher nicht abgeschätzt werden kann. Deshalb

scheint die Bedeutung des Begriffs „Lone AF“ rückläufig zu sein und überwiegend als Ausschlussdiagnose zu dienen.<sup>94</sup>

In dieser Arbeit wurde deshalb keine „Lone AF-Population“ untersucht, sondern stattdessen der Ansatz eines dem klinischen Alltag entsprechenden Patientenkollektivs ohne schwerwiegende Herzerkrankungen oder Diabetes mellitus gewählt („Real Life-Kohorte“), wobei kritisch angemerkt werden muss, dass bei 36 % der Patienten eine arterielle Hypertonie und damit ein nachgewiesener Risikofaktor für VHF bestand.<sup>95</sup> Dieser Untersuchungsansatz erscheint bei Untersuchungen zu Genvarianten speziell bei KCNE dennoch sinnvoll, da KCNEs ubiquitär im Körper nachgewiesen werden konnten und somit auch durch extrakardiale Funktion Einflüsse auf die Entstehung von Herzrhythmusstörungen denkbar sind.<sup>54-63</sup> So ist der Zusammenhang zwischen Schilddrüsenfunktionsstörungen und kardialen Arrhythmien und insbesondere VHF sowie Hyperthyreose bekannt.<sup>96,97</sup> Mittlerweile gibt es jedoch zusätzlich Hinweise auf eine Assoziation zwischen subklinischer Hyperthyreose und Vorhofflimmern. Ebenso konnten weitere Verknüpfungen zwischen subklinischen Hyper- und Hypothyreosen und KHK, Herzinsuffizienz und Schlaganfall nachgewiesen werden.<sup>98</sup> Während der Einfluss auf ein erhöhtes Risiko für Herzrhythmusstörungen durch Abweichungen der Kaliumkonzentration anerkannt ist, gilt auch eine Assoziation von VHF und Hyperaldosterinismus als wahrscheinlich und ist Bestandteil laufender Studien.<sup>99</sup> Zuletzt konnte dieser Zusammenhang für KCNE3 im Rahmen von Mausstudien nachgewiesen werden.<sup>83</sup> Weiterhin konnte für KCNE2 an Knockout-Mäusen Hyperkaliämie und Hyperaldosterinismus sowie weitere extrakardiale Veränderungen (Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, Anämie) mit erhöhtem Risiko für einen plötzlichen Herztod nachgewiesen werden.<sup>68</sup>

Auch wenn diese Ergebnisse bisher nur in Tiermodellen nachgewiesen werden konnten, ist eine Übertragung auf den Menschen denkbar.

Neben der Tatsache, dass durch die Untersuchung eines „Real Life“-Kollektivs eine in der täglichen klinischen Arbeit sehr relevante Gruppe von Patienten erfasst wurde, konnte dennoch der erwiesene Einfluss bekannter Risikofaktoren auf die Entstehung von VHF, beispielsweise durch bestehende höhergradige Klappenvitien oder Myokardinfarkte, reduziert werden.

## 4.3 Methoden

### 4.3.1 PCR und Sequenzierung

Die hier durchgeführte Methode der automatischen Sequenzierung nach Sanger gilt als sensitivste, effektivste und gut erprobte Methode zur Detektion von Mutationen. Das hier verwendete Gerät ABI Prism 3100 Avant erkennt die Basen laut Herstellerangaben mit einer Genauigkeit von 98,5 %, wobei diese Zahl nur für den Frequenzlängenbereich zwischen 27 und 576 bp gilt. Tabelle 2.1 zeigt auf, dass die Produkte der Primerpaare KCNE3, 4 und 5 außerhalb des angegebenen Bereiches liegen. In allen drei Fällen wurde deshalb sowohl vorwärts als auch rückwärts sequenziert. Bei KCNE3 und 5 konnten hiermit auf Anhieb klare Ergebnisse erzielt werden. Die Sequenzierung im Rahmen der Untersuchung von KCNE4 gestaltete sich in einigen Fällen schwierig. Wenn durch erneute Vorwärts- und Rückwärtssequenzierung keine brauchbaren Ergebnisse erreicht werden konnten, wurde die Versuchsreihe mit einer erneuten PCR von vorne gestartet. Somit ließen sich gut auszuwertende Daten ermitteln. Zur Sicherheit wurde bei allen nsSNPs, die im Rahmen der Sequenzierung nicht automatisch sowohl vorwärts als auch rückwärts sequenziert wurden, eine Kontrollsequenzierung durchgeführt, um die gefundene Variante zu bestätigen bzw. auszuschließen. Es kann daher von einer großen Genauigkeit der Ergebnisse ausgegangen werden.

### 4.3.2 Katheterablation

Das Grundprinzip der Katheterablation besteht in der gezielten Isolation der elektrischen Triggeraktivität, meist im Bereich der Pulmonalvenenmündungen im linken Vorhof, durch thermisch induzierte elektrische Diskonnektion. Dies wird durch Erzeugung von myokardialen Narbengewebe um die Ostien der Pulmonalvenen erreicht. Das Ausmaß und die Kontinuität dieses „Narbenblocks“ sind essenziell für den Therapieerfolg und das Risiko für ein Rezidiv, da bekannt ist, dass eine Wiederkehr von VHF nach Pulmonalvenenablation auf Lücken in der vorher erzeugten Narbenreihe basieren kann.<sup>100</sup> Die Durchführung der Interventionen sowie die folgenden Therapiekontrollen oblagen fachärztlich geleitet dem ärztlichen Personal der medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie der Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow. Da insbesondere die Ergebnisse der Ablation auch von der individuellen Erfahrung und dem Können des Operateurs abhängen, wurden in dieser Arbeit nur Patienten untersucht, die eine erstmalige Ablation erhalten hatten. Kam es

innerhalb der ersten drei Monate zu einer Re-Ablation, galt dies ebenfalls noch als Erstablation. Patienten, die nach drei Monaten eine zweite Intervention erhielten, wurden ausgeschlossen.

## 4.4 Prävalenzen der gefundenen Variationen

### 4.4.1 sSNPs

Bei synonymen Variationen kommt es zu keiner Änderung der Aminosäuresequenz, weshalb sich auch das entstehende Protein nicht verändert. Man kann daher davon ausgehen, dass diese wahrscheinlich keine Bedeutung für die Pathogenese von VHF haben. Dennoch wurden die Prävalenzen der untersuchten Patientengruppe mit Hilfe von [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org) und den Daten der europäischen Kontrollpopulation des 1000-Genome-Projekts verglichen.

Die Variationen rs17173510 und rs17221840 zeigten hierbei eine annähernd gleiche Verteilung der Genotypen (0.4 % vs 1,8 % bzw. 5.3 % vs. 6 % für die heterozygote Variante und 0.4 % vs. 0 % für die homozygote Variation).

Der sSNP rs2270676 (c.198T>C) wies Unterschiede in der Verteilung des heterozygoten Genotyps auf, der häufiger in der untersuchten Population vorzufinden war (26.2 % vs. 18.5 %). Die homozygote Variante war annähernd gleich verteilt. Im Gegensatz hierzu konnten keine Unterschiede im Vergleich mit der ostasiatischen Population des 1000-Genome-Projekts (n=504) festgestellt werden. Dies ist interessant, da das untersuchte Kollektiv bis auf eine bekannte Ausnahme im Wesentlichen kaukasischen Ursprungs ist. Allerdings könnte hier auch die Größe der etwa halb so großen VHF-Population eine ursächliche Rolle spielen.

Beide zu KCNE4 gehörenden sSNPs rs3795886 (c.234C>T) und rs10201907 (c.417T>C) wiesen gleichartige Verteilungen der Genotypen im Vergleich mit der Kontrollpopulation auf. Im Gegensatz zur Referenzsequenz ist der Wildtyp jedoch deutlich in der Minderheit (6.8 % vs. 9.7 % bzw. 0 % vs. 0.4 %) vertreten. Zusätzlich weisen bei rs10201907 afrikanische, amerikanische und ostasiatische Populationen eine entgegengesetzte Verteilung auf, was für eine geographische Komponente spricht.

#### 4.4.2 nsSNPs

##### *rs1805127 (KCNE1)*

In dieser Arbeit konnte kein relevanter Unterschied bezüglich der Verteilung der Genotypen und Allele zwischen Patienten mit VHF und der Kontrollpopulation festgestellt werden. Dies steht nicht im Einklang mit einer polnischen Untersuchung durch Prystupa et. al. aus dem Jahre 2006.<sup>72</sup> Hier wurden 69 Patienten mit Lone AF (Alter > 65 Jahre, paroxysmales VHF, Ausschluss bei kardiovaskulärer oder thyreoidalen Erkrankungen, Diabetes mellitus und Bluthochdruck) mit einer gesunden Kontrollgruppe (n=60, Alter > 65 Jahre, Ausschluss von kardiovaskulären oder thyreoidalen Erkrankungen) verglichen. Die Basisdaten der untersuchten Populationen gleichen sich. Das G-Allel konnte signifikant häufiger bei Patienten mit Lone AF nachgewiesen werden, während der Genotyp GG mit einem 10-fach erhöhten Risiko für VHF in der untersuchten Population einherging. Im Vergleich zur hier vorliegenden Untersuchung bestehen keine wesentlichen Unterschiede bezüglich Genotypen- und Alleldistribution. Allerdings weist die Kontrollgruppe von Prystupa et. al. mit einem Anteil von 41.8 % G-Allel und 58.2 % A-Allel ein abweichendes Verteilungsmuster im Vergleich zur hier verwendeten Kontrollpopulation auf (Allel A: 37.6 %, Allel G: 62.4%), worauf die unterschiedlichen Ergebnisse zurückzuführen sind. Auch die kleinere Anzahl an untersuchten Patienten sowie die „saubere“ und damit sicherlich VHF-freie Kontrollgruppe könnten einen Einfluss auf das Ergebnis haben, scheinen hierbei jedoch eine nachrangige Rolle zu spielen.

Einen weiteren Hinweis auf einen Zusammenhang der Variante mit dem Auftreten von VHF lieferten Fatini et. al. in einer Studie, die 331 Betroffene mit nicht-valvulärem VHF untersuchte. Im Vergleich zu 441 gesunden Probanden war das G-Allel sowohl im dominanten als auch im rezessiven Modell mit VHF assoziiert (dominant: OR=1.73, p=0.004; rezessiv: OR=1.59, p=0.006).<sup>69</sup> Die untersuchten Kollektive sind jedoch nur eingeschränkt mit dem Hiesigen vergleichbar, da mit Diabetes mellitus und koronarer Herzerkrankung zwei wichtige Risikofaktoren nicht ausgeschlossen wurden. Weiterhin handelt es sich um eine deutlich ältere Population (72.9 ± 9.2 Jahre).

Auch Li und Han attestierten in Metaanalysen ein erhöhtes Risiko für VHF bei Vorhandensein von rs1805127.<sup>101,102</sup> Demgegenüber konnten Zeng et. al. diesen Zusammenhang nicht bestätigen.<sup>80</sup> Neben den schon genannten Untersuchungen kaukasischer Populationen durch Fatini und Prystupa handelt es sich jedoch um

Studien an chinesischen Patienten, weshalb der Vergleich mit der vorliegenden Arbeit nur eingeschränkt zulässig ist.

#### *rs1805128 (KCNE1)*

Eine Assoziation zwischen der Variante c.253G>A (p.Asp85Asn) und VHF konnte in dieser Arbeit nicht festgestellt werden. Dies entspricht den Ergebnissen von Studien durch Zeng et. al, in der die Häufigkeiten des SNPs und die Genotypenverteilung von 142 hospitalisierten chinesischen Patienten mit 120 Teilnehmern aus der Normalbevölkerung und 118 hospitalisierten Personen ohne VHF untersucht wurden, sowie Sinner et. al., in der mit VHF assoziierte Variationen in zwei Kohorten aus Deutschland und den USA auf den genannten Zusammenhang überprüft wurden. Hierbei konnte in der amerikanischen Population zwar eine Assoziation nachgewiesen werden (OR 1.73, 95 % Konfidenzintervall 1.01-2.97, p=0.047), diese war jedoch laut den Autoren nach Vergleich mit anderen Populationen und einer Metaanalyse nicht signifikant.<sup>80,103</sup>

#### *rs150454912 (KCNE1)*

Es konnten keine Untersuchungen gefunden werden, die bisher die Variation c.293G>A (p.Arg98Gln) von KCNE1 im Zusammenhang mit VHF untersucht haben. Unsere Arbeit legt nach der statistischen Auswertung den Rückschluss nahe, dass Patienten mit dem A-Allel signifikant häufiger an VHF erkrankt sind (p=0.002). Zusätzlich besteht im Modell, in dem das Allel A als dominant angesehen wird, ein stark erhöhtes Risiko für die Erkrankung (OR=20.970, p=0.035). Da jedoch ein großer Unterschied in der Anzahl der Patienten zwischen der hier untersuchten Population (n=206) und den Daten des NHLBI Exome Projekts (n=4300) besteht und jeweils nur bei einem Teilnehmer die Variante in heterozygoter Form vorlag, muss die Aussagekraft dieser Resultate sehr zurückhaltend eingeordnet werden. Demnach kann nicht pauschal von einer Assoziation der Variante mit VHF ausgegangen werden. Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten sind Untersuchungen mit einheitlicher Kollektivgröße und, da die Variation selten auftritt, größeren Populationen sowie strenger charakterisierten Kontrollgruppen nötig.

#### *rs2234916 (KCNE2)*

Die Variante c.22A>G des Gens KCNE2 mit Austausch von Threonin durch Alanin an Position 8 der Aminosäurekette wurde bisher nur im Zusammenhang mit dem Long-QT-Syndrom beschrieben, einer ventrikulären Rhythmusstörung.<sup>104</sup> Die hier vorliegende Untersuchung einer möglichen Assoziation zum Auftreten von VHF konnte keinen Zusammenhang für den heterozygoten Genotyp oder die Allelvariante nachweisen. Im dominanten Modell ließ sich ein deutlich erhöhtes Risiko für die Variation aufzeigen (OR=2.126), allerdings wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht ( $p=0.180$ ). Somit liefert diese Arbeit einen möglichen Hinweis für eine Assoziation zwischen rs2234916 und VHF. Von einem Beweis kann jedoch ohne weitergehende Untersuchungen nicht ausgegangen werden.

#### *rs17215437 (KCNE3)*

In der vorliegenden Arbeit konnte die Variation häufiger im untersuchten Kollektiv nachgewiesen werden als in der Vergleichsgruppe (1.5 % vs. 0.4 %). Dieser Unterschied war jedoch ohne Signifikanz. Gleiches gilt für die Annahme einer dominanten Ausprägung der Variation gegenüber dem Wildtyp. Hier konnte ein erhöhtes Risiko im Zusammenhang mit VHF nachgewiesen werden (OR=3.702), allerdings konnte dies nicht durch ein Erreichen des Signifikanzlevels von 0.05 bestätigt werden ( $p=0.153$ ). Die Variante, die auf DNA-Ebene zu einem Austausch von Guanin und Adenin an Position 248 der cDNA führt, wurde 2012 durch Mann et. al. erstmals auf einen Zusammenhang mit familiärem VHF bei 80 erkrankten Probanden und 240 gesunden Kontrollen untersucht.<sup>105</sup> Im Vergleich zum hier untersuchten Kollektiv (GG: 98.5 %, GA: 1.5 %) konnte der Genotyp GG in 95 %, der Genotyp GA in 5 % der VHF-Patienten nachgewiesen werden. Allerdings unterscheidet sich die Größe des Kollektivs deutlich, weshalb bei 80 gegenüber 206 untersuchten Teilnehmern ein falsch-positives Ergebnis möglich sein könnte. Die Kontrollgruppen wiesen fast gleiche Verteilungen auf. Eine definitive Aussage bezüglich einer Erhöhung des Risikos für VHF ist deshalb durch weitergehende Untersuchungen an größeren Populationen nötig. Diese Arbeit liefert als Hinweis eine mögliche Grundlage hierfür.

#### *rs12621643 (KCNE4)*

Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den VHF-Patienten und der Kontrollpopulation festgestellt werden, sodass eine erhöhtes Risiko für die Variation c.588T>G von KCNE4 im Hinblick auf VHF bei einer kaukasischen Population hieraus nicht abgeleitet werden kann. Das leicht erhöhte Risiko im dominanten Modell (OR=1.282) erreichte ebenfalls kein Signifikanzniveau (p=0.409).

Vorherige Untersuchungen ließen den Rückschluss auf einen Zusammenhang zwischen rs12621643 und VHF jedoch zu.

Zeng et. al führten eine Untersuchung an chinesischen Patienten mit VHF durch. Hierbei wurde eine mögliche Assoziation für das T-Allel beschrieben (OR 1.66, p=0.044).<sup>80</sup> Allerdings ist diese Feststellung laut eigener Aussage limitiert, da die untersuchten Kollektive nicht sehr gut gematched waren. Außerdem wurden Patienten mit Risikofaktoren wie koronare Herzerkrankung und Diabetes mellitus ebenfalls eingeschlossen. Der Vergleich zu den hier vorliegenden Ergebnissen wird weiterhin durch die verschiedenen Ethnien eingeschränkt.

Ebenfalls geographisch bedingt nur begrenzt vergleichbar sind die Ergebnisse von Mao et. al., die eine Assoziation des Allels 196T und VHF bei einer uigurischen Population und Han-Chinesen nachweisen konnten (OR 1.636, 95 % KI: 1.173-2.281, p=0.004; OR 1.491, 95 % KI: 1.076-2.065, p=0.016).<sup>106</sup>

Die in den genannten asiatischen Studien nachgewiesenen Assoziationen konnten für das hier untersuchte mitteleuropäische Kollektiv nicht bestätigt werden.

#### *rs17003955 (KCNE5)*

Die Variation (Genotyp TT) ließ sich im Vergleich zur Kontrollpopulation (NHLBI ESP6500) signifikant häufiger im untersuchten VHF-Kollektiv nachweisen (15.2 % vs. 7.5 %, p<0.001). Dies Aussage wird durch die Verteilung der Allele bestätigt (97T: 21.8 % vs. 14.2 %, p<0.001) und lässt somit die Folgerung einer Assoziation für das Auftreten von VHF in Zusammenhang mit dem SNP rs17003955 schließen. Sowohl die Annahme eines dominanten (OR=1.453, p=0.019) als auch eines rezessiven Modells (OR=2.227, p<0.001) verstärken den hier gewonnenen Eindruck, dass ein erhöhtes Risiko für VHF mit der Variation assoziiert ist.

Diese Aussage ist konträr zu einer Studie, bei der Ravn et. al. 158 Patienten mit VHF mit 96 gesunden Kontrollprobanden bezüglich Genotypen- und Allelverteilung untersuchte. Hier konnte das T-Allel signifikant häufiger in der gesunden

Kontrollgruppe beschrieben werden (23 % bei gesunden Probanden vs. 12 % bei VHF), weshalb ihm eine mögliche protektive Wirkung zugesprochen wird.<sup>82</sup>

Beide Untersuchungen können jedoch nicht eins zu eins verglichen werden. KCNE5 liegt auf dem X-Chromosom, weshalb Männer nur eine, Frauen jedoch zwei Kopien besitzen. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Vereinfachung ein Modell gewählt, bei dem männliche Genotypen entsprechend den weiblichen Genotypen behandelt wurden. Dieser Ansatz ist sinnvoll, um dem ansonsten doppelt so hohen Einfluss der weiblichen Probanden entgegenzuwirken und kann bei ähnlicher Verteilung der Allele zwischen den Geschlechtern angewendet werden.<sup>107</sup> Dies war bei der hier untersuchten Kohorte der Fall (männlich: 97C in 79,3 % und 97T in 20,7 %; weiblich: 97C in 75,8 % und 97T in 24,2 %).

Weiterhin divergieren die Kollektive der beiden Untersuchungen aufgrund des durchschnittlichen höheren Alters bei Ravn (66,2 Jahre) und dem Einschluss von Patienten mit koronarer Herzkrankheit, Diabetes mellitus oder einer Ejektionsfraktion <45%. Allerdings sind hierdurch die gegensätzlichen Ergebnisse unter Umständen nicht vollständig zu begründen, weshalb eine abschließende Erklärung über die Ursache für die abweichenden Aussagen nicht genannt werden kann.

#### *rs199924386 (KCNE5)*

Die Variation c.241T>C konnte bei einem Patienten mit heterozygotem Genotyp nachgewiesen werden. Eine erstmalige Beschreibung erfolgte 2011 durch Ohno et. al. bei 3 Probanden aus einem japanischen Kollektiv mit Brugada Syndrom bzw. einer ideopathischer ventrikulären Rhythmusstörung.<sup>108</sup> Auch der hier untersuchte Patient kommt aus Japan. Da ansonsten rs199924386 bei keinem anderen Teilnehmer nachgewiesen werden konnte, lässt sich kein Einfluss der Mutation auf das Risiko für VHF ableiten.

## **4.5 Variationen und Ablationsergebnisse**

Bisher gibt es mehrere Studien, die den Einfluss von Polymorphismen potenziell arrhythmogener Gene auf den Therapieerfolg nach Katheterablation bei VHF untersucht haben. Eine erste Studie dieser Art publizierten Husser et. al. 2010, die die Polymorphismen rs2200733 und rs10033464 auf Chromosom 4q25 untersuchten und

eine mögliche Assoziation zu einem erneuten Auftreten von VHF nach Ablation beschrieben.<sup>109</sup> Weitere Studien folgten. Unter anderen wurde der SNP rs751141 des Gens EPHX2 (soluble Epoxide Hydrolase), welchem kardioprotektive Effekte zugeschrieben werden, durch Wutzler et. al. untersucht.<sup>110</sup> Diese Arbeit wies für die genannte Variation ein erhöhtes Rezidivrisiko nach Katheterablation aufgrund von VHF nach.<sup>111</sup>

Derzeit gibt es keine publizierten Studien, die den Einfluss von Variationen in KCNEs auf das Rezidivrisiko bei Patienten mit VHF nach Katheterablation untersucht haben.

#### *rs1805127 (KCNE1)*

Nach 12 Monaten war der Wildtyp AA tendenziell häufiger bei Patienten mit Ablationserfolg vertreten (14.3 % vs. 8,8 %), während der Genotyp GG häufiger bei Patienten mit VHF-Rezidiv vorkam (42.1 % vs. 38.4 %). Jedoch sind die Unterschiede nach der statistischen Auswertung nicht signifikant ( $p=0.582$ ). Dieser Eindruck spiegelt sich auch in der Verteilung der Allele wieder. Das Wildtyp-Allel A kommt häufiger bei Patienten mit positivem post-interventionellem Verlauf vor, während das G-Allel prozentual öfter bei Patienten mit VHF-Rezidiv nachgewiesen werden konnte (Allel A: 14.3 % bei erfolgreicher Ablation vs. 8.8 % bei Rezidiv; Allel G (62.1 % bei erfolgreicher Ablation vs. 66.7 % bei Rezidiv). Auch hier konnten die Ergebnisse kein signifikantes Level erreichen ( $p=0.405$ ). Weniger ausgeprägt und damit ebenfalls ohne Signifikanz sind die Ergebnisse nach 24 Monaten. Bei Annahme eines dominanten Vererbungsmusters steigt das Risiko für ein Rezidiv innerhalb von 12 Monaten nach der Intervention (OR: 1.733), jedoch sind die Unterschiede nach der statistischen Auswertung auch hier nicht signifikant ( $p=0.304$ ).

Den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge spielt der Polymorphismus rs1805127 (c.112A>G; p.Ser38Gly) keine wesentliche Rolle im Hinblick auf den Therapieerfolg nach Ablation. Die angedeutenden Tendenzen für ein höheres Rezidivrisiko bei Vorhandensein des SNP sollten dennoch Gegenstand zukünftiger Untersuchungen mit größeren Kollektiven sein.

#### *rs1805128, rs150454912 (KCNE1), rs2234916 (KCNE2), rs17215437 (KCNE3) und rs199924386 (KCNE5)*

Signifikante Assoziationen konnten nicht festgestellt werden, auch nicht in den dominant gewichteten Modellen. Bei allen genannten Variationen war die Verteilung der Genotypen und Allele jedoch einseitig, weshalb eine Aussage zu den möglichen

Auswirkungen auf den Ablationserfolg auf Basis dieser Arbeit nur sehr eingeschränkt möglich ist. Deutlich größere Untersuchungskollektive wären hierfür notwendig.

#### *rs12621643 (KCNE4)*

Schon nach 12 Monaten weisen die Ergebnisse darauf hin, dass der als Wildtyp angesehene Genotyp TT eher mit einer frustranen Intervention assoziiert ist (8.8 % bei Rezidiv vs. 4.4 % bei Ablationserfolg), während die Variante mit dem Genotyp GG häufiger in der Gruppe mit Ablationserfolg vorzufinden ist (56.3 % bei Ablationserfolg vs. 42.1 % bei Rezidiv). Allerdings sind die Unterschiede noch nicht signifikant ( $p=0.173$ ). Entsprechendes kann über die Verteilung der Allele festgestellt werden ( $p=0.309$ ). Nach 24 Monaten bestätigen sich die Ergebnisse der 12-Monats-Evaluation. Allerdings bestätigt die statistische Auswertung nun die Ergebnisse sowohl im Hinblick auf die Genotypen als auch die entsprechenden Allele als signifikant ( $p=0.048$  bei Genotypen und  $p=0.019$  bei der Allelverteilung). Zusätzlich Unterstützung erhalten die Beobachtungen durch die Resultate des rezessiven Modells (OR: 0.477,  $p=0.022$ ), die ebenfalls auf einen protektiven Effekt der Variante hinweisen.

Bei rs12621643 (c.588T>G, p.Asp196Glu) könnte demnach ein protektiver Effekt im Hinblick auf das Rezidivrisiko nach Katheterablation bei VHF vorhanden sein. Das T-Allel bzw. der Genotyp TT scheinen das Risiko hingegen zu erhöhen.

#### *rs170039557 (KCNE5)*

Nach Betrachtung der Therapieerfolge 12 Monate nach der Ablation weisen die Ergebnisse auf ein signifikant höheres Risiko für ein VHF-Rezidiv für die Wildtyp-Variante mit dem Genotyp CC gegenüber dem Genotyp TT hin (78.6 % vs. 66.0 %,  $p=0.045$ ). Auch die Resultate nach 24 Monaten könnten als Tendenz in die gleiche Richtung interpretiert werden, allerdings wird das Signifikanzniveau nicht ganz erreicht ( $p=0.058$ ). In den dominanten Modellen nach 12 und 24 Monaten konnten ebenfalls Hinweise auf einen negativen Einfluss des Genotyps CC gefunden werden, jedoch erneut ohne das Signifikanzlevel zu erreichen (12 Monate: OR: 0.531,  $p=0.095$ ; 24 Monate: OR: 0.604,  $p=0.156$ ).

Zusammengefasst kann nach isolierter Betrachtung der Ablationsergebnisse von einem möglichen protektiven Effekt der Variation ausgegangen werden. Dies ist bemerkenswert, da die Ergebnisse der Prävalenzen aus dieser Arbeit (Kapitel 4.4.2) konträr hierzu auf ein höheres Erkrankungsrisiko für Genotyp TT hinweist. Eine

mögliche Ursache könnte die angesprochene „Aufwertung“ der männlichen Genotypen und die damit einhergehende Verzerrung der tatsächlichen Anzahl von homozygoten und heterozygoten Teilnehmern sein. Eine abschließende Erklärung hierfür ist aufgrund der vorliegenden Daten jedoch nicht möglich.

## **4.6 Limitationen**

Die vorliegende Arbeit wurde als Assoziationsstudie konzipiert. Dabei wird retrospektiv untersucht, ob ein bestimmtes Merkmal in einer Population, bei der eine bestimmte Erkrankung vorliegt, eine andere Verteilung aufweist als in einer gesunden Kontrollpopulation. Im Vergleich zu prospektiven Studien ist die Aussagekraft reduziert, dafür ist die Durchführbarkeit schneller und kostengünstiger. <sup>112</sup>

Insgesamt wurden 206 Patienten rekrutiert, von denen 180 eine Ablation erhalten hatten. Dies ist eine moderate Patientenzahl, bei der eine schwache Assoziation unter Umständen nicht erkannt werden könnte. Zusätzlich handelt es sich um ein Berliner Kollektiv mit überwiegend kaukasischem Ursprung, was die Aussagekraft über andere ethnische Populationen nicht zulässt und auch Vergleiche mit Gruppen anderer Herkunft Einschränkungen unterliegen.

Die Krankengeschichte der untersuchten Patienten wurde durch Befragung mittels Fragebögen erfasst und durch die Auswertungen und Untersuchungsergebnisse aus den Unterlagen der Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum, ergänzt. Bei der Befragung von Patienten besteht die Möglichkeit, dass durch verzerrte Erinnerung und subjektive Darstellung von Ereignissen Fehler auftreten (Recall Bias). Diese Möglichkeit wurde durch die schon genannte Auswertung und Ergänzung von Patientenunterlagen der Klinik (z.B. Berichte Koronarangiographie, Arztbriefe, Befunde von Echokardiographien) minimiert.

Einen potenziellen Schwachpunkt dieser Studie stellt die nicht durchgeführte Untersuchung einer Kontrollgruppe dar. Diese hätte aus einer möglichst ähnlichen Anzahl von Probanden bestanden, die nicht an VHF erkrankt gewesen wären. Stattdessen wurde hierfür auf die Daten der europäischen Population des 1000-Genome-Projekts zurückgegriffen. Hierbei handelt es sich um ein internationales Projekt, in dem zum derzeitigen Stand (Phase 3) die Genome von 2535 menschlichen Genomen weltweit sequenziert und nach ethnischer Herkunft sortiert wurden. Die Teilnehmer sind hierbei bewusst randomisiert und ohne Einschränkungen im Hinblick

auf Alter oder Vorerkrankungen ausgewählt worden, um eine möglichst durchschnittliche Population präsentieren zu können. Dies hat den Nachteil, dass auch Patienten mit VHF und Risikofaktoren enthalten sein können und damit die klare Abgrenzung zum untersuchten Kollektiv reduziert ist. Ein Vorteil liegt in der Kosten- und Zeitersparnis. Weiterhin konnten die Ergebnisse des VHF-Kollektivs so mit einer deutlich größeren Kontrollpopulation (n=503) verglichen werden, was den obengenannten Nachteil der reduzierten Abgrenzbarkeit über die höhere Anzahl an Vergleichspersonen zumindest etwas abschwächt.

Wenn keine Informationen in den Datenbanken des 1000-Genome-Projekts zu einer Variation zu finden waren, wurden alternativ die Daten des NHLBI Exome-Sequenzierungs-Projekt (ESP6500) genutzt. Auch hier handelt es sich um Teilnehmer europäischer Abstammung, die in verschiedenen Zentren in den USA untersucht wurden. Ebenfalls wurde ein phänotypisch möglichst breiter Ansatz gewählt, der obengenannte Nach- und Vorteile mit sich bringt. Allerdings rekrutieren sich die Patienten aufgrund des Ansatzes des Projekts auch aus Patientenkollektiven, die Herz- und andere systemische Erkrankungen beinhalten. Somit könnten auch hier Patientenproben inbegriffen sein, die nicht den Ausschlusskriterien des in dieser Studie untersuchten Kollektivs entsprechen.

Methodisch gewinnt der Ansatz des Vergleichs einer untersuchten phänotypisch-positiven Population mit Daten großer Sequenzierungsdatenbanken zunehmend an Bedeutung und ist sowohl bezüglich des 1000 Genome Projekts als auch des NHLBI Exome-Sequenzierungs-Projekts in der wissenschaftlichen Praxis etabliert. <sup>113-120</sup>

## **4.7 Schlussfolgerung**

In dieser Arbeit konnten keine neuen Variationen in den kodierenden Abschnitten der Gene KCNE1 bis KCNE5 gefunden werden. Das Allel 97T der Variation rs17003955 (KCNE5) lässt sich mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten von VHF assoziieren. Bei diesem Ergebnis muss jedoch bedacht werden, dass männliche Teilnehmer entsprechend der weiblichen Probanden als Homozygote behandelt wurden, da KCNE5 auf dem X-Chromosom liegt. Hierdurch kommt es zu einer gewissen Verzerrung der Anzahl der Allele, dafür wird jedoch der ansonsten bestehende verstärkte Einfluss der weiblichen Probandinnen ausgeglichen. Die genaue Ursache für die gravierenden Abweichungen zur Studie von Ravn et al. ist trotz Unterschieden

in den Kollektiven und der statistischen Herangehensweise nicht zu benennen.<sup>82</sup> Weitergehende Untersuchungen sind deshalb von Nöten, um eine definitive Aussage zuzulassen.

Erstmalig wurden Variationen der cDNA der Gene KCNE1 bis KCNE5 hinsichtlich ihres Einfluss auf den Interventionserfolg nach Katheterablation aufgrund von VHF untersucht. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die Varianten rs12621643 (KCNE4) und rs170039557 (KCNE5) möglicherweise protektive Einflüsse auf den Therapieerfolg nach 12 und 24 Monaten haben, während die Wildtypen das Risiko für ein Rezidiv eventuell steigern könnten. Diese Erkenntnisse stehen jedoch bei rs170039557 (KCNE5) konträr zu den obengenannten Ergebnissen, die ein erhöhtes Erkrankungsrisiko mit der Variante assoziieren.

Es ist unabdingbar, diese Hinweise in weiteren Untersuchungen zu überprüfen, gerade im Hinblick auf eine zukünftig eventuell mögliche individuelle präinterventionelle genetische Risikoevaluierung bei Patienten mit VHF.

## 5. Zusammenfassung

Vorhofflimmern ist die häufigste Herzrhythmusstörung des Menschen. In den letzten Jahren ergaben sich insbesondere bei jüngeren Patienten ohne klassische Risikofaktoren zunehmend Hinweise auf einen genetischen Hintergrund für das Auftreten von Vorhofflimmern.

KCNE1-5 kodieren eine Gruppe  $\beta$ -Untereinheiten von Kaliumkanalproteinen, die mit Rhythmusstörungen (z.B. Vorhofflimmern, Long QT-Syndrom) assoziiert werden.

Eine Therapieoption bei Vorhofflimmern stellt die Ablation dar. Allerdings sind genotypische Untersuchungen zum Ablationserfolg rar.

Zielsetzung dieser Arbeit war es, neue KCNE-Varianten an einem „Real Life“-Kollektiv an der Charité Universitätsmedizin Berlin zu identifizieren und die Auswirkung auf den Ablationserfolg zu untersuchen.

Hierzu wurden 206 Patienten mit Vorhofflimmern und ohne höhergradige Risikofaktoren („Real-Life Kohorte“) rekrutiert. Die kodierenden Bereiche der Gene wurden sequenziert und die Genotypenverteilung der Polymorphismen erfasst. Diese Daten wurden mit europäischen bzw. europäisch-stämmigen Kollektiven des 1000-Genome-Projekts sowie des NHLBI Exome-Sequenzierungs-Projekt verglichen. Anschließend wurde bei 180 Patienten des untersuchten Kollektivs mit durchgeführter Katheterablation der Erfolg der Intervention nach 12 und 24 Monaten erfasst und hinsichtlich einer möglichen Assoziation mit den gefundenen Polymorphismen analysiert.

Es konnten keine neuen Mutationen entdeckt werden. Fünf synonyme sowie acht nicht-synonyme vorbeschriebene Varianten wurden nachgewiesen. Das Allel 97T der Variation rs17003955 (KCNE5) lässt sich im Rahmen dieser Untersuchung möglicherweise mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten von VHF assoziieren ( $p < 0.001$ ).

Weiterhin liefert die vorliegende Arbeit Hinweise darauf, dass das Allel 588G des SNP rs12621643 (KCNE4) einen protektiven Einfluss auf das Rezidivrisiko nach Ablation des Vorhofs nach 24 Monaten hat ( $p = 0.019$ ). Gleiches gilt für den GG-Genotyp des schon genannten Polymorphismus rs170039557 aus KCNE5 12 Monate postinterventionell ( $p = 0.045$ ).

## 6. Literaturverzeichnis

1. Crump SM, Abbott GW. Arrhythmogenic KCNE gene variants: current knowledge and future challenges. *Frontiers in genetics*. 2014;5:3.
2. Fuster V, Ryden LE, Cannom DS, Cannom DS, Crijns HJ, Curtis AB, Ellenbogen KA, Halperin JL, Le Heuzey JY, Kay, GN, Lowe JE, Olsson SB, Prystowsky EN, Tamargo JL, Wann S, Smith SC Jr, Jacobs AK, Adams CD, Anderson JL, Antman EM, Halperin JL, Hunt SA, Nishimura R, Ornato JP, Page RL, Riegel B, Priori SG, Blanc JJ, Budaj A, Camm AJ, Dean V, Deckers JW, Despres C, Dickstein K, Lekakis J, McGregor K, Metra M, Morais J, Osterspey A, Tamargo JL, Zamorano JL. ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for the Management of Patients with Atrial Fibrillation: 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 (Writing Committee to Revise the 2001 Guidelines for the Management of Patients With Atrial Fibrillation): developed in collaboration with the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. *Circulation*. Aug 15 2006;114(7):e257-354.
3. Go AS, Hylek EM, Phillips KA, Chang Y, Henault LE, Selby JV, Singer DE. 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 : the journal of the American Medical Association*. May 9 2001;285(18):2370-2375.
4. Wilke T, Groth A, Mueller S, Pfannkuche M, Verheyen F, Linder R, Maywald U, Bauersachs R, Breithardt G. Incidence and prevalence of atrial fibrillation: an analysis based on 8.3 million patients. *Europace : European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology : journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology*. Apr 2013;15(4):486-493.
5. Sinner MF, Pfeufer A, Kaab S. [Genetics of atrial fibrillation: rare mutations, common variants and clinical relevance?]. *Herzschrittmachertherapie & Elektrophysiologie*. Jun 2006;17(2):95-105.
6. Krijthe BP, Kunst A, Benjamin EJ, Lip GY, Franco OH, Hofman A, Witteman JC, Stricker BH, Heeringa J. Projections on the number of individuals with atrial fibrillation in the European Union, from 2000 to 2060. *European heart journal*. Sep 2013;34(35):2746-2751.
7. Heijman J, Voigt N, Nattel S, Dobrev D. Cellular and molecular electrophysiology of atrial fibrillation initiation, maintenance, and progression. *Circulation research*. Apr 25 2014;114(9):1483-1499.
8. Michel Haïssaguerre MD, Pierre Jaïs, M.D., Dipen C. Shah, M.D., Atsushi Takahashi, M.D., Méléze Hocini, M.D., Gilles Quiniou, M.D., Stéphane Garrigue, M.D., Alain Le Mouroux, M.D., Philippe Le Métayer, M.D., and Jacques Clémenty, M.D. Spontaneous Initiation of Atrial Fibrillation by Ectopic Beats Originating in the Pulmonary Veins. *The New England journal of medicine*. September 3, 1998 1998; 339:659-666.
9. Nattel S. New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature*. Jan 10 2002;415(6868):219-226.
10. Ravelli F, Allessie M. Effects of atrial dilatation on refractory period and vulnerability to atrial fibrillation in the isolated Langendorff-perfused rabbit heart. *Circulation*. Sep 2 1997;96(5):1686-1695.
11. Nattel S, Duker G, Carlsson L. Model systems for the discovery and development of antiarrhythmic drugs. *Progress in biophysics and molecular biology*. Oct-Nov 2008;98(2-3):328-339.
12. Ausma J, Wijffels M, Thone F, Wouters L, Allessie M, Borgers M. Structural changes of atrial myocardium due to sustained atrial fibrillation in the goat. *Circulation*. Nov 4 1997;96(9):3157-3163.

13. Healey JS, Connolly SJ, Gold MR, Israel CW, Van Gelder IC, Capucci A, Lau CP, Fain E, Yang S, Bailleul C, Morillo CA, Carlson M, Themeles E, Kaufman ES, Hohnloser SH, Assert Investigators. Subclinical atrial fibrillation and the risk of stroke. *The New England journal of medicine*. Jan 12 2012;366(2):120-129.
14. European Heart Rhythm A, European Association for Cardio-Thoracic S, Camm AJ, Kirchhof P, Lip GY, Schotten U, Savelieva I, Ernst S, Van Gelder IC, Al-Attar N, Hindricks G, Prendergast B, Heidbuchel H, Alfieri O, Angelini A, Atar D, Colonna P, De Caterina R, De Sutter J, Goette A, Gorenek B, Heldal M, Hohloser SH, Kolh P, Le Heuzey JY, Ponikowski P, Rutten FH, E. S. C. Committee for Practice Guidelines. Guidelines for the management of atrial fibrillation: the Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC). *Europace: European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology : journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology*. Oct 2010;12(10):1360-1420.
15. Kannel WB, Benjamin EJ. Current perceptions of the epidemiology of atrial fibrillation. *Cardiology clinics*. Feb 2009;27(1):13-24, vii.
16. Wang TJ, Larson MG, Levy D, Vasan RS, Leip EP, Wolf PA, D'Agostino RB, Murabito JM, Kannel WB, Benjamin EJ. Temporal relations of atrial fibrillation and congestive heart failure and their joint influence on mortality: the Framingham Heart Study. *Circulation*. Jun 17 2003;107(23):2920-2925.
17. Andrade J, Khairy P, Dobrev D, Nattel S. The clinical profile and pathophysiology of atrial fibrillation: relationships among clinical features, epidemiology, and mechanisms. *Circulation research*. Apr 25 2014;114(9):1453-1468.
18. Cotter PE, Martin PJ, Ring L, Warburton EA, Belham M, Pugh PJ. Incidence of atrial fibrillation detected by implantable loop recorders in unexplained stroke. *Neurology*. Apr 23 2013;80(17):1546-1550.
19. Laupacis A, Singer D, Jacobsen A, Dunn M, Dalen J, Albers G. Risk factors for stroke and primary prevention of stroke in atrial fibrillation. *Journal of thrombosis and thrombolysis*. Jan 1999;7(1):21-26.
20. Hart RG PL, Aguilar MI. Meta-analysis: antithrombotic therapy to prevent stroke in patients who have nonvalvular atrial fibrillation. *Ann Intern Med*. 2007 Jun 19 2007;146(12):857-867.
21. Halsey C, Chugh A. Rate versus rhythm control for atrial fibrillation. *Cardiology clinics*. Nov 2014;32(4):521-531.
22. Wyse DG, Waldo AL, DiMarco JP, Domanski MJ, Rosenberg Y, Schron EB, Kellen JC, Greene HL, Mickel MC, Dalquist JE, Corley SD, Atrial Fibrillation Follow-up Investigation of Rhythm Management, Investigators. A comparison of rate control and rhythm control in patients with atrial fibrillation. *The New England journal of medicine*. Dec 05 2002;347(23):1825-1833.
23. Van Gelder IC, Hagens VE, Bosker HA, Kingma JH, Kamp O, Kingma T, Said SA, Darmanata JI, Timmermans AJ, Tijssen JG, Crijns HJ, Rate Control versus Electrical Cardioversion for Persistent Atrial Fibrillation Study Group. A comparison of rate control and rhythm control in patients with recurrent persistent atrial fibrillation. *The New England journal of medicine*. Dec 05 2002;347(23):1834-1840.
24. Roy D, Talajic M, Nattel S, Wyse DG, Dorian P, Lee KL, Bourassa MG, Arnold JM, Buxton AE, Camm AJ, Connolly SJ, Dubuc M, Ducharme A, Guerra PG, Hohnloser SH, Lambert J, Le Heuzey JY, O'Hara G, Pedersen OD, Rouleau JL, Singh BN, Stevenson LW, Stevenson WG, Thibault B, Waldo AL, Atrial Fibrillation, Congestive Heart Failure Investigators. Rhythm control versus rate control for atrial fibrillation and heart failure. *The New England journal of medicine*. Jun 19 2008;358(25):2667-2677.
25. Marrouche NF, Brachmann J, Andresen D, Siebels J, Boersma L, Jordaens L, Nerkely B, Pokushalov E, Sanders P, Proff J, Schunkert H, Christ H, Vogt J, Bansch D, Castle-Af Investigators. Catheter Ablation for Atrial Fibrillation with Heart Failure. *The New England journal of medicine*. Feb 1 2018;378(5):417-427.

26. Torp-Pedersen C, Crijns HJ, Gaudin C, Page RL, Connolly SJ, Hohnloser SH, Athena Investigators. Impact of dronedarone on hospitalization burden in patients with atrial fibrillation: results from the ATHENA study. *Europace: European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology : journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology*. Aug 2011;13(8):1118-1126.
27. D'Ascenzo F, Corleto A, Biondi-Zoccai G, Anselmino M, Ferrais F, di Biase L, Natale A, Hunter RJ, Schilling RJ, Miyazaki S, Tada H, Aonuma K, Yenn-Jiang L, Tao H, Ma C, Packer D, Hammill S, Gaita F. Which are the most reliable predictors of recurrence of atrial fibrillation after transcatheter ablation?: a meta-analysis. *International journal of cardiology*. Sep 01 2013;167(5):1984-1989.
28. Cleland JG CA, Buga L, Ahmed D, Clark AL. Clinical trials update from the American College of Cardiology meeting 2010: DOSE, ASPIRE, CONNECT, STICH, STOP-AF, CABANA, RACE II, EVEREST II, ACCORD, and NAVIGATOR. *Eur J Heart Fail*. 2010;12(6):623-629.
29. Marrouche NF, Brachmann J, Committee C-AS. Catheter ablation versus standard conventional treatment in patients with left ventricular dysfunction and atrial fibrillation (CASTLE-AF) - study design. *Pacing and clinical electrophysiology : PACE*. Aug 2009;32(8):987-994.
30. Darbar D. Genetics of atrial fibrillation: rare mutations, common polymorphisms, and clinical relevance. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society*. Mar 2008;5(3):483-486.
31. Wolff L. Familial auricular fibrillation. *N Engl J Med* 1943;229:396-7
32. Marcus GM, Smith LM, Vittinghoff E, Tseng ZH, Badhwar N, Lee BK, Lee RJ, Scheinman MM, Olgin JE. A first-degree family history in lone atrial fibrillation patients. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society*. Jun 2008;5(6):826-830.
33. Ellinor PT, Yoerger DM, Ruskin JN, MacRae CA. Familial aggregation in lone atrial fibrillation. *Human genetics*. Nov 2005;118(2):179-184.
34. Oyen N, Ranthe MF, Carstensen L, Boyd HA, Olesen MS, Olesen SP, Wohlfahrt J, Melbye M. Familial aggregation of lone atrial fibrillation in young persons. *Journal of the American College of Cardiology*. Sep 4 2012;60(10):917-921.
35. Fox CS, Parise H, D'Agostino RB, Sr., Lloyd-Jones DM, Vasan RS, Wang TJ, Levy D, Wolf PA, Benjamin EJ. Parental atrial fibrillation as a risk factor for atrial fibrillation in offspring. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. Jun 16 2004;291(23):2851-2855.
36. Arnar DO, Thorvaldsson S, Manolio TA, Thorgeirsson G, Kristjansson K, Hakonarson H, Stefansson K. Familial aggregation of atrial fibrillation in Iceland. *European heart journal*. Mar 2006;27(6):708-712.
37. Roberts JD, Gollob MH. A contemporary review on the genetic basis of atrial fibrillation. *Methodist DeBakey cardiovascular journal*. Jan-Mar 2014;10(1):18-24.
38. Mahida S, Lubitz SA, Rienstra M, Milan DJ, Ellinor PT. Monogenic atrial fibrillation as pathophysiological paradigms. *Cardiovascular research*. Mar 1 2011;89(4):692-700.
39. Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene* 1999;234(2): 177-186.
40. Kohncke C, Lisewski U, Schleussner L, Gaertner C, Reichert S, Roepke TK. Isolation and Kv channel recordings in murine atrial and ventricular cardiomyocytes. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2013(73):e50145.
41. Abbott GW, Goldstein SA. A superfamily of small potassium channel subunits: form and function of the MinK-related peptides (MiRPs). *Quarterly reviews of biophysics*. Nov 1998;31(4):357-398.
42. Bianchi L, Shen Z, Dennis AT, Priori SG, Napolitano C, Ronchetti E, Bryskin R, Schwartz PJ, Brown AM. Cellular dysfunction of LQT5-minK mutants: abnormalities of IKs, IKr and trafficking in long QT syndrome. *Human molecular genetics*. Aug 1999;8(8):1499-1507.
43. Duggal P, Vesely MR, Wattanasirichaigoon D, Villafane J, Kaushik V, Beggs AH. Mutation of the gene for Isk associated with both Jervell and Lange-Nielsen and Romano-Ward forms of Long-QT syndrome. *Circulation*. Jan 20 1998;97(2):142-146.

44. Abbott GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW, Keating MT, Goldstein SA. MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell*. Apr 16 1999;97(2):175-187.
45. Sesti F, Goldstein SA. Single-channel characteristics of wild-type IKs channels and channels formed with two minK mutants that cause long QT syndrome. *The Journal of general physiology*. Dec 1998;112(6):651-663.
46. Hedley PL, Jorgensen P, Schlamowitz S, Moolman-Smook J, Kanters JK, Corfield VA, Christiansen M. The genetic basis of Brugada syndrome: a mutation update. *Human mutation*. Sep 2009;30(9):1256-1266.
47. Hedley PL, Jorgensen P, Schlamowitz S, Wangari R, Moolman-Smook J, Brink PA, Kanters JK, Corfield VA, Christiansen M. The genetic basis of long QT and short QT syndromes: a mutation update. *Human mutation*. Nov 2009;30(11):1486-1511.
48. Paulussen AD, Gilissen RA, Armstrong M, Doevendans PA, Verhasselt, Smeets HJ, Schulze-Bahr E, Haverkamp W, Breithardt G, Cohen N, Aerssens J. Genetic variations of KCNQ1, KCNH2, SCN5A, KCNE1, and KCNE2 in drug-induced long QT syndrome patients. *Journal of molecular medicine*. Mar 2004;82(3):182-188.
49. Splawski I, Shen J, Timothy KW, Lehmann MH, Priori S, Robinson JL, Moss AJ, Schwartz PJ, Towbin JA, Vincent GM, Keating MT. Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation*. Sep 5 2000;102(10):1178-1185.
50. Delpon E, Cordeiro JM, Nunez L, Thomsen PE, Guerchicoff A, Pollevick GD, Wu Y, Kanters JK, Larsen CT, Hofman-Bang J, Burashnikov E, Christiansen M, Antzelevitch C. Functional effects of KCNE3 mutation and its role in the development of Brugada syndrome. *Circulation. Arrhythmia and electrophysiology*. Aug 2008;1(3):209-218.
51. Roepke TK, Kontogeorgis A, Ovanez C, Xu X, Young JB, Purtell K, Goldstein PA, Christini DJ, Peters NS, Akar FG, Gutstein DE, Lerner DJ, Abbott GW. Targeted deletion of *kcne2* impairs ventricular repolarization via disruption of I(K,slow1) and I(to,f). *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. Oct 2008;22(10):3648-3660.
52. Myocardial Infarction Genetics C, Kathiresan S, Voight BF, Purcell S, Musunuru K, Ardissino D, et al. Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants. *Nature genetics*. Mar 2009;41(3):334-341.
53. Szpakowicz A, Kiliszek M, Pepinski W, Waszkiewicz E, Franaszczyk M, Skawrońska M, Dobrzycki S, Niemcunowicz-Janica A, Ploski R, Opolski G, Musiał WJ, Kamiński KA. The rs9982601 polymorphism of the region between the SLC5A3/MRPS6 and KCNE2 genes associated with a prevalence of myocardial infarction and subsequent long-term mortality. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*. 2015;125(4):240-248.
54. Arrighi I, Bloch-Faure M, Grahammer F, Bleich M, Warth R, Mengual R, Drici MD, Barhanin J, Meneton P. Altered potassium balance and aldosterone secretion in a mouse model of human congenital long QT syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Jul 17 2001;98(15):8792-8797.
55. Barriere H, Rubera I, Belfodil R, Tauc M, Tonnerieux N, Poujeol C, Barhanin J, Poujeol P. Swelling-activated chloride and potassium conductance in primary cultures of mouse proximal tubules. Implication of KCNE1 protein. *The Journal of membrane biology*. Jun 1 2003;193(3):153-170.
56. Dedek K, Waldegger S. Colocalization of KCNQ1/KCNE channel subunits in the mouse gastrointestinal tract. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. Sep 2001;442(6):896-902.
57. Preston P, Wartosch L, Gunzel D, Fromm M, Kongsuphol P, Ousingsawat J, Kunzelmann K, Barhanin J, Warth R, Jentsch TJ. Disruption of the K<sup>+</sup> channel beta-subunit KCNE3 reveals an important role in intestinal and tracheal Cl<sup>-</sup> transport. *The Journal of biological chemistry*. Mar 5 2010;285(10):7165-7175.

58. Rivas A, Francis HW. Inner ear abnormalities in a Kcnq1 (Kvlqt1) knockout mouse: a model of Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology*. May 2005;26(3):415-424.
59. Roepke TK, Anantharam A, Kirchhoff P, Busque SM, Young JB, Geibel JP, Lerner DJ, Abbott GW. The KCNE2 potassium channel ancillary subunit is essential for gastric acid secretion. *The Journal of biological chemistry*. Aug 18 2006;281(33):23740-23747.
60. Roepke TK, Kanda VA, Purtell K, King EC, Lerner DJ, Abbott GW. KCNE2 forms potassium channels with KCNA3 and KCNQ1 in the choroid plexus epithelium. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. Dec 2011;25(12):4264-4273.
61. Roepke TK, King EC, Purtell K, Kanda VA, Lerner DJ, Abbott GW. Genetic dissection reveals unexpected influence of beta subunits on KCNQ1 K<sup>+</sup> channel polarized trafficking in vivo. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. Feb 2011;25(2):727-736.
62. Roepke TK, King EC, Reyna-Neyra A, Paroder M, Purtell K, Koba W, Fine E, Lerner DJ, Carrasco N, Abbott GW. Kcne2 deletion uncovers its crucial role in thyroid hormone biosynthesis. *Nature medicine*. Oct 2009;15(10):1186-1194.
63. Salsbury G, Cambridge EL, McIntyre Z, Arends MJ, Karp NA, Isherwood C, Shannon C, Hooks Y; Sanger Mouse Genetics Project, Ramirez-Solis R, Adams DJ, White JK, Speak AO. Disruption of the potassium channel regulatory subunit KCNE2 causes iron-deficient anemia. *Experimental hematology*. Dec 2014;42(12):1053-1058 e1051.
64. Barro-Soria R, Rebolledo S, Liin SI, Perez ME, Sampson KJ, Kass RS, Larsson HP. KCNE1 divides the voltage sensor movement in KCNQ1/KCNE1 channels into two steps. *Nature communications*. Apr 28 2014;5:3750.
65. Roepke TK, Purtell K, King EC, La Perle KM, Lerner DJ, Abbott GW. Targeted deletion of Kcne2 causes gastritis cystica profunda and gastric neoplasia. *PloS one*. Jul 06 2010;5(7):e11451.
66. Sabater-Lleal M, Malarstig A, Folkersen L, Soler Artigas M, Baldassarre D, Kavousi M, Almgren P, Veglia F, Brusselle G, Hofman A, Engström G, Franco OH, Melander O, Paulsson-Berne G, Watkins H, Eriksson P, Humphries SE, Tremoli E, de Faire U, Tobin MD, Hamsten A. Common genetic determinants of lung function, subclinical atherosclerosis and risk of coronary artery disease. *PloS one*. 2014;9(8):e104082.
67. Abbott GW, Tai KK, Neverisky DL, Hansler A, Hu Z, Roepke TK, Lerner DJ, Chen Q, Liu L, Zupan B, Toth M, Haynes R, Huang X, Demirbas D, Buccafusca R, Gross SS, Kanda VA, Berry GT. KCNQ1, KCNE2, and Na<sup>+</sup>-coupled solute transporters form reciprocally regulating complexes that affect neuronal excitability. *Science signaling*. Mar 04 2014;7(315):ra22.
68. Hu Z, Kant R, Anand M, King EC, Krogh-Madsen T, Christini DJ, Abbott GW. Kcne2 deletion creates a multisystem syndrome predisposing to sudden cardiac death. *Circulation. Cardiovascular genetics*. Feb 2014;7(1):33-42.
69. Fatini C, Sticchi E, Genuardi M, Sofi F, Gensini F, Gori AM, Lenti M, Michelucci A, Abbate R, Gensini GF. Analysis of minK and eNOS genes as candidate loci for predisposition to non-valvular atrial fibrillation. *European heart journal*. Jul 2006;27(14):1712-1718.
70. Xu LX, Yang WY, Zhang HQ, Tao ZH, Duan CC. [Study on the correlation between CETP TaqIB, KCNE1 S38G and eNOS T-786C gene polymorphisms for predisposition and non-valvular atrial fibrillation]. *Zhonghua liu xing bing xue za zhi = Zhonghua liuxingbingxue zazhi*. May 2008;29(5):486-492.
71. Husser D, Stridh M, Sornmo L, Roden DM, Darbar D, Bollmann A. A genotype-dependent intermediate ECG phenotype in patients with persistent lone atrial fibrillation genotype ECG-phenotype correlation in atrial fibrillation. *Circulation. Arrhythmia and electrophysiology*. Feb 2009;2(1):24-28.

72. Prystupa A, Dzida G, Myslinski W, Malaj G, Lorenc T. MinK gene polymorphism in the pathogenesis of lone atrial fibrillation. *Kardiologia polska*. Nov 2006;64(11):1205-1211; discussion 1212-1203.
73. Fatini C, Sticchi E, Marcucci R, Verdiani V, Nozzoli C, Vassallo C, Emdin M, Abbate R, Gensini GF. S38G single-nucleotide polymorphism at the KCNE1 locus is associated with heart failure. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society*. Mar 2010;7(3):363-367.
74. Ehrlich JR, Zicha S, Coutu P, Hebert TE, Nattel S. Atrial fibrillation-associated minK38G/S polymorphism modulates delayed rectifier current and membrane localization. *Cardiovascular research*. Aug 15 2005;67(3):520-528.
75. Olesen MS, Bentzen BH, Nielsen JB, Steffensen AB, David JP, Jabbari J, Jensen HK, Haunsø S, Svendsen JH, Schmitt N. Mutations in the potassium channel subunit KCNE1 are associated with early-onset familial atrial fibrillation. *BMC medical genetics*. 2012;13:24.
76. 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, Chen Y. Identification of a KCNE2 gain-of-function mutation in patients with familial atrial fibrillation. *American journal of human genetics*. Nov 2004;75(5):899-905.
77. Nielsen JB, Bentzen BH, Olesen MS, David JP, Olesen SP, Haunsø S, Svendsen JH, Schmitt N. Gain-of-function mutations in potassium channel subunit KCNE2 associated with early-onset lone atrial fibrillation. *Biomarkers in medicine*. 2014;8(4):557-570.
78. Lundby A, Ravn LS, Svendsen JH, Hauns S, Olesen SP, Schmitt N. KCNE3 mutation V17M identified in a patient with lone atrial fibrillation. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2008;21(1-3):47-54.
79. Zhang DF, Liang B, Lin J, Liu B, Zhou QS, Yang YQ. [KCNE3 R53H substitution in familial atrial fibrillation]. *Chinese medical journal*. Oct 20 2005;118(20):1735-1738.
80. Zeng Z, Tan C, Teng S, Chen J, Su S, Zhou X, Wang F, Zhang S, Gu D, Makielski JC, Pu J. The single nucleotide polymorphisms of I(Ks) potassium channel genes and their association with atrial fibrillation in a Chinese population. *Cardiology*. 2007;108(2):97-103.
81. Ravn LS, Aizawa Y, Pollevick GD, Hofman-Bang J, Cordeiro JM, Dixen U, Jensen G, Wu Y, Burashnikov E, Haunsø S, Guerchicoff A, Hu D, Svendsen JH, Christiansen M, Antzelevitch C. Gain of function in IKs secondary to a mutation in KCNE5 associated with atrial fibrillation. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society*. Mar 2008;5(3):427-435.
82. Ravn LS, Hofman-Bang J, Dixen U, Larsen SO, Jensen G, Haunsø S, Svendsen JH, Christiansen M. Relation of 97T polymorphism in KCNE5 to risk of atrial fibrillation. *The American journal of cardiology*. Aug 1 2005;96(3):405-407.
83. Lisewski U, Koehncke C, Wilck N, Buschmeyer B, Pieske B, Roepke TK. Increased aldosterone-dependent Kv1.5 recycling predisposes to pacing-induced atrial fibrillation in Kcne3<sup>-/-</sup> mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. Jul 2016;30(7):2476-2489.
84. Purtell K, Roepke TK, Abbott GW. Cardiac arrhythmia and thyroid dysfunction: a novel genetic link. *The international journal of biochemistry & cell biology*. Nov 2010;42(11):1767-1770.
85. Meeting Report: A Workshop to Plan a Deep Catalog of Human Genetic Variation, (2007) <http://www.1000genomes.org/sites/1000genomes.org/files/docs/1000Genomes-MeetingReport.pdf>
86. Lahiri DK, Nurnberger JI, Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic acids research*. Oct 11 1991;19(19):5444.
87. Wutzler A, Rolf S, Huemer M, Parwani AS, Boldt LH, Herberger E, Hohenbichler K, Dietz R, Haverkamp W. Safety aspects of deep sedation during catheter ablation of atrial fibrillation. *Pacing and clinical electrophysiology : PACE*. Jan 2012;35(1):38-43.
88. Evans W, Swann P. Lone auricular fibrillation. *British heart journal*. Apr 1954;16(2):189-194.
89. Potpara TS, Lip GY. A brief history of 'lone' atrial fibrillation: from 'a peculiar pulse irregularity' to a modern public health concern. *Current pharmaceutical design*. 2015;21(5):679-696.

90. Potpara TS, Lip GY. 'Lone' atrial fibrillation: no longer lone or even alone. *Current pharmaceutical design*. 2015;21(5):531-532.
91. Wyse DG, Van Gelder IC, Ellinor PT, Go AS, Kalman JM, Narayan SM, Nattel S, Schotten U, Rienstra M. Lone atrial fibrillation: does it exist? *Journal of the American College of Cardiology*. May 6 2014;63(17):1715-1723.
92. Fuster V, Ryden LE, Cannom DS, Crijns HJ, Curtis AB, Ellenbogen KA, Halperin JL, Kay GN, Le Huezey JY, Lowe JE, Olsson SB, Prystowsky EN, Tamargo JL, Wann LS. 2011 ACCF/AHA/HRS focused updates incorporated into the ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for the management of patients with atrial fibrillation: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines developed in partnership with the European Society of Cardiology and in collaboration with the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. *Journal of the American College of Cardiology*. Mar 15 2011;57(11):e101-198.
93. Jouven X, Desnos M, Guerot C, Ducimetiere P. Idiopathic atrial fibrillation as a risk factor for mortality. The Paris Prospective Study I. *European heart journal*. Jun 1999;20(12):896-899.
94. Potpara TS, Lip GY. Lone atrial fibrillation - an overview. *International journal of clinical practice*. Apr 2014;68(4):418-433.
95. Krahn AD, Manfreda J, Tate RB, Mathewson FA, Cuddy TE. The natural history of atrial fibrillation: incidence, risk factors, and prognosis in the Manitoba Follow-Up Study. *The American journal of medicine*. May 1995;98(5):476-484.
96. Klein I, Ojamaa K. Thyroid hormone and the cardiovascular system. *The New England journal of medicine*. Feb 15 2001;344(7):501-509.
97. Tribulova N, Knezl V, Shainberg A, Seki S, Soukup T. Thyroid hormones and cardiac arrhythmias. *Vascular pharmacology*. Mar-Apr 2010;52(3-4):102-112.
98. Floriani C, Gencer B, Collet TH, Rodondi N. Subclinical thyroid dysfunction and cardiovascular diseases: 2016 update. *European heart journal*. Feb 27 2017.
99. Seccia TM, Caroccia B, Adler GK, Maiolino G, Cesari M, Rossi GP. Arterial Hypertension, Atrial Fibrillation, and Hyperaldosteronism: The Triple Trouble. *Hypertension*. Apr 2017;69(4):545-550.
100. Ouyang F, Antz M, Ernst S, Hachiya H, Mavrakis H, Deger FT, Schaumann A, Chun J, Falk P, Hennig D, Liu X, Bänsch D, Kuck KH. Recovered pulmonary vein conduction as a dominant factor for recurrent atrial tachyarrhythmias after complete circular isolation of the pulmonary veins: lessons from double Lasso technique. *Circulation*. Jan 18 2005;111(2):127-135.
101. Li YY, Wang LS, Lu XZ. Mink S38G gene polymorphism and atrial fibrillation in the Chinese population: a meta-analysis of 1871 participants. *TheScientificWorldJournal*. 2014;2014:768681.
102. Han HG, Wang HS, Yin Z, Jiang H, Fang M, Han J. KCNE1 112G>a polymorphism and atrial fibrillation risk: a meta-analysis. *Genetics and molecular research : GMR*. 2014;13(4):8367-8377.
103. Sinner MF, Lubitz SA, Pfeufer A, Makino S, Beckmann BM, Lunetta KL, Steinbeck G, Perz S, Rahman R, Sonni A, Greenberg SM, Furie KL, Wichmann HE, Meitinger T, Peters A, Benjamin EJ, Rosand J, Ellinor PT, Käb S. Lack of replication in polymorphisms reported to be associated with atrial fibrillation. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society*. Mar 2011;8(3):403-409.
104. Sesti F, Abbott GW, Wei J, Murray KT, Saksena S, Schwartz PJ, Priori SG, Roden DM, George AL Jr, Goldstein SA. A common polymorphism associated with antibiotic-induced cardiac arrhythmia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Sep 12 2000;97(19):10613-10618.
105. Mann SA, Otway R, Guo G, Soka M, Karlsdotter L, Trivedi G, Ohanian M, Zodgekar P, Smith RA, Wouters MA, Subbiah R, Walker B, Kuchar D, Sanders P, Griffiths L, Vandenberg JI, Fatkin D. Epistatic effects of potassium channel variation on cardiac repolarization and atrial fibrillation risk. *Journal of the American College of Cardiology*. Mar 13 2012;59(11):1017-1025.

106. Mao T, Miao HJ, Xu GJ, Gan TY, Zhou XH, Zhang J, Li FP, Tang BP. [Association of single nucleotide polymorphism of KCNE1 and KCNE4 gene with atrial fibrillation in Xinjiang Uygur and Han population]. *Zhonghua xin xue guan bing za zhi*. Nov 2013;41(11):916-921.
107. Clayton D. Testing for association on the X chromosome. *Biostatistics*. Oct 2008;9(4):593-600.
108. Ohno S, Zankov DP, Ding WG, Itoh H, Makiyama T, Doi T, Shizuta S, Hattori T, Miyamoto A, Naiki N, Hancox JC, Matsuura H, Horie M. KCNE5 (KCNE1L) variants are novel modulators of Brugada syndrome and idiopathic ventricular fibrillation. *Circulation. Arrhythmia and electrophysiology*. Jun 2011;4(3):352-361.
109. Husser D, Adams V, Piorkowski C, Hindricks G, Bollmann A. Chromosome 4q25 variants and atrial fibrillation recurrence after catheter ablation. *Journal of the American College of Cardiology*. Feb 23 2010;55(8):747-753.
110. Imig JD, Hammock BD. Soluble epoxide hydrolase as a therapeutic target for cardiovascular diseases. *Nature reviews. Drug discovery*. Oct 2009;8(10):794-805.
111. Wutzler A, Kestler C, Perrot A, Loehr L, Huemer M, Parwani AS, Attanasio P, Özcelik C, Schunck WH, Gollasch M, Haverkamp W, Boldt LH. Variations in the human soluble epoxide hydrolase gene and recurrence of atrial fibrillation after catheter ablation. *International journal of cardiology*. Oct 9 2013;168(4):3647-3651.
112. Victor A. Bewertung genetischer Forschungsergebnisse. Methoden und vermeidbare Fehler. *G+G Wissenschaft (GGW)* 2007;7(4):14-22.
113. Ikeda Y, Kiyotani K, Yew PY, Kato T, Tamura K, Yap KL, Nielsen SM, Mester JL, Eng C, Nakamura Y, Grogan RH. Germline PARP4 mutations in patients with primary thyroid and breast cancers. *Endocrine-related cancer*. Mar 2016;23(3):171-179.
114. Shortt K, Chaudhary S, Grigoryev D, Heruth DP, Venkitachalam L, Zhang LQ, Ye SQ. Identification of novel single nucleotide polymorphisms associated with acute respiratory distress syndrome by exome-seq. *PloS one*. 2014;9(11):e111953.
115. Emond MJ, Louie T, Emerson J, Chong JX, Mathias RA, Knowles MR, Rieder MJ, Tabor HK, Nickerson DA, Barnes KC; NHLBI GO Exome Sequencing Project, Go L, Gibson RL, Bamshad MJ. Exome Sequencing of Phenotypic Extremes Identifies CAV2 and TMC6 as Interacting Modifiers of Chronic *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Cystic Fibrosis. *PLoS genetics*. Jun 2015;11(6):e1005273.
116. Gao L, Emond MJ, Louie T, Cheadle C, Berger AE, Rafaels N, Vergara C, Kim Y, Taub MA, Ruczinski I, Mathai SC, Rich SS, Nickerson DA, Hummers LK, Bamshad MJ, Hassoun PM, Mathias RA; National Heart, Lung, and Blood Institute GO Exome Sequencing Project, Barnes KC. Identification of Rare Variants in ATP8B4 as a Risk Factor for Systemic Sclerosis by Whole-Exome Sequencing. *Arthritis & rheumatology*. Jan 2016;68(1):191-200.
117. Morimoto T, Mineharu Y, Ono K, Nakatochi M, Ichihara S, Kabata R, Takagi Y, Cao Y, Zhao L, Kobayashi H, Harada KH, Takenaka K, Funaki T, Yokota M, Matsubara T, Yamamoto K, Izawa H, Kimura T, Miyamoto S, Koizumi A. Significant association of RNF213 p.R4810K, a moyamoya susceptibility variant, with coronary artery disease. *PloS one*. 2017;12(4):e0175649.
118. Wang H, Schmit SL, Haiman CA, Keku TO, Kato I, Palmer JR, van den Berg D, Wilkens LR, Burnett T, Conti DV, Schumacher FR, Signorello LB, Blot WJ, Zanetti KA, Harris C, Pande M, Berndt SI, Newcomb PA, West DW, Haile R, Stram DO, Figueiredo JC; Hispanic Colorectal **Cancer** Study, Le Marchand L. Novel colon cancer susceptibility variants identified from a genome-wide association study in African Americans. *International journal of cancer*. Mar 13 2017.
119. Al Balwi MA, Hadadi AI, Alharbi W, Ballow M, AlAsiri A, AlAbdulrahman A, G K U, Aldrees M, AlAbdulkareem I, Hajeer AH. Analysis of CCR5 gene polymorphisms in 321 healthy Saudis using Next Generation Sequencing. *Human immunology*. Apr 2017;78(4):384-386.
120. Bilous NI, Abramenko IV, Chumak AA, Dyagil IS, Martina ZV. The distribution of TP53 gene polymorphisms in chronic lymphocytic leukemia patients, sufferers of Chornobyl nuclear power plant accident. *Experimental oncology*. Dec 2016;38(4):252-256.



## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, David Munding, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchungen zu Mutationen in *KCNE* Genen und deren Auswirkung auf das Ablationsergebnis in einem „Real-life“ Patientenkollektiv mit Vorhofflimmern“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

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

Datum

Unterschrift

### **Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen**

Bisher existieren keine Publikationen zu dieser Dissertation.

## **Curriculum Vitae | David Munding**

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

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

## Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie meinem Doktorvater PD Dr. med. Leif-Hendrik Boldt und meinem Betreuer, PD Dr. med. Torsten Kai Röpke, für die Überlassung und Entwicklung des Themas sowie die konstante positive Unterstützung und Hilfestellung über den gesamten Zeitraum der Arbeit.

Bedanken möchte ich mich bei Dr. med. Clemens Köhncke, dessen hervorragender Studentenunterricht mich nachfragen ließ, ob und in welche Maße die Möglichkeit einer Dissertation besteht.

Ich danke Dipl. Ing. Andreas Perrot und Andrea Behm für die Beratung und unermüdliche Geduld und Hilfe bei der täglichen Arbeit im Labor.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Ulrike Liesewski, Saskia Reichert, Carolin Gärtner, Nora Lange, meinem Mitdoktoranden Dr. med. Leonhard Schleußner sowie dem gesamten weiteren Team der AG Röpke am MDC für die Unterstützung und positive Stimmung im Labor und darüber hinaus bedanken.

Bei allen Mitarbeitern, die in die aufwendige Probengewinnung und Datenbankpflege eingebunden sind, möchte mich ausdrücklich bedanken.

Meiner Frau, Olga Kibke, danke ich für die kontinuierliche Motivation während der letzten Jahre, die Arbeit trotz beruflicher Belastung zu Ende zu bringen sowie auch meiner Schwester, Esther Mundinger, für das Korrekturlesen in letzter Instanz.

Zu guter Letzt gilt ein besonders herzlicher Dank meinen Eltern, die mir mein Medizinstudium ermöglicht und mich in meinem beruflichen Werdegang immer bekräftigt haben.