

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchung genetischer Varianten im NPPA-Gen und ausgewählter
Polymorphismen im GJA5-Gen bei Vorhofflimmern

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Maren Theimer

aus Berlin

Datum der Promotion: 22.06.2014

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	Seite 5
1.1	Vorhofflimmern	Seite 5
1.1.1	Epidemiologie und Prognose	Seite 5
1.1.2	Pathogenese	Seite 6
1.1.3	Ätiologie	Seite 7
1.1.4	Verlaufsformen und Symptomatik	Seite 8
1.2	Genetik von Vorhofflimmern	Seite 8
1.3	Atriales Natriuretisches Peptid	Seite 10
1.3.1	Natriuretische Peptide und deren Rezeptoren	Seite 10
1.3.2	Synthese und Sekretion des Atrialen Natriuretischen Peptids	Seite 11
1.3.3	Wirkungen des Atrialen Natriuretischen Peptids	Seite 13
1.3.4	ANP bei Vorhofflimmern	Seite 14
1.4	Connexin40	Seite 16
1.4.1	Gap Junctions und kardiale Connexine	Seite 16
1.4.2	GJA5-Gen und Proteinaufbau	Seite 17
1.4.3	Connexin40 und Vorhofflimmern	Seite 18
2.	Fragestellung	Seite 22
3.	Methoden	Seite 23
3.1	Studiendesign	Seite 23
3.2	Patientenrekrutierung	Seite 23
3.2.1	Ein- und Ausschlusskriterien	Seite 24
3.2.2	Einteilung der Patienten	Seite 24
3.3	DNA-Extraktion	Seite 25
3.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	Seite 25
3.4.1	Durchführung	Seite 25
3.4.2	Auswertung	Seite 27
3.4.3	Optimierung der Annealing-Temperatur	Seite 27
3.5	Agarose-Gelelektrophorese	Seite 28

Inhaltsverzeichnis

3.5.1	Vorbereitung	Seite 28
3.5.2	Durchführung	Seite 29
3.6	Sequenzierung	Seite 29
3.6.1	Vorbereitung zur Sequenzierung	Seite 29
3.6.2	Automatische Sequenzierung	Seite 32
3.6.3	Auswertung	Seite 32
3.7	Restriktionsanalyse	Seite 32
3.7.1	Vorbereitung	Seite 33
3.7.2	Durchführung	Seite 33
3.7.3	Auswertung	Seite 34
3.8	Benennung von Varianten	Seite 34
3.9	Statistik	Seite 35
3.10	Verwendetes Wasser	Seite 36
3.11	Verwendete Chemikalien	Seite 36
3.12	Weitere verwendete Geräte	Seite 36
3.13	Sonstige verwendete Materialien	Seite 37
3.14	Software und URLs	Seite 37
3.14.1	Sequencher 4.1 DNA Sequence Assembly Software	Seite 37
3.14.2	SPSS 15.0	Seite 37
3.14.3	NCBI Gene	Seite 37
3.14.4	Ensembl Genome Browser	Seite 38
3.14.5	Primer 3	Seite 38
3.14.6	GENSCAN	Seite 38
4.	Ergebnisse	Seite 39
4.1	Charakterisierung des Patientenkollektivs	Seite 39
4.2	Atriales Natriuretisches Peptid	Seite 39
4.2.1	Assoziation von bekannten Polymorphismen mit Vorhofflimmern	Seite 40
4.2.1.1	Polymorphismen c.94G>A und c.454T>C	Seite 40
4.2.1.2	Polymorphismen der 3'-UTR	Seite 44
4.2.2	Weitere bekannte Varianten des NPPA-Gens	Seite 45
4.2.3	Neu gefundene Varianten	Seite 45
4.2.3.1	Synonyme Varianten	Seite 45

Inhaltsverzeichnis

4.2.3.2 Intronische Varianten	Seite 46
4.2.3.3 Missense-Varianten	Seite 46
4.3 Connexin40	Seite 48
4.3.1 Assoziation des Promotorpolymorphismus c.-44G>A mit Vorhofflimmern	Seite 48
5. Diskussion	Seite 51
5.1 Atriales Natriuretisches Peptid	Seite 51
5.1.1 Assoziation von bekannten Polymorphismen mit Vorhofflimmern	Seite 51
5.1.1.1 Polymorphismen c.94G>A und c.454T>C	Seite 51
5.1.1.2 Polymorphismen der 3'-UTR	Seite 53
5.1.2 Weitere bekannte Varianten	Seite 53
5.1.3 Neu gefundene Varianten	Seite 53
5.2 Connexin40	Seite 56
5.3 Limitationen	Seite 57
5.3.1 Studiendesign	Seite 57
5.3.2 Experimentelle Methoden	Seite 58
5.4 Schlussfolgerungen	Seite 58
6. Zusammenfassung	Seite 60
7. Literaturverzeichnis	Seite 61
8. Abkürzungsverzeichnis	Seite 66
9. Danksagung	Seite 69

1. Einleitung

1.1 Vorhofflimmern

Vorhofflimmern (VHF) ist eine supraventrikuläre Herzrhythmusstörung, die durch eine unkoordinierte Erregung und einer damit verbundenen Funktionsminderung der Herzvorhöfe gekennzeichnet ist.¹

Bei der normalen Herzaktion werden die Vorhöfe vom Sinusknoten etwa 70 Mal pro Minute erregt. Diese Erregung breitet sich zielgerichtet über die Vorhöfe in Richtung Atrioventrikularknoten (AV-Knoten) und darüber zu den Herzkammern aus. Beim VHF hingegen werden die Vorhöfe mit einer Frequenz von 400 bis 600 Schlägen pro Minute erregt und unterstehen nicht mehr der physiologischen Kontrolle des Sinusknotens. Durch die Filterfunktion des AV-Knotens wird nicht jede ankommende Erregung an die Kammern weitergeleitet, sodass die Ventrikel nicht rhythmisch (Arrhythmia absoluta) mit einer Frequenz von typischerweise 150 Schlägen pro Minute schlagen.²

Im Elektrokardiogramm (EKG) stellt sich VHF durch das Fehlen von für die normale Vorhoferregung typischen P-Wellen und den Ersatz dieser durch Flimmerwellen, die sich in Amplitude, Form und zeitlichem Auftreten unterscheiden, dar. Die normal geformten QRS-Komplexe als Korrelat für die Kammererregung treten in unregelmäßigen Intervallen auf.¹

1.1.1 Epidemiologie und Prognose

VHF ist die häufigste Herzrhythmusstörung des Menschen. Sie wird bei etwa 1% der erwachsenen Allgemeinbevölkerung beobachtet. Die Prävalenz ist stark altersabhängig und steigt von etwa 0,1% bei unter 55-Jährigen auf bis zu 9% bei über 80-Jährigen.³ Das Lebenszeit-Risiko, an Vorhofflimmern zu erkranken, beträgt bei über 40-Jährigen etwa 25%. Dabei haben Männer im Vergleich zu Frauen ein 1,5-fach erhöhtes Risiko für die Erkrankung.⁴

VHF ist mit einem erhöhten Risiko für Schlaganfall und Herzinsuffizienz verbunden. Die Hospitalisierungsrate ist 2- bis 2,5-fach erhöht. Die Mortalität für Patienten mit VHF ist etwa doppelt so hoch wie die für Patienten ohne VHF und hängt von der Schwere der zugrunde liegenden Herzerkrankungen ab. So ist VHF eng mit Herzinsuffizienz verbunden. Eine Herzinsuffizienz fördert VHF und VHF wiederum verschlimmert die Herzinsuffizienz. Des Weiteren ist das Risiko, einen Schlaganfall zu erleiden, bei VHF 4- bis 5-fach erhöht.⁴ Etwa jeder sechste Schlaganfall tritt bei einem Patienten mit VHF auf.⁵ Weitere Risikofaktoren für

Einleitung

einen Schlaganfall bei Patienten mit VHF sind fortgeschrittenes Alter, früher stattgefundene Schlaganfälle bzw. transitorische ischämische Attacken (TIA), Hypertonie, Herzinsuffizienz und Diabetes mellitus.⁶

Die Prognose ist somit von einer konsequenten Therapie der kardialen und extrakardialen Grund- bzw. Begleiterkrankungen und einer guten Thrombembolieprophylaxe abhängig. In verschiedenen Studien hat sich jedoch gezeigt, dass es keinen Prognoseunterschied bezüglich Morbidität und Mortalität zwischen einer Therapie mittels Rhythmuskontrolle (Sinusrhythmus-erhaltende Therapie) und einer Therapie mit Frequenzkontrolle gibt.⁷⁻⁹

1.1.2 Pathogenese

Es gibt unterschiedliche Theorien über die Entstehungsmechanismen von VHF. Die Vorgänge sind komplex, es bedarf eines auslösenden Ereignisses und eines aufrechterhaltenden Faktors. Die beiden am weitesten verbreiteten Theorien sind die der fokalen Automatie und die der kreisenden Erregung (Reentry). Beide Mechanismen schließen sich nicht gegenseitig aus und können im gleichen Patienten nebeneinander auftreten.

Die Theorie der fokalen Automatie geht davon aus, dass ein sich rasch entladender, spontan aktiver Fokus in den Vorhöfen existiert, von dem das VHF ausgeht. Dabei können die Myokardzellen in diesem Bereich, ähnlich wie im Sinusknoten, einer repetitiven diastolischen Depolarisation unterliegen, z.B. bei akuter myokardialer Ischämie. Sie können aber auch im Anschluss an ein Aktionspotential nachdepolarisiert werden (afterdepolarisation). Insbesondere die Pulmonalvenen scheinen hierfür von besonderer Bedeutung zu sein.²

Reentry entsteht durch eine abnormale Erregungsleitung zwischen zwei Gewebezonen. Im Anschluss an ein Aktionspotential ist eine Zelle refraktär, d.h. sie ist durch Inaktivierung der schnellen Na^+ -Kanäle nicht wieder erregbar bis sie im Verlauf der Repolarisation ein bestimmtes Potential erreicht (etwa -60mV). Bei gestörter Erregungsausbreitung oder Erregungsrückbildung kann jedoch die gleiche Erregungswelle auf bereits wieder aktivierbare Myokardzellen treffen und diese erneut erregen (Reentry). Dadurch kann es zum Auftreten kreisender Erregungen kommen. Dabei können sich eine einzelne kreisende Erregung oder multiple kreisende Erregungen bilden. Letztere führen zu einer unregelmäßigen Aktivität des Myokards und werden dem VHF zugrunde gelegt. Die beim Reentry stattfindenden Prozesse hängen stark von der Refraktärzeit ab. Je länger die Refraktärzeit dauert, desto wahrscheinlicher trifft die kreisende Erregung auf noch nicht wieder erregbares Gewebe und wird gestoppt.²

Einleitung

In Tierversuchen besteht künstlich induziertes VHF nur für wenige Sekunden und ist selbstlimitierend. Bei Änderungen der elektrophysiologischen und strukturellen Eigenschaften der Vorhöfe kann es jedoch persistieren. Diese Veränderungen können durch kardiale Begleiterkrankungen wie hypertensive Herzkrankheit oder Herzinsuffizienz bedingt sein. Allerdings führt auch VHF selbst zu Veränderungen, die VHF begünstigen, dem sogenannten Remodeling.¹⁰

Durch die fast 10-fache Frequenzzunahme in den Vorhöfen kommt es bei VHF zu einer intrazellulären Ca^{2+} -Überladung, die die zelluläre Integrität gefährdet. Dies führt bereits Minuten bis Stunden nach Beginn des VHF zu einer Inaktivierung der L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle und damit zu einer Abnahme des Ca^{2+} -Einwärtsstroms (I_{Ca}). Über längere Zeit (Stunden bis Tage) wird auch die Expression der L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle an der Zelloberfläche vermindert. Dies führt zu einer weiteren Abnahme von I_{Ca} . Da I_{Ca} aber maßgeblich an der Plateauphase des kardialen Aktionspotentials (AP) und damit an der AP-Dauer beteiligt ist, führen die Veränderungen der Ca^{2+} -Ströme zu einer Verkürzung der AP-Dauer. Dies führt auch zu einer verkürzten Refraktärzeit, was wiederum die Aufrechterhaltung von kreisenden Erregungen, und damit VHF, fördert. Diese Vorgänge werden als elektrisches Remodeling zusammengefasst.²

VHF führt jedoch auch zu einem strukturellen Remodeling an den Vorhöfen. So löst es durch den Kontraktilitätsverlust eine atriale Dilatation aus. Diese bewirkt eine Vermehrung der extrazellulären Matrix und führt zur Fibrose.¹ Dadurch werden die myokardialen Zell-Zell-Kontakte und damit die elektrische Homogenität beeinflusst, wodurch wiederum VHF gefördert wird.¹⁰ Außerdem werden zelluläre Veränderungen wie Hypertrophie, perinukleäre Glykogenansammlung und Myolyse ausgelöst. Dies scheint die Myozyten vor dem hohen metabolischen Stress zu schützen, der mit der hohen atrialen Frequenz bei VHF einhergeht.¹¹

1.1.3 Ätiologie

Bei 15-36% der Patienten lassen sich keine fassbaren Ursachen für das VHF finden, es handelt sich dann um idiopathisches VHF ("lone AF"). In dieser Gruppe lässt sich in 15% der Fälle eine familiäre Häufung feststellen.³

Meist liegen dem VHF jedoch prädisponierende Krankheiten zugrunde (sekundäres VHF). Diese umfassen Herzklappenerkrankungen (meist Mitralklappenvitien), Herzinsuffizienz, Koronare Herzkrankheit (KHK) und Hypertonie, vor allem wenn diese mit einer Linksherzhypertrophie einhergeht. Weitere Risikofaktoren für VHF sind z.B. Diabetes

Einleitung

mellitus, Adipositas und fortgeschrittenes Alter. Des Weiteren kann VHF auch aufgrund von akuten, temporär vorhandenen, kardialen sowie extrakardialen Ursachen entstehen. Dies umfasst z.B. akute Myokardinfarkte, Myokarditis, Perikarditis, Herzoperationen, Lungenarterienembolie, Alkoholkonsum („Holiday Heart Syndrome“), Stromschlag oder Hyperthyreose.¹

Sowohl bei lone AF als auch bei sekundärem VHF scheinen jedoch auch genetische Faktoren eine Rolle zu spielen (siehe 1.2).

1.1.4 Verlaufsformen und Symptomatik

Vorhofflimmern wird entsprechend verschiedener Verläufe wie folgt eingeteilt:

- Erste Episode
- Paroxysmales VHF
- Persistierendes VHF
- Permanentes VHF

Die erstmalige Feststellung von VHF bei einem Patienten wird abgegrenzt, da zu diesem Zeitpunkt meist Unklarheit über die Dauer der Episode und über das Auftreten früherer Episoden besteht. Tritt das VHF ein zweites Mal oder öfter auf, wird es als rekurrent bezeichnet. Paroxysmales VHF terminiert laut Definition spontan innerhalb von 7 Tagen, meist jedoch in weniger als 24 Stunden, nach Auftreten. Bleibt das VHF mehr als 7 Tage bestehen oder wird durch eine medikamentöse bzw. elektrische Kardioversion beendet, besteht persistierendes VHF. Langanhaltendes VHF, bei dem eine Kardioversion nicht erfolgreich ist bzw. bei geringer Erfolgsaussicht nicht versucht wird, bezeichnet man als permanentes VHF.¹

Die Symptomatik bei VHF ist sehr weitgefächert. Während einige Patienten asymptomatisch sind, treten bei anderen Symptome wie Herzklopfen, Schwindel, Müdigkeit, Polyurie, Dyspnoe, Brustschmerz oder Synkopen auf. Auch können sich beim selben Patienten symptomatische und asymptomatische Episoden abwechseln.¹²

1.2 Genetik von Vorhofflimmern

Vorhofflimmern ist weit verbreitet und oft mit prädisponierenden Faktoren assoziiert. Einerseits gibt es Patienten, bei denen keine fassbare Ursache für die Erkrankung festzustellen ist oder bei denen sogar eine familiäre Häufung von VHF vorliegt. Andererseits bleiben andere Patienten im Sinusrhythmus, obwohl sie einen oder mehrere Risikofaktoren für die

Einleitung

Erkrankung aufweisen. Beides weist auf einen Einfluss genetischer Komponenten als prädisponierenden Faktor hin.³

Weitere Indizien für einen genetischen Hintergrund von VHF ergaben sich in einigen Studien, die ein erhöhtes Risiko für VHF bei Kindern, deren Eltern bereits an VHF erkrankt waren, unabhängig von bestehenden Risikofaktoren nachwiesen. So untersuchten Fox et al. bei 2243 Nachfahren von Teilnehmern der Framingham-Herzstudie diesen Zusammenhang.¹³ Es zeigte sich nach Korrektur bestehender Risikofaktoren, dass das Risiko an VHF zu erkranken um 85% erhöht ist, wenn mindestens ein Elternteil selbst VHF aufweist. Bei Betrachtung der Werte für Eltern und Nachkommen unter 75 Jahren ergab sich sogar ein noch stärkerer Zusammenhang (Odds Ratio 3,23; 95% Konfidenzintervall 1,87-5,58; $P < 0,001$). Es war die erste Studie, die eine familiäre Komponente für VHF in einer bevölkerungsbasierten Population nachwies. Auch Arnar et al. konnten familiäre Häufung in einer isländischen Population zeigen.¹⁴ Sie analysierten bei 5269 Patienten die Auswirkungen der Verwandtschaftsgrade auf das Risiko, VHF zu entwickeln. Dabei stellten sie fest, dass Verwandte ersten Grades eines Patienten mit VHF ein 1,77-fach erhöhtes Risiko haben, selbst an VHF zu erkranken. Ist der Patient bei Diagnosestellung unter 60 Jahre alt gewesen, so ergibt sich für Verwandte ersten Grades sogar ein 4,67-fach erhöhtes Risiko verglichen mit einer Kontrollpopulation. Arnar et al. beobachteten außerdem einen exponentiellen Abfall des Relativen Risikos mit dem Grad der Verwandtschaft, was mit einem abnehmenden Anteil der vom gemeinsamen Vorfahren stammenden Allele übereinstimmt.¹⁴

Aufgrund dieser Hinweise für einen genetischen Hintergrund von VHF, wurden in den letzten Jahren vielfach Studien zur Identifizierung verantwortlicher Gene durchgeführt. Dabei entwickelten sich zwei unterschiedliche Ansätze. Zum einen werden monogene Formen der Erkrankung untersucht, indem man familiäre Fälle von VHF betrachtet. Dabei werden meist Kopplungsanalysen durchgeführt, um eine Mutation zu finden, die nur bei den phänotypisch betroffenen Familienmitgliedern vorkommt. Oft finden sich diese Mutationen in Genen, die für Untereinheiten verschiedener Ionenkanäle kodieren.³ So wurden Varianten in Genen für verschiedene K^+ -Kanal-Untereinheiten des Herzens (KCNQ1, KCNE2, KCNJ2, KCNH2) gefunden, welche häufig durch eine Funktionszunahme zu einer Verkürzung der Refraktärzeit und damit zum erleichterten Reentry führen.¹⁵ Zum anderen werden bei nicht familienbasierten Formen von VHF sogenannte Single Nucleotide Polymorphismen (SNPs) untersucht. SNPs sind einzelne Basenpaare in der DNA-Sequenz, für die mehrere Varianten (Allele) in einer Population existieren, wobei die seltenste dieser Varianten in einer

Einleitung

Häufigkeit von mindestens 1% vorkommt.¹⁶ Um den Einfluss eines SNP auf die Entwicklung von VHF zu untersuchen, wendet man Assoziationsstudien an. Dabei geht man davon aus, dass die Allel-Frequenzen der Variante in der erkrankten Population anders verteilt sind als in der gesunden Bevölkerung. Es werden SNPs in zuvor gewählten sogenannten Kandidatengen untersucht, d.h. in Genen, welche pathophysiologisch eine Rolle spielen könnten. Mit diesem Ansatz sind bereits Assoziationen von VHF mit SNPs in Genen für verschiedene Ionenkanäle bzw. deren Untereinheiten (KCNE1, GNB3, SCN5A), aber z.B. auch mit Varianten in Genen des Renin-Angiotensin-Systems, des Connexin40-Gens und mit Genen, die in entzündlichen Prozessen eine Rolle spielen (eNOS, IL10), gefunden worden.¹⁵ Außerdem wurde vor kurzem in einer familiären Untersuchung in dem für das Atriale Natriuretische Peptid (ANP) kodierenden Gen eine Variante gefunden, die durch Bildung eines veränderten Peptids die Entstehung von VHF zu begünstigen scheint (siehe 1.3.4).¹⁷

1.3 Atriales Natriuretisches Peptid

1.3.1 Natriuretische Peptide und deren Rezeptoren

Die Natriuretischen Peptide (NP) sind eine Familie von Peptiden, die hauptsächlich natriuretische, diuretische, vasodilatorische und antimitotische Effekte zur Reduzierung des Blutdrucks und zur Regulation des Flüssigkeitshaushaltes vermitteln.^{18, 19} Die Familie besteht aus dem Atriale Natriuretischen Peptid (ANP), dem B-Typ Natriuretischen Peptid (BNP, ursprünglich als Brain Natriuretic Peptide beschrieben) und dem C-Typ Natriuretischen Peptid (CNP). Alle drei NPs werden nach deren Synthetisierung in Form von Prohormonen gespeichert. Sie werden von drei unterschiedlichen Genen kodiert. Die für ANP und BNP kodierenden Gene sind wahrscheinlich durch Duplikationen des CNP-Gens entstanden. Dies zeigt sich in der Struktur der Peptide, die alle die konservierte Aminosäure-Sequenz CFGXXXDRXXXXGLGC enthalten, wobei X jede Aminosäure (AS) sein kann. Die flankierenden Cysteine sind durch eine Disulfidbrücke verbunden, sodass sich eine Ringstruktur innerhalb der Peptide ergibt (Abb. 1.1). Diese ist für die biologische Aktivität der NPs essentiell.²⁰

Es sind drei Rezeptoren bekannt, an die NPs binden: Natriuretic Peptide Receptor A (NPRA), Natriuretic Peptide Receptor B (NPRB) und Natriuretic Peptide Receptor C (NPRC). ANP und BNP vermitteln ihre physiologischen Effekte über NPRA, während CNP NPRB aktiviert. Beide Rezeptoren beinhalten eine Guanylyl-Cyclase-Domäne, die in Antwort auf die Bindung

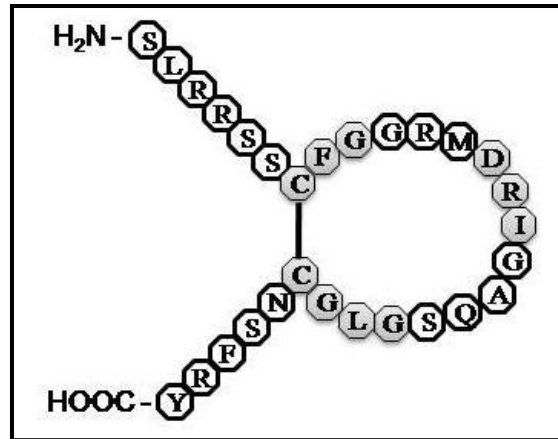


Abb. 1.1 Struktur des Atrialen Natriuretischen Peptids (ANP). Die 17 Aminosäuren (AS) umfassende, durch eine Disulfidbrücke verbundene Ringstruktur ist in allen drei Natriuretischen Peptiden (ANP, BNP und CNP) enthalten und wird für dessen Aktivität benötigt. Die grau hinterlegten AS sind in allen drei NPs vorhanden, die schwarze Linie zwischen Cystein 7 und Cystein 23 stellt die Disulfidbrücke dar. (Adaptiert nach Potter 2006)²⁰

des entsprechenden Peptids zum Rezeptor den Second Messenger cGMP produziert. NPRC hingegen wird von allen drei NPs gleichermaßen aktiviert und besitzt keine katalytische Domäne. Der Rezeptor wird auch als „Clearance Receptor“ bezeichnet und scheint für die Eliminierung der Peptide aus der Zirkulation verantwortlich zu sein.²⁰

1.3.2 Synthese und Sekretion des Atrialen Natriuretischen Peptids

Das Atriale Natriuretische Peptid (Atrial Natriuretic Peptide, ANP), auch bekannt als Atrialer Natriuretischer Faktor, Cardionatriin, Cardiodilatin oder Atriopeptin, wird hauptsächlich in atrialen Myokardzellen gebildet und gespeichert.²⁰ Auch in den Ventrikeln wird ANP gebildet, jedoch in etwa 100-fach kleineren Konzentrationen als in den Vorhöfen. Dies spiegelt sich auch in den intrazellulären ANP-mRNA-Konzentrationen wider. Außerdem wird ANP auch in extrakardialen Geweben wie Niere, Lunge, Nebenniere, Hoden, Aortenbogen, Hypophysenvorderlappen, Hypothalamus und Gehirn gebildet. Die Herzvorhöfe exprimieren allerdings 50- bis 100-mal mehr ANP-mRNA verglichen mit den extrakardialen Geweben.¹⁸

Das Gen, das für das ANP-Prohormon kodiert (Natriuretic Peptide Precursor A, NPPA), findet sich auf Chromosom 1p36.2. Es besitzt viele für eukaryotische Gene typische Eigenschaften wie eine TATTA-Box, den Übergang von den Exons in die Introns mit einem Splice-Signal (Sequenz GT-AG), eine typische Konsensussequenz im Promotor oder auch eine AATAA-Polyadenylations-Signalsequenz. Das Transkript ist insgesamt 950 bis 1050 bp groß. Die mRNA enthält eine „Cap“-Sequenz am 5'-Ende und ein Stopp-Codon. Beim

Einleitung

Menschen ist in Intron 2 eine Konsensussequenz für ein mögliches regulatorisches Element für Glucocorticoide enthalten. Das Gen besteht aus drei Exons und zwei dazwischenliegenden Introns. Exon 1 kodiert für die 5'-untranslatierte Region (5'-UTR), das Signalpeptid und die ersten 16 AS des ANP-Prohormons. Exon 2 kodiert für die AS 17-125 und Exon 3 für das letzte Tyrosin des ProANP und die 3' untranslatierte Region (3'-UTR). Das NPPA-Gen wird zunächst in Form eines 151 AS umfassenden Präprohormons (PräproANP) translatiert. Von diesem wird im Endoplasmatischen Retikulum das Signalpeptid abgespalten, wodurch ProANP (126 AS) entsteht.²¹ Das biologisch aktive, 28 AS umfassende ANP wird durch

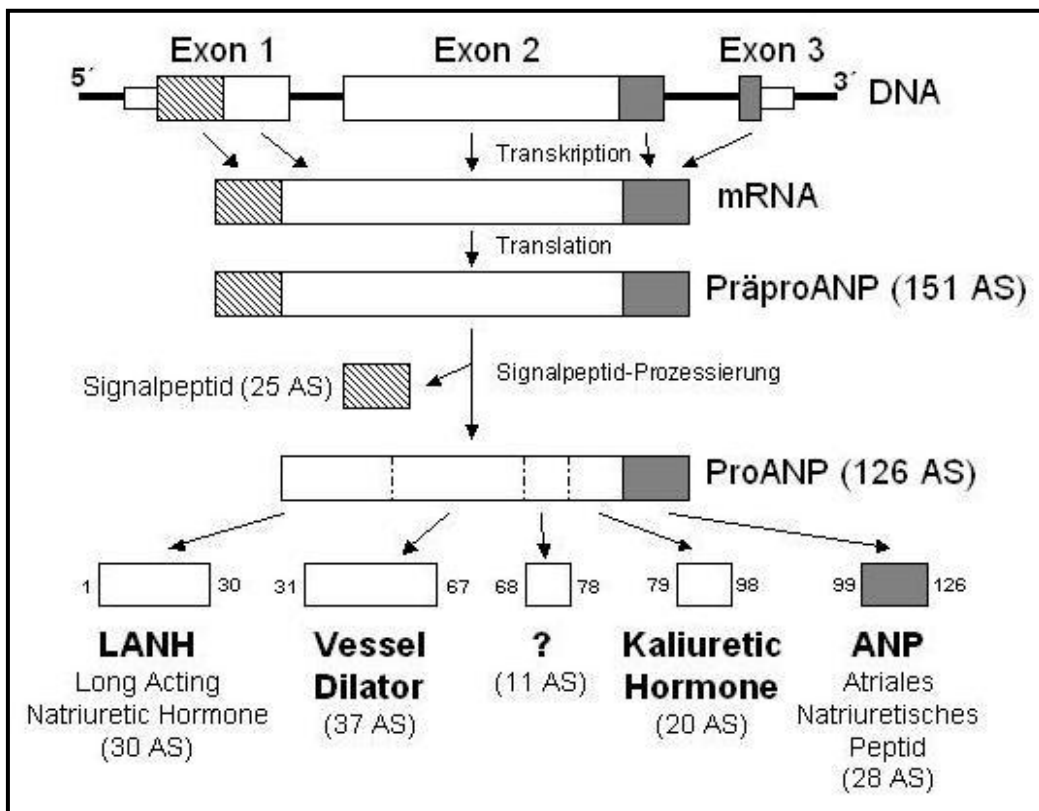


Abb. 1.2 Schema der Expression des NPPA-Gens in den atrialen Myokardzellen. (Adaptiert nach Vesely 2001)²²

die Protease Corin vom C-terminalen Ende des Prohormons abgeschnitten.²⁰ Die überbleibenden 98 AS des N-Terminus werden ebenfalls zu weiteren Peptiden prozessiert: Long Acting Natriuretic Hormone (LANH, AS 1-30 des Prohormons), Vessel Dilator (AS 31-67 des ProANP) und Kaliuretic Hormone (AS 79-98 des ProANP). Diese Peptide zirkulieren genau wie ANP im Blut und vermitteln ähnliche Effekte wie ANP. LANH und Vessel Dilator haben jedoch einen anderen Wirkmechanismus als ANP. So inhibieren sie die renale $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase sekundär durch eine gesteigerte Prostaglandin E_2 -Synthese.²²

Einleitung

In der Niere wird das ANP-Prohormon in unterschiedlicher Weise prozessiert. Dort wird ein Peptid gebildet, welches am N-Terminus von ANP zusätzlich weitere 4 AS enthält (Urodilatin, AS 95-126 des ProANP). Urodilatin scheint nur im Urin vorhanden zu sein, seine physiologischen Funktionen sind weitestgehend unbekannt, es könnte jedoch eine Rolle bei der renalen Wasser- und Natrium-Ausscheidung spielen.¹⁸

ANP wird in den atrialen Granula in Form des Prohormons gespeichert. Die Spaltung des Prohormons in die einzelnen Peptide erfolgt direkt vor bzw. während der Sekretion.²⁰ Die Sekretion wird hauptsächlich durch die Dehnung der Vorhöfe stimuliert. Die Dehnung ist ein Zeichen für ein erhöhtes Blutvolumen, welches zu einem erhöhten Druck in den Vorhöfen führt. Ist der Druck um 4 bis 6 mmHg erhöht, werden die oben genannten vier Peptide in den Kreislauf abgegeben und führen zu einer Verminderung des Blutvolumens. Auch Thyroidhormone und Glucocorticoide führen zu einer erhöhten Expression dieser Peptide. Diese wiederum senken durch einen negativen Feedbackmechanismus die zirkulierende Konzentration von Cortisol. Des Weiteren stimulieren vasokonstriktive Peptide wie Endothelin, Norepinephrin und Angiotensin II die proANP-Transkription und -Sekretion.^{21, 23}

1.3.3 Wirkungen des Atrialen Natriuretischen Peptids

Die Wirkungen von ANP werden über NPRA vermittelt. Der Rezeptor wird vor allem in Niere, Nebenniere, terminalem Ileum, Fettgewebe, Aorta und Lunge exprimiert. Er hat eine Wachstumsfaktor-Rezeptor-ähnliche Struktur. Er besteht aus einer extrazellulären Ligand-bindenden Domäne, einer hydrophoben Membran-durchspannenden Region und einer intrazellulären Domäne. Letztere enthält unter anderem eine Guanylyl-Cyclase-Domäne. Ein Molekül ANP bindet an zwei, ein Dimer bildende, Rezeptor-Moleküle. Daraufhin ändern die Rezeptoren ihre Konformation. Dadurch wird die normalerweise vorhandene Hemmung der Guanylyl-Cyclase aufgehoben, welche nun vermehrt cGMP bildet. cGMP bindet an Ionenkanäle, Proteinkinasen und Phosphodiesterasen und vermittelt durch deren Aktivierung bzw. Hemmung die zellulären Effekte von ANP.²⁰

ANP spielt eine wichtige Rolle bei der akuten, weniger bei der chronischen Blutdruckregulation. Die Ausschüttung von ANP führt durch verschiedene Mechanismen zu einer Senkung des Blutdruckes. Zum einen stimuliert es die Relaxation der vaskulären glatten Muskelzellen, wodurch es zur Vasodilatation kommt.²⁰ Zudem verursacht es durch eine Erhöhung der Permeabilität des Endothels eine Verschiebung der intravaskulären Flüssigkeit in den Extravaskulärraum.¹⁹ Zum anderen hemmt ANP in physiologischen Konzentrationen

Einleitung

sowohl die Freisetzung von Renin als auch die Sekretion von Aldosteron. Dies führt zu einer Hemmung des blutdruck-erhöhenden Renin-Angiotensin-Aldosteron-System.²⁰ Zum dritten bewirkt ANP in der Niere eine Steigerung der Diurese und Natriurese, was wiederum zu einer Senkung des Blutvolumens führt. Dies wird durch hämodynamische sowie direkte tubuläre Einflüsse erreicht. So steigert ANP durch Vasodilatation der afferenten und Vasokonstriktion der efferenten glomerulären Arteriolen den Druck in den glomerulären Kapillaren und damit die glomeruläre Filtrationsrate. Durch eine Relaxation der Mesangiumzellen wird außerdem die für die Filtration zur Verfügung stehende Oberfläche vergrößert. Im proximalen Tubulus hemmt ANP den Angiotensin II-stimulierten Natrium- und Wasser-Transport. Im Sammelrohr kann es den Amilorid-sensitiven Kationen-Kanal und auch die Effekte von Vasopressin inhibieren, was zu einem weiteren Rückgang der Natrium- und Wasser-Rückabsorption führt. Zusätzlich wirkt ANP auch im Gehirn. Seine Wirkungen dort verstärken die peripheren Wirkungen weiter. So hemmt ANP beispielsweise den Salz-Appetit und das Durstgefühl. Außerdem hemmt es die Freisetzung von Vasopressin und reduziert den Sympathikotonus.¹⁹ Auch in der Lunge hat ANP Blutdruck-regulierende Effekte. Hier führt es zu einer Dilatation der pulmonalen Blutgefäße sowie der Bronchien.²⁰

Doch ANP hat auch andere Effekte. So steigert es die Lipolyse im Fettgewebe, wirkt antiinflammatorisch und scheint einen hemmenden Effekt auf das Blutdruck-induzierte Remodeling zu besitzen.²⁰

1.3.4 ANP bei Vorhofflimmern

Im Rahmen von VHF kommt es zu einem Anstieg der Plasma-Konzentration von ANP, LANH und Vessel Dilator.²² Dabei geht man davon aus, dass es durch die Dehnung der Vorhöfe beim Auftreten von akuten VHF-Episoden zur Ausschüttung dieser Peptide kommt. Bei länger andauerndem, chronischem VHF zeigte sich jedoch, dass die Plasma-ANP-Konzentrationen wieder fallen. Dies ist mit der reduzierten Kapazität der Vorhöfe für die Produktion von ANP durch das strukturelle Remodeling erklärbar (siehe 1.1.2). Nach Wiederherstellung eines Sinusrhythmus fällt die ANP-Konzentration schnell wieder auf normale Werte ab.²⁴

Des Weiteren könnten erhöhte Plasma-Werte von ANP bzw. strukturell verändertes ANP ursächlich für die Entstehung von VHF sein. So wurde gezeigt, dass ANP in den Vorhöfen gesunder humaner Herzen zu einer Verkürzung der atrialen Weiterleitungszeit und damit auch

Einleitung

der effektiven Refraktärzeit führt. Dies wiederum fördert die Entstehung atrialer Arrhythmien.²⁵

Eine mögliche Verbindung zwischen Varianten im NPPA-Gen und VHF konnte zunächst durch Assoziationen von c.94G>A (p.Val32Met) und c.454T>C (p.X152Arg) mit Hypertonus und Schlaganfall angenommen werden. So berichteten Conen et al. in einer prospektiven Studie über eine Assoziation dieser NPPA-Varianten mit einer Progression und mit dem Neuauftreten eines Hypertonus bei über 18.000 kaukasischen Frauen.^{26, 27} Rubattu et al. fanden darüber hinaus in einer prospektiven Studie mit etwa 22.000 US-Amerikanern und einer Assoziationsstudie mit 206 aus Sardinien stammenden Schlaganfall-Patienten und 236 Kontrollen eine Assoziation zwischen den Varianten c.94G>A (p.Val32Met) bzw. c.454T>C (p.X152Arg) und dem Auftreten von Schlaganfällen.^{28, 29} Hypertonus ist ein Risikofaktor für das Auftreten von VHF (siehe 1.1.3), während thrombembolische Ereignisse wie Schlaganfälle zu den wichtigsten Folgen von VHF gehören.

Vor kurzem wurde eine Familie beschrieben, bei der eine Mutation im NPPA-Gen (c.456-457delAA) mit dem Auftreten von VHF assoziiert ist. Die Mutation trat bei allen betroffenen Familienmitgliedern in heterozygoter Form auf, nicht jedoch bei nicht betroffenen Mitgliedern. Sie führte bei den betroffenen Familienmitgliedern zusammen mit dem veränderten Allel eines verbreiteten Polymorphismus im Exon 3 des Gens (c.454T>C, p.X152Arg) zu einer Aufhebung des Stopp-Codons, wodurch ein um 12 AS verlängertes mutiertes ANP (mANP) entsteht. Dieses Protein konnte im Blut der die Mutation tragenden Familienmitglieder in einer 5-10fach höheren Konzentration als das Wildtyp-ANP nachgewiesen werden. Im Vergleich zum Wildtyp-ANP zeigte sich außerdem, dass das mANP zu einer Verkürzung der AP-Dauer und damit der Refraktärzeit führt, was die Entstehung von VHF begünstigt.¹⁷

Daraufhin untersuchten sowohl Ren et al. als auch Roberts et al. die Assoziation zwischen Vorhofflimmern und den NPPA-Varianten c.94G>A (p.Val32Met) und c.454T>C (p.X152Arg). Während Ren et al. in einer chinesischen Population eine Assoziation zwischen der Variante c.94G>A und dem Vorliegen von VHF bei "Lone AF"-Patienten fanden,³⁰ konnten Roberts et al. bei einer nordamerikanischen Population europäischer Abstammung für beide Varianten keine Assoziation zum VHF finden.³¹

1.4 Connexin40

1.4.1 Gap Junctions und kardiale Connexine

Die koordinierte Erregungsausbreitung am Herzen erfolgt durch elektrische Kopplung der Kardiomyozyten mittels Gap Junctions. Diese sind Transmembran-Kanäle, die das Zytosol benachbarter Zellen direkt miteinander verbinden. Im Herzen sind die Gap Junctions an den Enden der Zellen in den sogenannten Glanzstreifen organisiert.³² Verschiedene Untersuchungen lassen darauf schließen, dass Größe, Anzahl und räumliche Verteilung der Gap Junctions einen entscheidenden Einfluss auf die Leitungseigenschaften der verschiedenen Herzgewebe haben.³³

Jede Gap Junction besteht aus zwei Halbkanälen, den Connexonen, die von jeweils einer der verbundenen Zellen ausgebildet werden und die Membran dieser Zelle durchspannen. Jedes Connexon besteht wiederum aus 6 Connexin-Molekülen, die eine zentrale Pore ausbilden.³⁴ Diese Pore bildet eine direkte zytoplasmatische Verbindung zwischen beiden Zellen und ist für Ionen und Moleküle bis zu einer Größe von etwa 1 kDa durchlässig. So stellen Gap Junctions interzelluläre Verbindungen mit geringem Widerstand dar, durch die sich das kardiale AP von Zelle zu Zelle ausbreiten kann.³⁵

Im menschlichen Genom wurden bisher 21 Isoformen des Connexins (Cx) gefunden, die nach ihrer molekularen Masse benannt sind.³⁵ Im menschlichen Herzen werden vor allem Cx43, Cx45, Cx37 und Cx40 exprimiert. Cx43 wird in allen Herzkammern exprimiert. Cx45 findet sich in Zellen des Erregungsleitungssystems und in geringem Maße auch im Arbeitsmyokard. Cx37 wird in vielen Gefäßen in endothelialen Gap Junctions gebildet. Cx40 findet sich vorrangig in atrialen Myozyten und im Erregungsleitungssystem des Herzens, es wird jedoch nicht in den Ventrikeln exprimiert.³⁴

In den Vorhöfen sind oft Cx40 und Cx43 kolokalisiert. Dies ist durch den Aufbau der Connexone möglich. Ist ein Connexon aus nur einem Connexin-Typ aufgebaut, nennt man es homomerisch. Besteht es aus einer Kombination von verschiedenen Connexinen, so ist es heteromerisch aufgebaut. Entsprechend können auch die Gap Junctions aus 2 gleichartigen Connexonen (homotypische Gap Junction) oder aus zwei unterschiedlich aufgebauten Connexonen (heterotypische Gap Junction) bestehen. Dieser unterschiedliche Aufbau der Gap Junctions bedingt unterschiedliche Leitungseigenschaften. So schwanken die Leitungsgeschwindigkeiten der Kanäle zwischen 20pS bei homotypischen Cx45-Kanälen bis zu 200pS bei homotypischen Cx40-Kanälen.³⁶ Damit besitzen die Cx40-Kanäle die höchste

Einleitung

Leitfähigkeit verglichen mit Cx43- und Cx45-Gap Junctions.³⁷ Die Leitungseigenschaften hängen jedoch auch von Umgebungsfaktoren wie pH, extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration, extrazellulärer Fettsäurezusammensetzung und Phosphorylierungsstatus der Connexine ab.³⁶

1.4.2 GJA5-Gen und Proteinaufbau

Die verschiedenen Connexine werden durch eine Familie von eng verwandten Genen kodiert. Die Gen- und Proteinstruktur ist unter den verschiedenen Isoformen hochkonserviert.³⁶

Connexin40 wird durch das Gen mit der Bezeichnung Gap Junction Membrane Channel Protein Alpha 5 (GJA5) kodiert. Dieses liegt auf Chromosom 1q21.1 und besteht aus 2 Exons und 1 Intron, wobei nur Exon 2 kodierende Abschnitte enthält.

Das translatierte Cx40-Protein besteht beim Menschen aus 358 AS und hat ein Molekulargewicht von ca. 40kDa.³⁸ Wie alle Connexine besteht es aus vier Transmembrandomänen (M1-M4), zwei extrazellulären Schleifen (E1-E2), einer intrazellulären Schleife (CL) sowie den intrazellulären N- und C-Termini (Abb. 1.3). Die Transmembrandomänen M1, M2 und M4 bestehen vorrangig aus hydrophoben Aminosäuren. M3 weist einen amphiphilen Charakter auf, weshalb vermutet wird, dass es den inneren Anteil der von den Gap Junctions gebildeten Pore bildet. Die extrazellulären Domänen enthalten drei Cysteine, welche vermutlich der Verbindung zwischen den beiden Connexonen dient. Es wird eine β -Faltblattstruktur zwischen den beiden Connexonen ausgebildet. Die beiden extrazellulären Schleifen, das Aminoende sowie die 4 membrandurchspannenden Domänen sind bei den verschiedenen Cx-Isoformen stark konserviert,³⁸ die zytoplasmatische Schleife und der C-Terminus unterscheiden sich hingegen in Länge und Aminosäuresequenz.³⁶ Diese

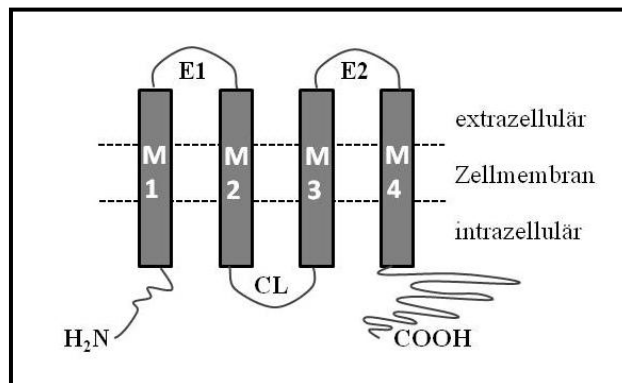


Abb. 1.3 Molekulare Struktur von Connexinen. Das Protein besteht aus 4 Transmembrandomänen (M1-M4), 2 extrazellulären Schleifen (E1, E2) und einer intrazellulären Schleife (CL). Das C- und N-terminale Ende liegen intrazellulär. (Adaptiert nach van der Velden 2002)³⁶

Einleitung

Proteinteile besitzen Motive für die Modulation durch Kinasen und Phosphatasen. Das menschliche Cx40 besitzt beispielsweise 7 vermutliche Bindungsstellen für die Proteinkinase C (PKC), zwei für die PKA und eine für die PKG. Es wurde nachgewiesen, dass Cx40 in der phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Form in der Zelle vorliegt und dass die Aktivierung von PKC und PKA den Anteil des phosphorylierten Cx40 erhöht. Die genaue funktionelle Relevanz ist bisher allerdings ungeklärt.^{35, 38}

Nach der Translation werden die Connexine in die Membran des Endoplasmatischen Retikulums eingebaut, woraufhin sie zum Golgi-Apparat transportiert werden, um dort zu Connexonen verbunden zu werden. Die fertigen Connexone werden in die Zellmembran inseriert, wo sie in Bereichen eng gegenüberliegender Zellmembranen an den Hemikanal der anderen Zelle andocken und funktionelle Kanäle ausbilden.³⁸

1.4.3 Connexin40 und Vorhofflimmern

In den Herzvorhöfen bestehen die Gap Junctions vorrangig aus den Connexinen 40 und 43. In Cx43-insuffizienten Mäusen zeigte sich jedoch, dass ein verringerter Cx43-Gehalt bei normalen Cx40-Leveln nicht zu einer signifikanten Verlängerung der P-Welle und somit auch nicht zu einer Verlängerung der Leitungsgeschwindigkeit führt.^{39, 40} Deshalb geht man davon aus, dass vorrangig Cx40 für die normale Erregungsausbreitung in den Vorhöfen verantwortlich ist.³⁴ Des Weiteren ist Cx40 im Zusammenhang mit VHF von besonderer Bedeutung, da es nur in atrialen Gap Junctions, nicht jedoch in ventrikulären, vorhanden ist. Außerdem zeigen Gap Junctions, die allein aus Cx40-Untereinheiten aufgebaut sind, die höchste Leitfähigkeit unter den kardialen Gap Junctions. Diese hohe Leitfähigkeit und die auf das atriale Gewebe beschränkte Expression von Cx40 lassen eine entscheidende Rolle von Cx40 für die atriale Erregungsweiterleitung und somit auch für die Entstehung von VHF vermuten.³⁷

Entsprechend konnten in verschiedenen Modellen mit Cx40-Knockout-Mäusen verlängerte EKG-Parameter (P-Wellen-Zeit, QRS-Zeit, PQ-Intervall) als Korrelat einer Reizleitungsstörung nachgewiesen werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass Cx40 vorrangig in den Vorhöfen und im Reizleitungssystem von His-Bündel, Tawara-Schenkeln und Purkinje-Fasern exprimiert wird. Die Mäuse zeigten aufgrund der Cx40-Defizienz verminderte atriale Leitungsgeschwindigkeiten, AV-Blockbilder, Rechtsschenkelblöcke und reduzierte Leitfähigkeiten des linken Tawara-Schenkels.^{38, 40-45} Außerdem ließ sich eine erhöhte atriale Vulnerabilität feststellen: zum einen traten gehäuft spontane atriale

Einleitung

Tachyarrhythmien auf, zum anderen war VHF durch Stimulation leichter induzierbar.^{38, 41, 43} Zusätzlich zeigten sich strukturelle Veränderungen und eine Cx40-Umverteilung in den Vorhofzellen bei VHF-Tiermodellen.^{34, 35} So konnte bei strukturellen Analysen bei Ziegen eine Umverteilung von Cx40 bei Vorhofflimmern beobachtet werden. Die atrialen Kardiomyozyten zeigten nach 2 Wochen bestehendem Vorhofflimmern eine inhomogene Verteilung des Cx40, während bei Sinusrhythmus das Cx40 homogen in den Zellen verteilt war.^{46, 47}

Solche strukturellen Veränderungen bestätigten sich auch in mehreren Untersuchungen von atrialen Gewebeproben beim Menschen. Normalerweise befinden sich die kardialen Gap Junctions und damit auch die Connexine in den Glanzstreifen an den Enden der Zellen. Bei Vorhofflimmern sind diese aber auch an den lateralen Seiten der Zellen nachweisbar.^{33, 39, 48-50} Dies führt zu einer abnormen elektrischen Verbindung der Kardiomyozyten und als Zeichen der gestörten Reizweiterleitung zu einer Abnahme der atrialen Leitungsgeschwindigkeit.⁵¹ Der Proteingehalt der Zellen ist hingegen widersprüchlich beschrieben: während einige Autoren erhöhte oder nicht veränderte Cx40-Level beschreiben,^{32, 50, 52} findet sich in den meisten Untersuchungen ein verminderter Cx40-Proteingehalt.^{39, 48, 49, 51, 53} Nao et al. fanden des Weiteren einen erhöhten Anteil an phosphoryliertem Cx40.⁴⁸ Die Phosphorylierung von Connexinen durch Kinasen und Phosphatasen scheint einen regulatorischen Einfluss zu haben. Die genaue funktionelle Relevanz ist derzeit allerdings ungeklärt.^{35, 38}

Ferner zeigten einige Untersuchungen bei Patienten mit Vorhofflimmern eine signifikant größere Streuung der Refraktärzeit.^{54, 51} Dadurch ist ein Reentry der Reizleitungswelle, wie er als Mechanismus zur Entstehung von VHF beschrieben ist (vergleiche 1.1.2), erleichtert. Diese Ergebnisse könnten aufgrund der zuvor beschriebenen Abnahme des Cx40- und damit der veränderten Anzahl, Größe und Verteilung der Gap Junctions sowie der verringerten Leitungsgeschwindigkeit vorliegen.^{51, 55}

Aufgrund der genannten Relevanz des Connexin40 für die atriale Reizweiterleitung und den entsprechenden Hinweisen, an der Pathogenese von VHF beteiligt sein zu können, wurde das GJA5-Gen zunehmend als Kandidatengen für genetische Untersuchungen bei VHF-Patienten gewählt. So fanden Gollob et al. 4 zuvor nicht bekannte heterozygote Missense-Varianten im GJA5-Gen bei 4 von 15 untersuchten Patienten mit idiopathischem Vorhofflimmern.⁵⁵ Drei dieser Varianten fanden sich nur in den Kardiomyozyten der Patienten, jedoch nicht in den Lymphozyten. Dies wurde als Hinweis auf eine somatische Mutation gewertet. Eine Variante konnte auch in den Lymphozyten des Patienten nachgewiesen werden, was auf eine

Einleitung

Keimbahnmutation hinweisen könnte. In der Expressionsanalyse sowie in der Immunfärbung von atrialen Myozyten der betroffenen Patienten zeigte sich bei einigen der Varianten im Vergleich zum Wildtyp keine oder eine verminderte Gap Junction-Bildung sowie eine diffuse Verteilung der Gap Junctions, auch an den lateralen Seiten der Zellen. In einer funktionellen Analyse führte dies zu einer verminderten elektrischen Verbindung zwischen den Myozyten.⁵⁵ Ob dies auf die gefundenen genetischen Varianten oder auf ein strukturelles Remodeling im Rahmen des bestehenden Vorhofflimmerns zu werten ist, bleibt offen.

Bereits 2003 hatten Groenewegen et al. in einer niederländischen Familie mit der seltenen Erkrankung des atrialen Stillstands verschiedene Kandidatengene untersucht.⁵⁶ Dabei fanden sie bei betroffenen Familienmitgliedern die Kombination einer Variante eines Natriumkanals (SCNA5-Gen) sowie eines Connexin40-Promotorpolymorphismus. Das Connexin40 c.-44A-Allel war dabei in der funktionellen Analyse mit einer um 50% geminderten Promotoraktivität verbunden. Da Connexine nur eine geringe Halbwertszeit von 2 bis 4 Stunden besitzen, könnte durch den Polymorphismus somit auch in vivo der Connexin40-Gehalt der Zelle vermindert werden. Der Effekt auf die Promotoraktivität in vivo ist jedoch bisher unbekannt. Die Parameter der kardialen Leitungsgeschwindigkeit (PQ-Zeit, QRS-Dauer, QT-Zeit) waren bei den Trägern der Variante in dieser Untersuchung nicht signifikant verändert.⁵⁶ 2004 untersuchten Firouzi et al. den Cx40-Promotorpolymorphismus bei 30 niederländische Patienten mit supraventrikulären Tachykardien ohne strukturelle Herzerkrankung, von denen 14 Patienten bekanntes VHF und 16 Patienten keine VHF-Anamnese hatten.⁵⁷ Während einer Ablationsbehandlung wurde VHF induziert und die Refraktärzeit gemessen. Für das c.-44A-Allel ergab sich eine signifikant erhöhte Streuung der Refraktärzeit als elektrophysiologisches Korrelat für eine erhöhte atriale Vulnerabilität und damit verbundenem erhöhten Risiko für das Auftreten von Vorhofflimmern. Die erhöhte Streuung war in der Untersuchung mit einer erleichterten Induzierbarkeit von VHF verbunden.^{57, 58} Vor kurzem konnten außerdem Yang et al. 4 neue Missense-Mutationen im GJA5-Gen bei chinesischen Patienten mit familiärem VHF nachweisen. In den entsprechenden Familien konnten die Varianten bei allen von VHF betroffenen Familienmitgliedern nachgewiesen werden, nicht jedoch bei nicht betroffenen Familienmitgliedern und bei 200 unverwandten Kontrollpatienten. Alle Varianten wurden im Bereich der Transmembrandomänen des Cx40-Proteins gefunden, welche einen entscheidenden Einfluss auf die Leitfähigkeit der Connexone besitzt.^{59, 60} Eine Variante (c.145C>T, p.Q49X) resultiert in einem Stopp-Codon bei Aminosäure 49. Dadurch werden

Einleitung

drei Transmembrandomänen, drei Schleifen sowie der C-Terminus, der Regulationsstellen für Kinasen und Phosphatasen besitzt,³⁵ nicht exprimiert. Dies könnte zu einem Funktionsverlust des Proteins führen.⁶⁰

2. Fragestellung

Vorhofflimmern ist die häufigste Herzrhythmusstörung des Menschen und tritt vorwiegend in westlichen Ländern auf. Neben bekannten Risikofaktoren scheinen auch genetische Einflüsse eine Rolle für das Auftreten von Vorhofflimmern zu spielen.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von genetischen Varianten auf die Entstehung von Vorhofflimmern zu untersuchen. Dafür wurde die Arbeit zweigeteilt. Zum einen sollten bestimmte Polymorphismen in ausgewählten Kandidatengen untersucht werden. Zum anderen sollte ein Kandidatengene auf noch nicht bekannte Varianten, welche im Zusammenhang mit VHF stehen könnten, untersucht werden.

Für den ersten Teil der Arbeit wurde der Ansatz einer Assoziationsstudie gewählt, bei der die Verteilung der Allele bekannter Polymorphismen in einem Kollektiv von Patienten mit VHF mit einem Kollektiv von Patienten ohne VHF verglichen wird. Dabei sollten Unterschiede in den Allelhäufigkeiten nicht nur zwischen den VHF-Patienten und dem Kontrollkollektiv untersucht werden, sondern auch innerhalb der Gruppe der VHF-Patienten in Abhängigkeit von Merkmalen wie der Art des VHF (paroxysmal, persistierend oder permanent) oder dem Vorliegen einer strukturellen Herzerkrankung.

Als Kandidatengene wurden die Gene für das Atriale Natriuretische Peptid, NPPA, und für das Connexin 40, GJA5, ausgewählt.

Das NPPA-Gen wurde in seinen gesamten kodierenden Abschnitten untersucht, um sowohl bereits bekannte als auch unbekannte Sequenzvarianten im Zusammenhang mit VHF zu untersuchen. Die in diesem Gen bekannten Polymorphismen c.94G>A (p.Val32Met) und c.454T>C (p.X152Arg) wurden dabei für die Assoziationsstudie ausgewählt.

Für das GJA5-Gen wurde ein bekannter Polymorphismus (c.-44G>A) in der Promotorregion des Gens ausgewählt, dessen Allele die Expression des Gens nachweislich beeinflussen.

3. Methoden

3.1 Studiendesign

Die Studie wurde zweigeteilt. Der erste Teil der Arbeit wurde als Assoziationsstudie konzipiert. Bei dieser Studienart werden Patienten, bei denen die zu untersuchende Erkrankung diagnostiziert ist, die sogenannten Fälle, auf das gewünschte Merkmal untersucht. Die Verteilung des Merkmals in dieser Gruppe wird erfasst und mit der Merkmalsverteilung in einer nicht erkrankten Vergleichsgruppe, der sogenannten Kontrollgruppe, verglichen. In der vorliegenden Arbeit wurden entsprechend die Fallgruppe von Patienten mit diagnostiziertem Vorhofflimmern und die Kontrollgruppe von Patienten ohne nachweisbares Vorhofflimmern gebildet. In beiden Gruppen wurde die Verteilung von Single Nucleotide Polymorphismen (SNPs) in den oben genannten Kandidatengen untersucht und miteinander verglichen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein Kandidatengen vollständig sequenziert und auf noch nicht bekannte Varianten in der Sequenz untersucht. Dabei wurde das Vorliegen von in der VHF-Gruppe gefundenen neuen Varianten in der Kontrollgruppe überprüft, um gegebenenfalls einen Zusammenhang mit dem Vorliegen von VHF herstellen zu können.

3.2 Patientenrekrutierung

Die Rekrutierung der Vorhofflimmer-Patienten erfolgte aus dem Patientengut der kardiologischen Stationen der Charité – Campus Virchow Klinikum im Zeitraum von August 2007 bis August 2008. Dabei wurde den Patienten etwa 40ml Vollblut abgenommen, welches mit EDTA zur Gerinnungshemmung gemischt wurde. Die Patienten wurden ausführlich über das Projekt aufgeklärt und gaben ihre Zustimmung. Anschließend wurden sie zu ihrer kardiologischen Krankheitsgeschichte befragt. Mithilfe eines Fragebogens und der vorliegenden Patientenakte wurden Merkmale wie bestehende Herzklappenerkrankungen, Koronare Herzkrankheit, Myokardinfarkte, Herzinsuffizienz, Schrittmachertherapie, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, die kardiologische Familienanamnese, die Art des bei den Fallpatienten vorliegenden Vorhofflimmerns (paroxysmal, persistierend, permanent), der Zeitpunkt der Erstdiagnose und eventuell vorgenommene elektrische Kardioversionen bzw. ablativ Eingriffe erfasst.

Methoden

Die Kontrollgruppe wird von Patienten gebildet, die im Rahmen einer genetischen Kardiomyopathie-Studie an der Franz-Volhard-Klinik in Berlin-Buch als Kontrollen rekrutiert wurden.

Es lag ein positives Votum der Ethikkommission der Charité - Universitätsmedizin Berlin vor.

3.2.1 Ein- und Ausschlusskriterien

Um in die Studie aufgenommen werden zu können, musste bei den Fallpatienten in mindestens einem vorliegendem Elektrokardiogramm (EKG) Vorhofflimmern verzeichnet worden sein oder aufgrund eines anamnestisch bekannten Vorhofflimmerns eine orale Antikoagulation bestehen.

Vorhofflimmern (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-Campus Virchow Klinikum ein transthorakales Echokardiogramm erhalten haben, um Parameter der Vorhof-, Kammer- und Klappenfunktionen erhalten zu können.

Die Krankengeschichte der Patienten der Kontrollgruppe wurde auf die Diagnose Vorhofflimmern bzw. auf Hinweise für das Vorliegen von VHF (Palpitationen, ungeklärte synkopale Ereignisse) durchsucht. Patienten, bei denen dies der Fall war oder bei denen Vorhofflattern vorlag, wurden aus der Kontrollgruppe ausgeschlossen. Um das Auftreten von VHF als Erkrankung mit erhöhter Prävalenz im Alter in späteren Lebensjahren der Kontrollpatienten weitestgehend auszuschließen, mussten diese beim letzten Aufenthalt in der Franz-Volhard-Klinik mindestens 60 Jahre alt sein. Des Weiteren musste auch bei den Kontrollpatienten ein transthorakales Echokardiogramm vorliegen.

3.2.2 Einteilung der Patienten

Die Patienten der VHF- und der Kontrollgruppe wurden entsprechend ihrer klinischen Diagnosen und ihres Echokardiographie-Befundes unter Berücksichtigung der wichtigsten Risikofaktoren (Herzhypertrophie, Klappenvitien, Koronare Herzkrankheit, Herzinsuffizienz) für VHF in zwei Gruppen unterteilt. Dabei galten Patienten mit einer echokardiographisch gemessenen Septumdicke von mehr als 13 mm, mit einem oder mehreren Herzklappenvitien II° oder höher, einer bestehenden KHK oder einer linksventrikulären Ejektionsfraktion (EF)

Methoden

unter 55% als strukturell herzkrank. Wenn keines dieser Kriterien vorlag, galten die Patienten als strukturell herzgesund.

Die VHF-Patienten wurden außerdem entsprechend der Art des bei ihnen vorliegenden Vorhofflimmerns (paroxysmal, persistierend bzw. permanent) eingeteilt.

3.3 DNA-Extraktion

Die Extraktion der DNA erfolgte vollautomatisch mit dem Gerät Autopure LS (Gentra Systems) aus dem bei der Rekrutierung der Patienten abgenommenen Vollblut. Es wurde entsprechend des Herstellerprotokolls vorgegangen. Die DNA wurde vom Gerät in einer Lösung mit hochreinem Wasser ausgegeben. Die Überprüfung der DNA-Qualität erfolgte durch eine Gelelektrophorese (1,5% Agarose), die DNA-Konzentration wurde mit dem NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) ermittelt. Dazu wurde 1 µl der Probe auf die Messoberfläche des Gerätes gegeben. Dieses bestimmte daraufhin spektrophotometrisch die Konzentration und die Reinheit der DNA. Die extrahierte DNA wurde anschließend auf eine Konzentration von 25 ng/µl verdünnt.

3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase-Chain-Reaction; PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA-Abschnitten (Amplifikation). Der zu amplifizierende Abschnitt wird mit Hilfe von Primern (ca. 20 bp umfassende Oligonukleotide) eingegrenzt. Diese binden an die DNA-Vorlage und bilden den Startpunkt für die DNA-Polymerase (Taq-Polymerase). Dieses Enzym ist in der Lage, aus einzelnen Nukleotiden, die sich entsprechend der komplementären Basenpaarungen an die Vorlage anlagern, einen neuen DNA-Strang zu synthetisieren. Diese Reaktion läuft mehrmals hintereinander ab, wobei im vorherigen Zyklus neu entstandene DNA-Abschnitte in den darauffolgenden Zyklen wieder als neue Vorlage dienen („Kettenreaktion“). Dadurch ergibt sich eine exponentielle Zunahme der Konzentration des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes.

3.4.1 Durchführung

Für optimale Reaktionsbedingungen werden dem Ansatz neben den oben genannten DNA-Vorlagen, Primern (Vorwärts- und Rückwärts-Primer; BioTeZ Berlin-Buch GmbH) und der thermostabilen Taq-Polymerase außerdem die für die Synthetisierung von DNA notwendigen Desoxyribonukleosidtriphosphate (4 verschiedene dNTPs, entsprechend den 4 Basen der

Methoden

DNA: dATP, dTTP, dGTP, dCTP; Biozym Scientific GmbH, für die Funktion der Polymerase essentielle Mg^{2+} -Ionen und eine den optimalen pH-Wert herstellende Pufferlösung (NH₄-Puffer) hinzugefügt (Abb.3.1). Für das MgCl₂, den NH₄-Puffer und die Taq-Polymerase wurde ein Kit der Firma Invitex verwendet.

H ₂ O	17,5 µl
10x NH ₄ -Puffer (pH=8,8)	2,5 µl
MgCl ₂ (50 mmol/l)	1,5 µl
Primer vorwärts (5 pmol/µl)	1,0 µl
Primer rückwärts (5 pmol/µl)	1,0 µl
dNTPs (25 mmol/l)	0,3 µl
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl (entspricht 1 Unit)
DNA-Vorlage (25ng/µl)	<u>1,0 µl</u>
Gesamt	25 µl

Abb. 3.1 Zusammensetzung eines typischen PCR-Ansatzes

Der Ansatz wird anschließend nacheinander spezifischen Temperaturen ausgesetzt, welche unterschiedliche Reaktionen im Gemisch anregen. Zunächst erfolgt bei 94°C die Denaturierung der DNA-Doppelhelix, sodass die DNA im Reaktionsgemisch in Form von Einzelsträngen vorliegt. Danach lagern sich die Primer spezifisch an die DNA-Vorlage an, wodurch der zu amplifizierende Abschnitt der DNA festgelegt wird („Annealing“). Die dafür benötigte Temperatur ist für jedes Primer-Paar spezifisch und hängt von der Länge sowie der Sequenz der Primer ab. Anschließend synthetisiert die Taq-Polymerase bei 72°C, ausgehend vom freien 3'-OH-Ende der Primer, die zu den vorliegenden Einzelsträngen komplementären DNA-Stränge („Elongation“). Daraufhin wird die Temperatur zur erneuten Denaturierung der neu synthetisierten Doppelstränge auf 94°C erhöht (Abb. 3.2).

1. 94°C	5:00 min	
2. 94°C	0:30 min	← x 38 Zyklen
3. s. Abb. 3.3	0:30 min	
4. 72°C	1:30 min	
5. 72°C	5:00 min	
6. 4°C	dauerhaft	

Abb. 3.2 Programm einer typischen PCR

Methoden

Denaturierung, Annealing und Elongation zusammen bilden einen Zyklus. Um eine nachweisbare Menge des amplifizierten DNA-Abschnittes zu erhalten, besteht eine PCR aus etwa 35-40 Zyklen. Diese werden von automatisierten Thermocyclern durchlaufen.

3.4.2 Auswertung

Die amplifizierte DNA wurde anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Dazu wurden 2 bis 3 µl des PCR-Produktes mit Auftragspuffer vermischt, das Gel damit beladen und die zu erwartende mit der entstandenen Fragmentgröße verglichen.

3.4.3 Optimierung der Annealing-Temperatur

Die Sequenzen der verwendeten Primer für die drei Exons des NPPA-Gens wurden aus Publikationen anderer Arbeitsgruppen übernommen.¹⁷ Die Primer für die untersuchten Abschnitte des Connexin40-Gens wurden mit dem im Internet verfügbaren Programm Primer 3 erstellt (Abb. 3.3).

Gen / Exon	Primer vorwärts	Primer rückwärts	Fragment
NPPA Exon 1	5' GGAGACAGGGACAGACGTAG 3'	5' CCCAGACTGCACCCGCTTTC 3'	253 bp
NPPA Exon 2	5' GCCAGGAAAGCGGGTGCAG 3'	5' GGGCACTCTGGGTGTTGGG 3'	568 bp
NPPA Exon 3	5' GTGGGAAGCAGGTGGTCAGTA 3'	5' AGCTTAGATGGGATGATCACA 3'	250 bp
GJA5	5' AGAGGGGAGGGAGGGATT 3'	5' CCTCCTCTGGCTACTTCATATC 3'	278 bp

Abb. 3.3 Übersicht über die verwendeten Primer

Jedes Primerpaar benötigt eine spezifische Temperatur, damit die Anlagerung der Primer an die DNA-Vorlage (Annealing) optimal abläuft. Ist diese Temperatur zu gering gewählt, entstehen durch unspezifische Bindung der Primer vermehrt Nebenbanden. Ist sie zu hoch, so binden die Primer nicht optimal und das gewünschte Fragment wird in nur unzureichender Menge amplifiziert.

Um die optimale Annealing-Temperatur zu bestimmen, wurde zunächst mit jedem Primerpaar ein Temperatur-Gradient durchgeführt. Es wurden 12 Reaktionsansätze mit derselben Test-DNA hergestellt (entsprechend Abb. 3.1). Dann wurde in einem Thermocycler mit Gradientenfunktion eine PCR durchgeführt, bei der jeder Ansatz einer anderen Annealing-Temperatur ausgesetzt wurde. Nach anschließender Gelelektrophorese wurde eine Temperatur ausgewählt, bei der die erwartete spezifische Bande ohne Nebenbanden zu sehen war. Mit

Methoden

dieser Temperatur wurde zur Bestätigung eine erneute PCR mit verschiedenen Test-DNAs und mit 5 verschiedenen Patienten-DNAs durchgeführt.

Des Weiteren wurde für jedes Primer-Paar die Anzahl der Zyklen und evtl. auch die Konzentration der Primer im Reaktionsansatz angepasst (Abb. 3.4).

Gen / Exon	Annealing-Temperatur	Zyklen	Primervolumen
NPPA Exon1	64°C	38	1,0 µl
NPPA Exon 2	68°C	38	1,0 µl
NPPA Exon 3	58°C	38	1,0 µl
GJA5	59°C	35	1,4 µl

Abb. 3.4 Spezifische Annealing-Temperatur, Zyklenanzahl und im Reaktionsansatz verwendetes Volumen der Primerlösungen (5 pmol/µl) für die verwendeten Primerpaare.

3.5 Agarose-Gelelektrophorese

Mit der Agarose-Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und sichtbar gemacht. Die Methode wird zum Nachweis von DNA-Abschnitten einer bestimmten Länge (z.B. nach einer PCR) bzw. unterschiedlicher Längen (z.B. nach einem Restriktionsverdau) angewendet.

3.5.1 Vorbereitung

Die für die Gelelektrophorese verwendeten Gele bestehen aus 3% Agarose (Biozym Scientific GmbH) in 1x TBE-Puffer (Abb. 3.6). Zur Herstellung der Gele wurden zunächst die entsprechenden Mengen Agarose und 1x TBE-Puffer abgemessen und in einem Becherglas vermengt. Die entstandene Suspension wurde bis zum vollständigen Lösen der Agarose erhitzt, wobei die verdunstete Flüssigkeit durch destilliertes Wasser ersetzt wurde. Nach Zugabe von Ethidiumbromid (Carl Roth GmbH & Co. KG) wurde die Lösung in die vorbereiteten Gelkammern gegossen, in denen die Gele je nach Größe in etwa 30 bis 60

Tris	54,0 g
Borsäure	27,5 g
EDTA	20,0 ml
H ₂ O	ad 1000,0 ml

Abb. 3.5 Ansatz für 1l 5x TBE-Puffer (pH-Wert 8,0). Der verwendete 1x TBE-Puffer wurde aus der 5x TBE-Stammlösung durch 5:1-Verdünnung mit deionisiertem Wasser hergestellt.

Methoden

Minuten aushärteten. Durch Einsatz von Kämmen in die noch flüssigen Gele entstanden nach Aushärtung der Gele Aussparungen, die als Auftragstaschen dienten.

	kleines Gel (bis zu 14 Proben)	großes Gel (bis zu 96 Proben)
Agarose	0,9 g	2,7 g
1x TBE-Puffer	30 ml	90 ml
Ethidiumbromid	1 µl	3 µl

Abb. 3.6 Zusammensetzung eines 3%igen Agarosegels

3.5.2 Durchführung

Das ausgehärtete Gel wurde in der Gelkammer mit 1x TBE-Puffer übergossen. Anschließend wurden der Molekulargewichtsstandard (Fermentas GmbH) und die mit Auftragsmarker vermischten Proben (etwa 2-3 µl PCR-Produkt bzw. 10 µl Restriktionsverdau-Produkt) in die Geltaschen aufgetragen. Nun wurde eine Gleichspannung (ca. 80 Volt) an die Kammer angelegt, wodurch die negativ geladenen DNA-Fragmente im Gel zur Anode wanderten. Das Gel besteht aus einem Netz von Agarose-Polymeren, dessen Poren desto kleiner sind, je höher die Agarose konzentriert ist. Diese Poren bewirken, dass kleine DNA-Fragmente schneller zur Anode wandern als große, wodurch eine Auftrennung der Stränge nach ihrer Größe erfolgt. Die Elektrophorese wird beendet, wenn die Auftrennung der DNA-Fragmente ausreichend ist. Dies war bei einem kleinen Gel nach etwa 30 Minuten, bei einem großen Gel nach etwa 45 Minuten der Fall. Das Gel wurde nun unter einer UV-Lampe betrachtet. Dabei wird das Ethidiumbromid, das sich der DNA angelagert hat, angeregt und fluoresziert. Dadurch werden an Stellen hoher DNA-Konzentrationen Banden sichtbar. Diese Banden konnten mit Hilfe des mitgeführten Molekulargewichtsstandards einer bestimmten Fragment-Größe zugeordnet werden (Abb. 3.8).

Glycerol	3 ml
H ₂ O	7 ml
Bromphenolblau	25 mg
Xylencyanol	25 mg

Abb. 3.7 Ansatz für den bei der Gelelektrophorese verwendeten Auftragsmarker.

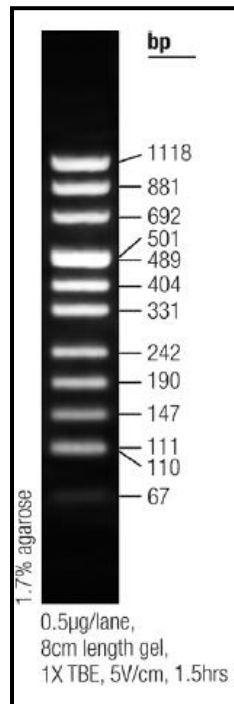


Abb. 3.8 Molekulargewichtsstandard pUC Mix Marker 8 (Fermentas GmbH)

3.6 Sequenzierung

Die Sequenzierung dient der Bestimmung der Nukleotidfolge eines DNA-Fragments. Sie wurde zur Bestimmung der bekannten Polymorphismen und zur Identifizierung neuer Varianten in den 3 Exons des NPPA-Gens sowie für die Bestimmung des GJA5-Promotorpolymorphismus verwendet.

3.6.1 Vorbereitung zur Sequenzierung

Die interessierenden DNA-Abschnitte wurden zunächst mittels Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert. Anschließend wurde das PCR-Produkt mit der Exonuklease I (New England BioLabs Inc.) und der Shrimp Alkaline Phosphatase (Promega GmbH) enzymatisch aufgereinigt. Dies ist notwendig, um überschüssige Primer und dNTPs abzubauen, die das spätere Ergebnis beeinträchtigen können (Abb. 3.9, Abb. 3.10).

H ₂ O	2,59 µl
Shrimp Alkaline Phosphatase (1 U/µl)	0,32 µl
Exonuklease I (20 U/µl)	0,09 µl
PCR-Produkt	<u>7</u> µl
Gesamt	10 µl

Abb. 3.9 Reaktionsansatz für die enzymatische Aufreinigung in Vorbereitung zur Sequenzierung

Methoden

1. 37°C	30 min
2. 72°C	15 min
3. 4°C	dauerhaft

Abb. 3.10 Thermocycler-Programm für die enzymatische Aufreinigung in Vorbereitung zur Sequenzierung

Die aufgereinigten Proben wurden dann der „Cycle Sequencing“-Reaktion unterzogen (Abb. 3.11, Abb. 3.12). Sie erfolgte mit dem BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Inc.) und beruht auf der Didesoxymethode zur Sequenzierung nach Sanger. Diese funktioniert ähnlich wie eine PCR. Es sind neben Desoxyribonukleotiden (dNTPs) allerdings auch Didesoxyribonukleotide (ddNTPs) in der Lösung enthalten. Die ddNTPs besitzen an ihrem 3'-Ende keine freie OH-Gruppe und bewirken somit, wenn sie in den neu synthetisierten DNA-Strang eingebaut werden, einen Abbruch der Kette. Folglich entstehen nach einigen Zyklen DNA-Fragmente unterschiedlicher Längen. Es wird nur ein Primer (vorwärts oder rückwärts) verwendet, sodass die DNA nur in eine Richtung amplifiziert werden kann.

H ₂ O	4,75 µl
5x Sequenzierungs-Puffer	1,75 µl
BigDye Terminator v1.1	0,5 µl
Primer (vorwärts oder rückwärts; 5pmol/µl)	1 µl
Aufgereinigtes PCR-Produkt	<u>2</u> µl
Gesamt	10 µl

Abb. 3.11 Reaktionsansatz für das „Cycle Sequencing“ in Vorbereitung zur Sequenzierung

1. 96°C	1:00 min	
2. 96°C	0:10 min	← x 25 Zyklen
3. 50°C	0:30 min	
4. 60°C	4:00 min	
5. 72°C	5:00 min	
6. 4°C	dauerhaft	

Abb. 3.12 Thermocycler-Programm für das „Cycle Sequencing“ in Vorbereitung zur Sequenzierung

Nach dem „Cycle Sequencing“ wurden die Produkte noch einmal durch Sephadex G-50 Superfine (GE Healthcare) gereinigt, um überschüssige Nukleotide herauszufiltern. Dazu

Methoden

wurde das Sephadex mit Hilfe einer Schablone in die Vertiefungen einer 96-Lochplatte gegeben und mit 300 µl hochreinem Wasser pro Vertiefung bedeckt. Darin quoll das Sephadex über Nacht bei 4°C zu einem Gel. Das Wasser wurde anschließend abzentrifugiert (5 Minuten bei 1000g). Nach einem Waschvorgang der Gele mit 150 µl hochreinem Wasser pro Vertiefung und erneuter Abzentrifugation desselben, wurden die „Cycle Sequencing“-Produkte vollständig auf die Gele (eine Probe pro Vertiefung der 96-Lochplatte) gegeben. Daraufhin erfolgte eine erneute Zentrifugation unter den oben genannten Bedingungen, wobei die nun gereinigten „Cycle Sequencing“-Produkte in einer neuen 96-Lochplatte gesammelt wurden. Nach Zugabe von 13 µl Formamid (Applied Biosystems Inc.) zu jeder Probe wurde die Platte bis zur Sequenzierung bei –20°C eingefroren.

3.6.2 Automatische Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte mit dem automatischen Sequenziergerät ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems Inc.). Dieses Gerät enthält mit Flüssigpolymer-Gel gefüllte Kapillaren, in denen die DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Durch einen Laserstrahl werden die Fluoreszenzfarbstoff-markierten ddNTPs angeregt. Die vier unterschiedlichen ddNTPs emittieren dabei Licht unterschiedlicher Wellenlängen. Dieses wird nacheinander für jedes DNA-Fragment des „Cycle Sequencing“-Produktes detektiert und anschließend als Chromatogramm in einer Datei ausgegeben.

3.6.3 Auswertung

Die vom Sequenziergerät erstellten Chromatogramme wurden mit der Software Sequencher 4.1 im Vergleich zu einer Referenz-Sequenz ausgewertet, welche aus den Datenbanken NCBI Gene (www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene) und Ensembl (www.ensembl.org) entnommen wurden. Wurde bei einem Patienten eine unbekannte Variante gefunden, so wurde die Sequenzierung des entsprechenden Genabschnittes vorwärts und rückwärts wiederholt.

3.7 Restriktionsanalyse

Mittels Restriktionsanalyse können bereits bekannte genomische Varianten nachgewiesen werden. Dabei werden die amplifizierten DNA-Fragmente zusammen mit einem Restriktionsenzym (bakterielle Restriktionsendonuklease) inkubiert, welches bei Vorhandensein einer spezifischen Basensequenz das Fragment zerschneidet. Liegt eine

Methoden

genomische Variante vor, entsteht eine solche Sequenz bzw. geht verloren. Dadurch entstehen unterschiedliche Schnittmuster in Abhängigkeit von der Basensequenz des untersuchten DNA-Fragments („Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus“, RLFP).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der NPPA-Stopp-Polymorphismus im Exon 3 (c.454T>C, p.X152Arg) für alle Kontroll-Patienten mittels Restriktionsanalyse bestimmt.

3.7.1 Vorbereitung

Zunächst wurde die Referenz-Sequenz des PCR-Fragmentes analysiert. Das Programm Sequencher 4.1 bietet die Möglichkeit, Restriktionsstellen verschiedener Enzyme miteinander zu vergleichen. Durch den Austausch der Base des bekannten Polymorphismus lässt sich erkennen, ob Schnittstellen neu auftreten oder wegfallen. So ließ sich ein geeignetes Enzym für die Untersuchung der gewünschten Variante auswählen.

3.7.2 Durchführung

Es wurde ein Reaktionsansatz aus PCR-Produkt und Restriktionsenzym hergestellt. Ein mit dem Enzym gelieferter Puffer (NEB3) und Bovines Serumalbumin (BSA) stellten die optimalen Reaktionsbedingungen für das Enzym her (Abb. 3.13). Der Ansatz wurde 8h bei 37°C inkubiert und danach bei 4°C gekühlt.

H ₂ O	5,9 µl	
10x NEB3-Puffer	1 µl	
ScaI (10000 U/ml)	0,1 µl	(entspricht 1 Unit)
PCR-Produkt	<u>3 µl</u>	
Gesamt	10 µl	

Abb. 3.13 Reaktionsansatz des Restriktionsverdau zum Nachweis des NPPA-Stopp-Polymorphismus mit ScaI

Das Enzym ScaI aus dem Bakterium *Streptomyces caespitosus* (New England BioLabs Inc.) eignet sich, um den NPPA-Stopp-Polymorphismus zu untersuchen. Es zerschneidet das DNA-Fragment bei Vorhandensein der spezifischen Sequenz 3'-TCATGA-5' (Abb. 3.14).



Abb. 3.14 Schnittmuster der Restriktionsendonuklease ScaI

Methoden

Erkennt das Enzym im DNA-Fragment das T-Allel (Wildtyp; Sequenz 3'-TCATGA-5'), so wird es in zwei Teile zerschnitten (116 bp, 134 bp). Ist hingegen das C-Allel vorhanden (Sequenz 3'-TCACGA-5'), so bleibt das Fragment ungeschnitten bestehen (250 bp).

3.7.3 Auswertung

Die Auswertung des Verdaus erfolgte mit Agarose-Gelelektrophorese. Dazu wurde das gesamte Volumen des Reaktionsansatzes (10 µl) mit Auftragsmarker gemischt und auf ein Gel geladen. Anschließend wurden die entstandenen Fragmentgrößen analysiert.

3.8 Benennung von Varianten

Bei der Nomenklatur bereits beschriebener und auch neu gefundener Varianten wurde sich an den Allgemeinen Empfehlungen der Human Gene Variant Society (www.hgvs.org) orientiert. Dabei werden die Varianten auf Ebene der kodierenden DNA (cDNA) mit „c.“, auf Proteinebene mit „p.“ gekennzeichnet. Auf cDNA-Ebene werden die Varianten in folgendem Format angegeben: c.78G>C. Dabei beschreibt die Zahl (78) die Position in der cDNA und die Buchstabenkombination das Nukleotid.

Das Nukleotid 1 ist das A des ATG-Startkodons für die Translation, die Nukleotide 5' dieses Startkodons werden mit -1, -2, usw., die Nukleotide 3' des Stoppkodons mit *1, *2, usw. bezeichnet. Nukleotide am Anfang eines Introns werden mit der Nummer des letzten Nukleotids im vorhergehenden Exon, einem Plus-Zeichen und der Position des Nukleotids im Intron beschrieben, z.B. c.77+1G, c.77+2T, usw. Nukleotide am Ende eines Introns werden mit der Nummer des ersten Nukleotids im folgenden Exon, einem Minus-Zeichen und der Position des Nukleotids stromaufwärts im Intron beschrieben, z.B. c.78-1G, c.78-2T, usw. Wenn mehrere Nukleotide hintereinander betroffen sind wird dies durch ein „_“ zwischen der ersten und letzten betroffenen Position in der cDNA beschrieben, z.B. c.76_78delACT.

Das Zeichen „>“ beschreibt einen Austausch der Nukleinbasen auf cDNA-Ebene, z.B. c.76A>T. Eine Deletion wird mit der Silbe „del“ gefolgt von den deletierten Nukleinbasen gekennzeichnet, z.B. c.76delA.

Auf Proteinebene werden Varianten im Format p.Trp26Cys angegeben. Die Zahl beschreibt die Position der Variante im Protein, wobei die erste Aminosäure des Translationsproduktes, Methionin, mit der Nummer 1 gekennzeichnet wird. Die betreffenden Aminosäuren (AS) werden im 3-Buchstaben-Code angegeben (siehe Abkürzungsverzeichnis). Die vor der Zahl stehende AS repräsentiert den Wildtyp, die nach der Zahl stehende AS die Variante.

3.9 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software SPSS 15.0. Die erfassten Daten und untersuchten Genotypen aller Patienten und Kontrollen wurden in Tabellen eingegeben. Häufigkeiten und Mediane wurden mit der Software berechnet und entsprechende Tabellen und Diagramme erstellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels Chi²-Testes überprüft. Für die Varianten c.94G>A (p.Val32Met) und c.454T>C (p.X152Arg) im NPPA-Gen und die Promotorvariante des GJA5-Gens wurde die Gültigkeit des Hardy-Weinberg-Gesetzes überprüft. Außerdem wurden je drei Modelle erstellt. Im ersten Modell wurde angenommen, dass die Variante rezessiv gegenüber dem Wildtyp-Allel wirkt. Im zweiten Modell wirkt die Variante dominant. Im dritten Modell wirkt die Variante additiv, das heißt zwei Allele der Variante haben den doppelten Effekt von einem Allel. Für alle drei Modelle wurde mittels logistischer Regression die Signifikanz und die Odds Ratio ermittelt. Bei allen Test galt ein p-Wert < 0,05 als statistisch signifikant.

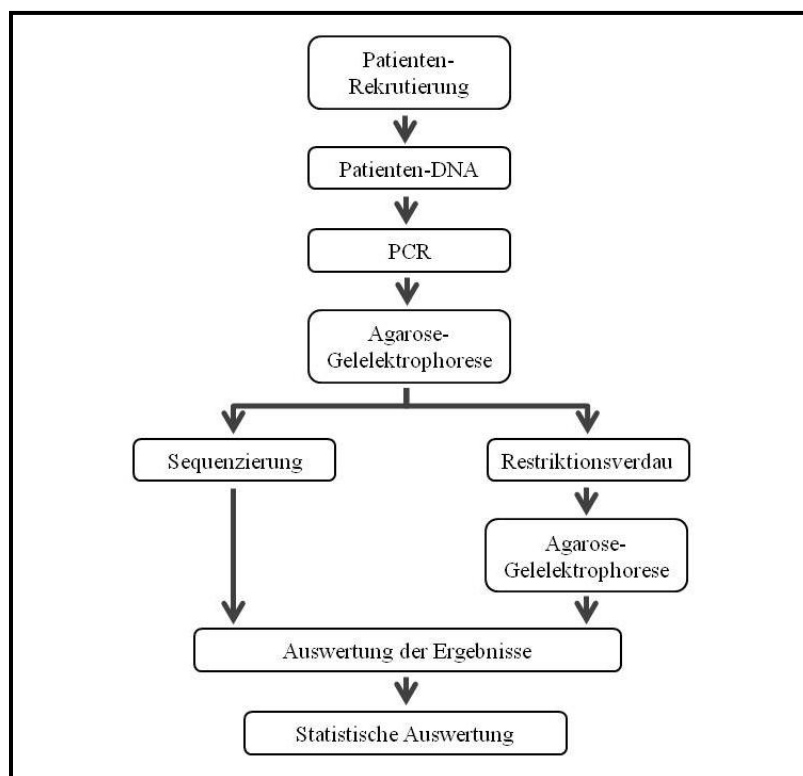


Abb. 3.15 schematische Darstellung der Abfolge der beschriebenen Arbeitsvorgänge

Methoden

3.10 Verwendetes Wasser

Für die PCR, die Sequenzierung und die Restriktionsanalyse wurde hochreines HPLC-Wasser verwendet. Die Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese wurden mit durch eine Membrapur-Wasseranlage deionisiertem Leitungswasser hergestellt.

3.11 Verwendete Chemikalien

Borsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG
Bromphenolblau	Pierce
EDTA	Carl Roth GmbH & Co. KG
Glycerol	Carl Roth GmbH & Co. KG
HPLC-Wasser	Carl Roth GmbH & Co. KG
Tris	Carl Roth GmbH & Co. KG
Xylencyanol	Pierce

3.12 Weitere verwendete Geräte

AF100 Eismaschine	Scotsman Ice Systems
BioDoc Analyze System	Biometra GmbH
DRI-Block DB 2A	Techne Inc.
Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus	Life Technologies
Membratechnik Reinstwasser Anlage	MembraPure GmbH
MicroCentrifuge	Carl Roth GmbH & Co. KG
PicoFuge	Stratagene
Pipetten	Eppendorf AG, BioHit Deutschland GmbH
0,5-10 µl	
2 – 20 µl	Eppendorf AG, BioHit Deutschland GmbH
10-100 µl	Eppendorf AG, BioHit Deutschland GmbH
20-200 µl	Eppendorf AG, BioHit Deutschland GmbH
100-1000 µl	Eppendorf AG, BioHit Deutschland GmbH
PTC-200 Peltier Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH
RCT Basic Magnetrührer	Kika Labortechnik
REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
Rotanta 460R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG
Standard Power Pack P25	Biometra GmbH

Methoden

T-Professional Thermocycler	Biometra GmbH
Waage 572-37	Kern & Sohn GmbH

3.13 Sonstige verwendete Materialien

MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate	Applied Biosystems Inc.
Multi Screen-HV Platten mit Durapore-Membran	Millipore
Parafilm Laboratory Film	Carl Roth GmbH & Co. KG
PCR Softstrips 0,2 ml	Biozym Scientific GmbH
PCR Softstrips Caps	Biozym Scientific GmbH
Pipettenspitzen	CoTech Vertriebs GmbH
Plate Septa 96-well	Applied Biosystems Inc.
Reaktionsgefäße 0,6 ml; 1,5 ml; 2,0 ml	Biozym Scientific GmbH
Rotiprotect Latex Einmalhandschuhe	Carl Roth GmbH & Co. KG
Rotiprotect Nitril-Einmalhandschuhe	Carl Roth GmbH & Co. KG

3.14 Software und URLs

3.14.1 Sequencher 4.1 DNA Sequence Assembly Software

Die Software Sequencher 4.1 für Mac der Firma Gene Codes Corporation wurde verwendet, um die bei der Sequenzierung entstandenen Chromatogramme mit einer Referenz-Sequenz zu vergleichen und auszuwerten. Des Weiteren bietet die Software die Möglichkeit Restriktionsstellen verschiedener Enzyme in Sequenzen zu analysieren, diese Funktion wurde bei der Auswahl der geeigneten Endonuklease für die Restriktionsanalyse genutzt.

3.14.2 SPSS 15.0

Die Software SPSS 15.0 der Firma SPSS Inc. diente der statistischen Auswertung der Ergebnisse. Dazu wurden die Daten aller Patienten und Kontrollen in eine Tabelle eingegeben und mit den entsprechenden Funktionen des Programms ausgewertet.

3.14.3 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. Diese dienten als Referenz-Sequenzen bei der Auswertung der Chromatogramme. Die untersuchten Gene sind hier unter folgenden Einträgen zu finden:

Methoden

NPPA GeneID 4878
GJA5 GeneID 2702.

3.14.4 Ensembl Genome Browser (www.ensembl.org)

In der Datenbank Ensembl findet sich eine Zusammenstellung aller Exons, Translationen und Varianten der einzelnen Gene. Diese wurden verwendet, um bereits bekannte Varianten in den Genen mit bei der Sequenzierung gefundenen Auffälligkeiten zu vergleichen. Die untersuchten Gene sind dabei unter folgenden Einträgen zu finden:

NPPA Gen: ENSG00000175206 Transkript: NPPA-001 ENST00000376480
GJA5 Gen: ENSG00000143140 Transkript: GJA5-201 ENST00000271348.

Die in dieser Arbeit als bekannt angesehenen Varianten im NPPA-Gen wurden dem Ensembl Release 64 im September 2011 entnommen.

3.14.5 Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu>)

Das Programm Primer 3 wurde für die Erstellung geeigneter Primer für die PCR des Connexin40-Gens genutzt. Dabei wurden zunächst die von NCBI bzw. Ensembl heruntergeladenen genomischen Sequenzen in das Programm eingegeben. Dann wurden die Abschnitte markiert, die untersucht werden sollten. Diese beinhalteten die entsprechenden SNPs. Das Programm erstellte daraufhin zu diesem DNA-Abschnitt passende Primer.

3.14.6 GENSCAN

Um zu bestimmen, ob eine nahe der Splicesite gelegene Variante das Splicing der mRNA beeinflusst, wurde die Software GENSCAN verwendet. Diese sagt nach Eingabe der Gensequenz die nach Splicing entstandenen Exonsequenzen und die Proteinsequenz voraus.

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs

Die Eigenschaften sowie Nebenerkrankungen der VHF-Gruppe zeigt Abbildung 4.1.

Geschlecht männlich/weiblich	113/71
medianes Alter bei Aufnahme in die Studie	64,6 +/- 10,7
medianer BMI	27,3 +/- 4,2
durchschnittliches Alter bei Erstdiagnose	59,12 +/- 11,6
Septumdicke > 13 mm	70/184
Klappenvitium > I°	47/184
EF < 55%	47/184
KHK	60/184
strukturelle Herzerkrankung	116/184
Hypertonus	123/184
Hyperlipidämie	79/184
Myokardinfarkt	34/184
Herzinsuffizienz	29/184
Diabetes mellitus	45/184
Thrombembolisches Ereignis	25/184
VHF-Art	
erste Episode	4/184
paroxysmal	93/184
persistierend	53/184
permanent	21/184
Elektrokardioversion	67/184
Ablation	86/184

Abb. 4.1 Eigenschaften der VHF-Gruppe (n=184)

4.2 Atriales Natriuretisches Peptid

Wie in Abbildung 4.2 dargestellt ist, gibt es in Exon 1 eine bekannte Variante (c.94G>A, p.Val32Met; rs5063). Im Exon 2 sind drei Varianten bekannt: c.209C>T, p.Ala70Val (rs13305987); c.229C>T, p.Leu77Phe (rs3170926); c.377G>A, p.Arg106Gln (rs1803268). Im Exon 3 sind ein Stopp-Polymorphismus (c.454T>C, p.X152Arg; rs5065) und eine familiäre Mutation (c.456-457delAA) beschrieben worden. Außerdem sind Polymorphismen in der 5'-UTR, 3'-UTR und in den Introns des Gens bekannt.

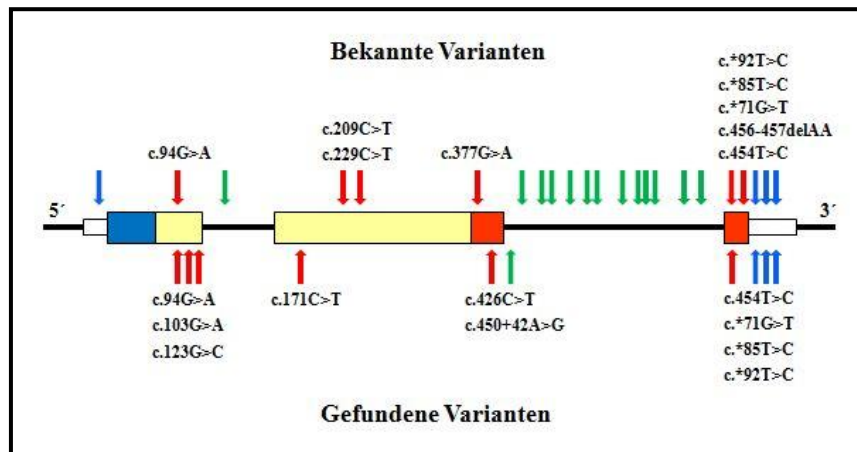


Abb. 4.2 Übersicht über Varianten im NPPA-Gen. In der schematischen Darstellung des NPPA-Gens sind im oberen Bereich bekannte Varianten, im unteren Bereich die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Varianten eingezeichnet. Die einzelnen Abschnitte des Gens sind farblich dargestellt: weiß – 5'-UTR und 3'-UTR; blau – Signalpeptid; Gelb – kodierende Abschnitte für die Peptide LANH, Vessel Dilator und Kaliuretisches Hormon; rot – kodierende Abschnitte für ANP. Exonische Varianten sind mit roten Pfeilen dargestellt, intronische mit grünen Pfeilen und Varianten in der 5'-UTR und 3'-UTR sind mit blauen Pfeilen dargestellt. Nicht untersuchte Varianten in der 5'-UTR und in den Introns sind nicht genauer bezeichnet.

4.2.1 Assoziation von bekannten Polymorphismen mit Vorhofflimmern

4.2.1.1 Polymorphismen c.94G>A und c.454T>C

Die bekannte Variante c.94G>A (p.Val32Met) wurde für alle VHF-Patienten und alle Kontrollpatienten mittels Sequenzierung (Abb. 4.3), die bekannte Variante c.454T>C (p.X152Arg) für alle VHF-Patienten mittels Sequenzierung (Abb. 4.4) und für die Kontrollpatienten durch Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus bestimmt (Abb. 4.5). Die Genotypenverteilungen beider Varianten befanden sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

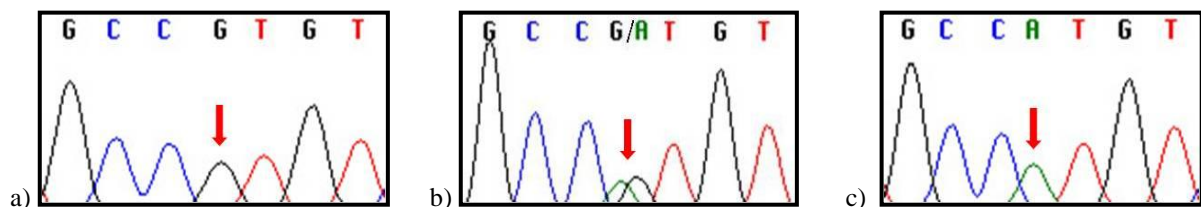


Abb. 4.3 Chromatogramm der Variante c.94G>A (p.Val32Met). a) Wildtyp GG; b) Heterozygotie GA; c) Homozygotie AA.

Ergebnisse

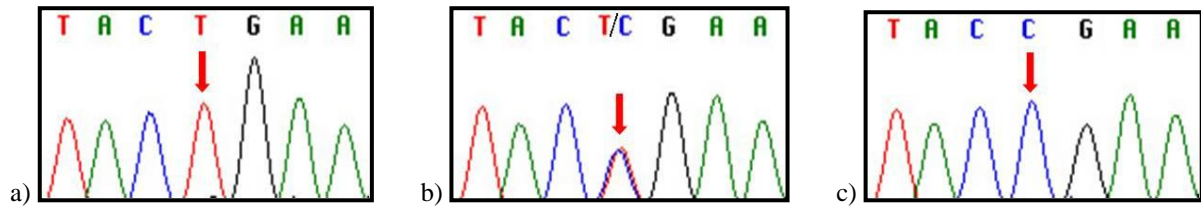


Abb. 4.4 Chromatogramm der Variante c.454T>C (p.X152Arg). a) Wildtyp TT; b) Heterozygotie TC; c) Homozygotie CC.

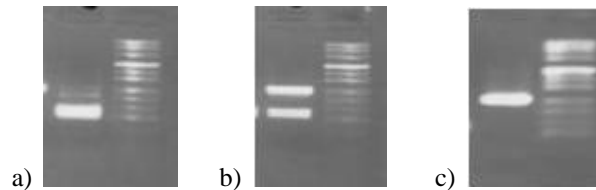


Abb. 4.5 Gelelektrophorese nach Verdau des PCR-Produktes für Exon 3 des NPPA-Gens mit dem Restriktionsenzym ScaI, welches bei Vorhandensein der Variante c.454T>C das Fragment nicht schneidet, bei Vorhandensein des Wildtyps jedoch schneidet. a) Wildtyp TT (Fragmentlängen 116bp/134bp); b) Heterozygotie TC (Fragmentlängen 250bp und 116bp/134bp); c) Homozygotie CC (Fragmentlängen 250bp).

In der Genotypenverteilung zeigten sich für beide Varianten zwischen der VHF- und der Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede (Abb. 4.6).

		VHF	Kontrollen	p-Wert
c.94G>A (p.Val32Met) rs5063	GG	166 (90,2%)	168 (92,3%)	0,766
	GA	17 (9,3%)	13 (7,2%)	
	AA	1 (0,5%)	1 (0,5%)	
c.454T>C (p.X152Arg) rs5065	TT	134 (72,9%)	136 (74,7%)	0,457
	TC	47 (25,5%)	40 (22,0%)	
	CC	3 (1,6%)	6 (3,3%)	

Abb. 4.6 Übersicht über die Verteilung bekannter Varianten in den Exonen des NPPA-Gens in der VHF- und Kontrollgruppe.

Auch die Untersuchung der Genotypenverteilungen der VHF-Gruppe und einer der NCBI SNP Datenbank entnommenen Population nord- und westeuropäischer Abstammung (HapMap-CEU, n=120) zeigten keine Unterschiede (Abb. 4.7).

In dominanten, rezessiven und additiven Modellen der Varianten (Abb. 4.8) zeigte sich ebenfalls kein Unterschied zwischen den Gruppen.

		VHF	HapMap-CEU	p-Wert
c.94G>A (p.Val32Met) rs5063	GG	166 (90,2%)	106 (88,3%)	0,577
	GA	17 (9,3%)	14 (11,7%)	
	AA	1 (0,5%)	0 (0%)	
c.454T>C (p.X152Arg) rs5065	TT	134 (72,9%)	86 (71,7%)	0,976
	TC	47 (25,5%)	32 (26,6%)	
	CC	3 (1,6%)	2 (1,7%)	

Abb. 4.7 Übersicht über die Verteilung der Varianten im NPPA-Gen c.94G>A und c.454T>C in der VHF-Gruppe und einer der NCBI SNP Datenbank entnommenen Population nord- und westeuropäischer Abstammung.

		OR (95% KI)	p-Wert
c.94G>A (p.Val32Met, rs5063)			
	Dominant	1,301 (0,627-2,702)	0,480
	Rezessiv	1,011 (0,063-16,288)	0,994
	Additiv	0,802 (0,411-1,568)	0,519
c.454T>C (p.X152Arg, rs5065)			
	Dominant	1,103 (0,692-1,758)	0,680
	Rezessiv	2,057 (0,507-8,352)	0,313
	Additiv	0,991 (0,660-1,488)	0,965

Abb. 4.8 Analyse der Interaktion zwischen VHF und NPPA-Genvarianten in dominanten, rezessiven und additiven Modellen. OR – Odds Ratio; 95% KI – 95%-Konfidenzintervall.

Der Vergleich der Genotypenverteilungen der Varianten c.94G>A (p.Val32Met) und c.454T>C (p.X152Arg) innerhalb der VHF-Gruppe unterteilt nach der Vorhofflimmerart (paroxysmal, persistierend, permanent) ergab für beide Varianten keine signifikanten Unterschiede (p= 0,167 bzw. p= 0,889; siehe Abb. 4.9 und Abb. 4.10). Im Vergleich der jeweiligen Subgruppe mit der Kontrollgruppe und der aus der NCBI SNP Datenbank entnommenen HapMap-CEU-Gruppe ergaben sich ebenfalls keine Unterschiede.

Auch im Vergleich zwischen strukturell herzgesunden ("Lone AF") und strukturell herzkranken VHF-Patienten (Abb. 4.11) und im Vergleich zwischen strukturell herzgesunden Patienten und der Kontrollgruppe (p=0.872 für die Variante c.94G>A bzw. p=0,977 für die Variante c.454T>C) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Ergebnisse

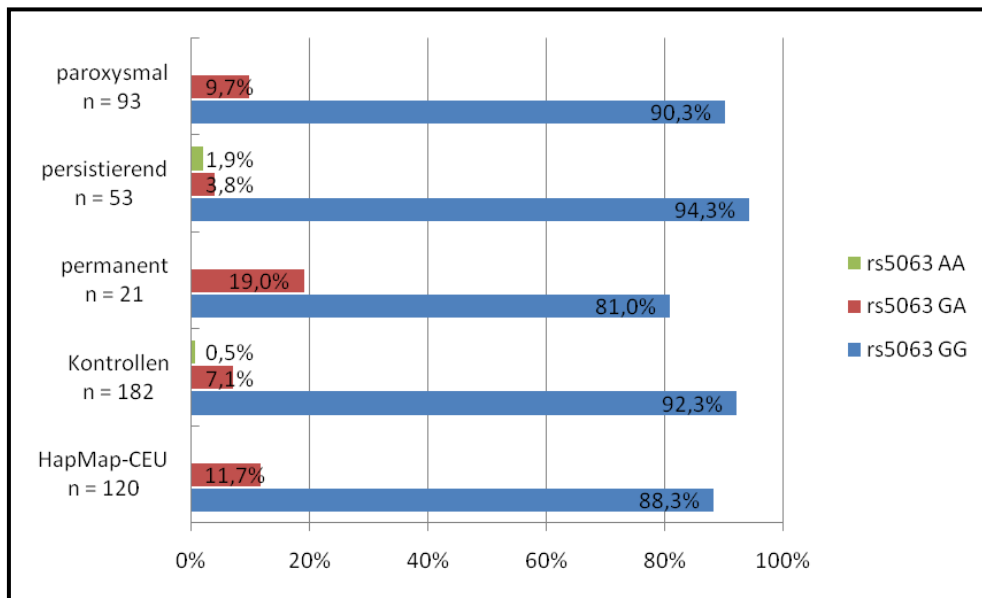


Abb. 4.9 Darstellung der prozentualen Verteilungen der Genotypen der Variante c.94G>A (p.Val32Met) in der VHF-Gruppe unterteilt nach der VHF-Art in paroxysmal, persistierend und permanent. Zum weiteren Vergleich sind außerdem die Verteilungen der Kontrollgruppe und einer der NCBI SNP Datenbank entnommenen Population nord- und westeuropäischer Abstammung dargestellt.

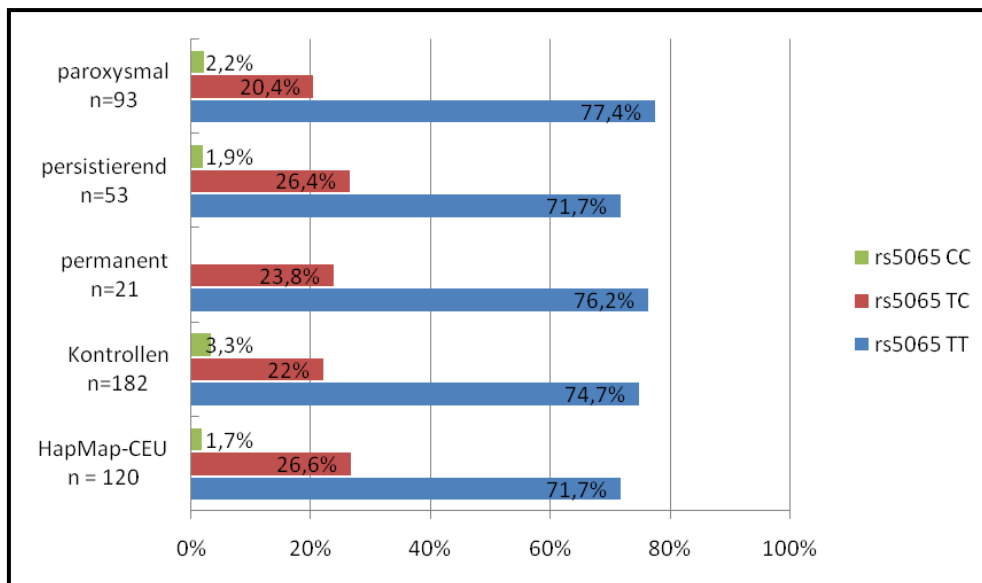


Abb. 4.10 Vergleich der prozentualen Genotypenverteilungen der Variante c.454T>C (p.X152Arg) in den Gruppen paroxysmaler, persistierender und permanenter VHF-Patienten, der Kontrollgruppe und einer der NCBI SNP Datenbank entnommenen Population nord- und westeuropäischer Abstammung.

		strukturell herzkrank	strukturell herzgesund	p-Wert
c.94G>A (p.Val32Met) rs5063	GG	103 (88,8%)	61 (92,4%)	0,614
	GA	12 (10,3%)	5 (7,6%)	
	AA	1 (0,9%)	0 (0%)	
c.454T>C (p.X152Arg) rs5065	TT	85 (73,3%)	49 (74,2%)	0,504
	TC	30 (25,9%)	15 (22,7%)	
	CC	1 (0,9%)	2 (3,0%)	

Abb. 4.11 Vergleich der Genotypenverteilungen für die Varianten c.94G>A und c.454T>C zwischen strukturell herzkranken und strukturell herzgesunden VHF-Patienten. Eine strukturelle Herzerkrankung wurde angenommen, wenn die Ejektionsfraktion des linken Ventrikels kleiner als 55%, die Septumdicke größer als 13mm, eine Koronare Herzerkrankung oder Klappenvitien zweiten Grades oder höher vorhanden waren.

4.2.1.2 Polymorphismen der 3'-UTR

Es wurden drei vorbeschriebene Varianten in der 3'-UTR bei den Patienten der VHF-Gruppe gefunden (Abb. 4.12). Die Variante c.*85T>C trat gekoppelt mit der Variante c.454T>C (p.X152Arg) auf, d.h. das Allel c.454T trat bei allen untersuchten Patienten in Verbindung

		VHF	AFD EUR Panel	p-Wert
c.*71G>T rs5066	GG	161 (87,5%)	46 (95,8%)	0,097
	GT	23 (12,5%)	2 (4,2%)	
	TT	0 (0%)	0 (0%)	
		VHF	HapMap-CEU	p-Wert
c.*85T>C rs5067	TT	134 (72,9%)	86 (72,9%)	0,976
	TC	47 (25,5%)	32 (26,6%)	
	CC	3 (1,6%)	2 (1,7%)	
c.*92T>C rs5068	TT	164 (89,1%)	104 (86,7%)	0,516
	TC	20 (10,9%)	16 (13,3%)	
	CC	0 (0%)	0 (0%)	

Abb. 4.12 Übersicht über die Verteilungen der Genotypen bekannter Polymorphismen in der 3'-UTR des NPPA-Gens im Vergleich zu den Kontrollgruppen AFD EUR Panel bzw. HapMap-CEU, welche der NCBI SNP Datenbank entnommen wurden.

Ergebnisse

mit dem Allel c.*85T auf, während das Allel c.454C immer in Verbindung mit dem Allel c.*85C vorlag. Im Vergleich der Genotypenverteilungen mit Populationen europäischer Abstammung (AFD EUR Panel bzw. HapMap-CEU) zeigten sich für alle drei Varianten keine signifikanten Unterschiede.

4.2.2 Weitere bekannte Varianten des NPPA-Gens

Die vorbeschriebenen Varianten c.209C>T (p.Ala70Val), c.229C>T (p.Leu77Phe), c.377G>A (p.Arg126Gln) sowie c.456-457delAA wurden in der VHF-Gruppe nicht gefunden, sodass auf eine weitere Untersuchung dieser Varianten in der Kontrollgruppe verzichtet wurde.

4.2.3 Neu gefundene Varianten

Die 3 Exone des NPPA-Gens der VHF-Patienten wurden vollständig sequenziert und mit einer Referenzsequenz verglichen. Dabei fielen fünf zuvor nicht beschriebene Varianten in den Exonen 1 und 2 sowie im Intron 2 auf. Alle neu gefundenen Varianten lagen in heterozygoter Form vor. Keine dieser Varianten wurde in der Kontrollpopulation gefunden. Es wurden auch keine anderen, zuvor nicht beschriebenen Varianten in den Exonen 1 und 2 des NPPA-Gens bei den Kontrollpatienten gefunden.

4.2.3.1 Synonyme Varianten

Es wurden zwei verschiedene synonyme Varianten im Exon 2 bei zwei verschiedenen VHF-Patienten gefunden: c.171C>T (p.Val57Val) und c.426C>T (p.Ser142Ser). Diese kodieren für dieselbe Aminosäure wie der Wildtyp und führen somit zu keiner Veränderung im translatierten Protein.

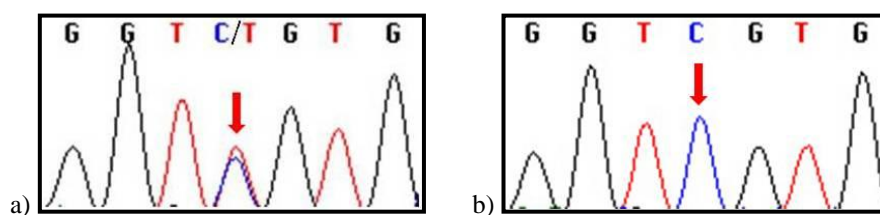


Abb. 4.13 Chromatogramm der synonymen Variante c.171C>T (a) im Vergleich zum Wildtyp (b).

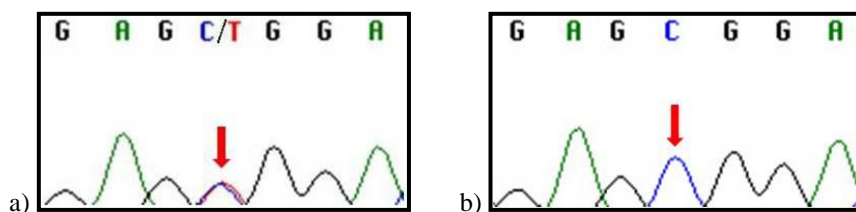


Abb. 4.14 Chromatogramm der synonymen Variante c.426C>T (a) im Vergleich zum Wildtyp (b).

Ergebnisse

4.2.3.2 Intronische Varianten

Es wurde eine Variante im Intron zwischen den Exonen 2 und 3 gefunden: c.450+42A>G. Bei der Untersuchung der Splicesite zwischen Exon 2 und Intron 2 mit der Software GENSCAN zeigte sich, dass das Splicing durch diese Variante nicht beeinflusst wird.

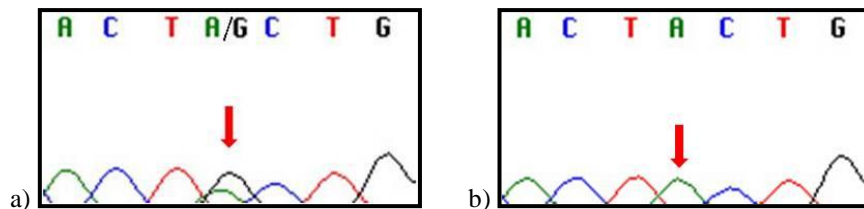


Abb. 4.15 Chromatogramm der intronischen Variante c.450+42A>G (a) im Vergleich zum Wildtyp (b).

4.2.3.3 Missense-Varianten

Es wurden zwei Missense-Varianten bei zwei verschiedenen VHF-Patienten gefunden, die zuvor noch nicht beschrieben wurden: c.103G>A (p.Ala35Thr) und c.123G>C (p.Lys41Asn). Beide Varianten wurden bei den Kontrollpatienten nicht gefunden.

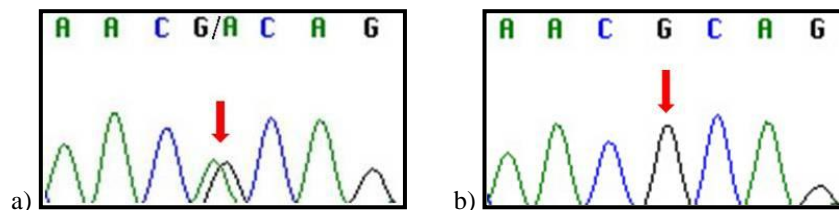


Abb. 4.16 Chromatogramm der Missense-Variante c.103G>A (a) im Vergleich zum Wildtyp (b).

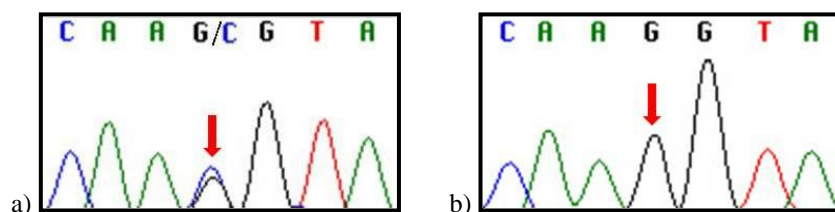


Abb. 4.17 Chromatogramm der Missense-Variante c.123G>C (a) im Vergleich zum Wildtyp (b).

Das Nukleotid c.123G ist das letzte Nukleotid des Exon 1, sodass die Variante c.123G>C an der Splicesite liegt. Bei Bestimmung des Splicings mit dem Programm GENSCAN konnten für beide Varianten jedoch keine Veränderungen im Splicing gefunden werden.

Beide Varianten führen zu einer veränderten Aminosäuresequenz im PräproANP-Peptid. Im Vergleich der Aminosäuresequenzen unterschiedlicher Tierarten zeigt sich, dass die AS Alanin an Position 35 des PräproANP in verschiedenen Säugetieren konserviert, die AS Lysin

Ergebnisse

an Position 41 in verschiedenen Wirbeltieren und Fischen hochkonserviert ist (Abb. 4.18 und Abb. 4.19).

Mensch	SN	A	DLM
Schimpanse	SN	A	DLM
Orang-Utan	SN	A	DLM
Katze	SN	A	DLM
Kleine Fledermaus	AN	A	DLM
Kaninchen	SN	A	DLT
Rind	SN	A	DLM
Hund	SN	A	DLL
Ratte	SN	T	DLM
Maus	SN	T	DLM
Opossum	SN	N	DLV
Schnabeltier	PN	S	DLV
Zebrafisch	SD	S	NM
Kugelfisch	--	-	--

Abb. 4.18 Konservierung der Aminosäure Alanin an Position 35 des PräproANP-Peptids in verschiedenen Spezies (Darstellung der AS im 1-Buchstaben-Code).

Mensch	MDF	K	NLL
Schimpanse	MDF	K	NLL
Orang-Utan	MDF	K	NLL
Katze	MDF	K	NLL
Kleine Fledermaus	MDF	K	NLL
Kaninchen	TDF	K	NLL
Rind	MDF	K	NLL
Hund	LDF	K	NLL
Ratte	MDF	K	NLL
Maus	MDF	K	NLL
Opossum	VDF	K	NLL
Schnabeltier	VDF	K	ALL
Zebrafisch	AKL	K	SLL
Kugelfisch	-- L	Q	DLL

Abb. 4.19 Konservierung der Aminosäure Lysin an Position 41 des PräproANP-Peptids in verschiedenen Spezies (Darstellung der AS im 1-Buchstaben-Code).

Bei dem Patienten, der die Variante c.103G>A(p.Ala35Thr) trug, handelt es sich um eine 1939 geborene Patientin mit persistierendem Vorhofflimmern. Die Patientin ist mit einer linksventrikulären Ejektionsfraktion von 65%, einer nur leichtgradigen Mitralklappeninsuffizienz, einer Septumdicke von 12 mm und keiner relevanten KHK

Ergebnisse

strukturell herzgesund. In der Familie der Patientin haben weitere Familienmitglieder Symptome wie Palpitationen. Vorhofflimmern konnte jedoch bei keinem weiteren Familienmitglied bisher diagnostiziert werden. Bei der Patientin konnte ebenfalls die noch nicht beschriebene synonyme Variante c.426C>T (p.Ser142Ser) nachgewiesen werden.

Der Patient, bei dem die Variante c.123G>C (p.Lys41Asn) nachgewiesen werden konnte, ist ein 1936 geborener Patient mit permanentem Vorhofflimmern. Der Patient weist eine strukturelle Herzerkrankung (LVEF 65%, Mitralklappeninsuffizienz I°, Septumdicke 12 mm, bekannte KHK mit Zustand nach Myokardinfarkt) auf. Die Familienanamnese des Patienten ist aufgrund einer ablehnenden Haltung der Familie gegenüber weiterer genetischer Diagnostik und weiterer Befragung unbekannt.

4.3 Connexin40

4.3.1 Assoziation des Promotorpolymorphismus c.-44G>A mit Vorhofflimmern

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein bekannter Promotorpolymorphismus c.-44G>A im Connexin40-Gen (GJA5) untersucht. Es wurden für die VHF-Gruppe und die Kontrollgruppe mittels Sequenzierung die Genotypen ermittelt. Die Genotypenverteilungen befanden sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Die Verteilungen der Genotypen der VHF- und der Kontrollgruppe wurden miteinander verglichen. Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 4.20).

		VHF	Kontrollen	p-Wert
		n=182	n=121	
c.-44G>A	GG	105 (57,7%)	70 (57,9%)	0,671
rs35594137	GA	60 (33,0%)	43 (35,5%)	
	AA	17 (9,3%)	8 (6,6%)	

Abb. 4.20 Übersicht der Genotypenverteilungen für den GJA5-Promotorpolymorphismus c.-44G>A in der VHF- und der Kontrollgruppe.

Es wurde ein rezessives, dominantes und additives Modell für das seltenere c.-44A-Allel angenommen und die Odds Ratio sowie das 95%-Konfidenzintervall berechnet. Hier zeigte sich in keinem Modell eine Assoziation der Variante mit dem Vorliegen von Vorhofflimmern.

Ergebnisse

	OR (95% KI)	p-Wert
c.-44G>A (rs35594137)		
Dominant	1,007 (0,632-1,603)	0,978
Rezessiv	0,687 (0,287-1,646)	0,400
Additiv	0,932 (0,651-1,335)	0,702

Abb. 4.21 Connexin40-Promotorpolymorphismus und seine Interaktion mit VHF im dominanten, rezessiven und additiven Modell. OR – Odds Ratio; 95% KI – 95%-Konfidenzintervall.

Die VHF-Gruppe wurde außerdem entsprechend der vorliegenden VHF-Art (paroxysmal, persistierend, permanent) unterteilt und die Genotypenverteilungen der Gruppen verglichen. Auch hier zeigten sich keine Unterschiede ($p=0,802$; Abb. 4.22).

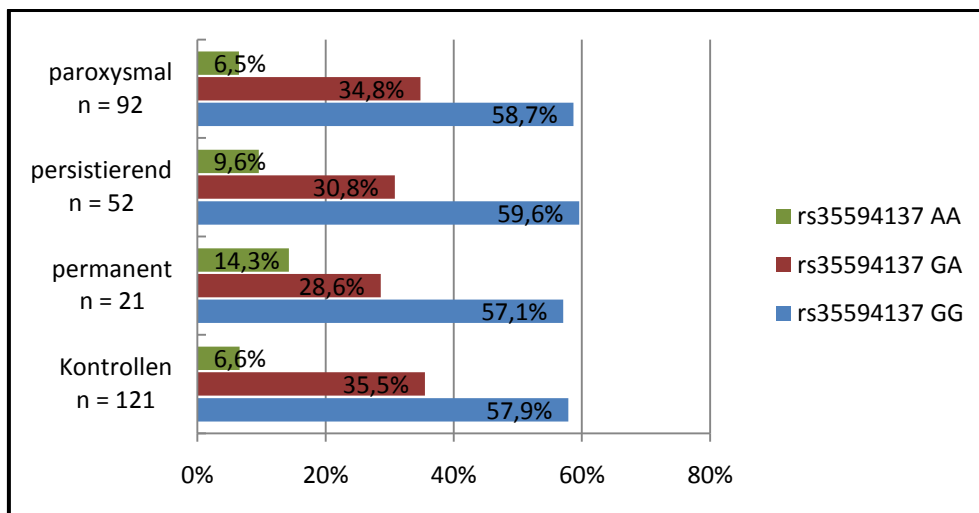


Abb. 4.22 Darstellung der prozentualen Verteilung der Genotypen der Variante c.-44G>A des GJA5-Gens in der VHF-Gruppe unterteilt nach der VHF-Art (paroxysmal, persistierend und permanent) im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Anschließend erfolgte die Unterteilung der VHF-Patienten in strukturell herzgesund und strukturell herzkrank (Abb. 4.23). Es ergaben sich keine Unterschiede in der Genotypenverteilung des Connexin40-Promotorpolymorphismus zwischen diesen beiden Gruppen. Auch der Vergleich der strukturell herzgesunden Patienten mit der Kontrollgruppe blieb ohne signifikante Aussage ($p=0,961$).

Ergebnisse

		strukturell herzkrank	strukturell herzgesund	p-Wert
c.-44G>A (rs35594137)	GG	67 (58,3%)	38 (58,5%)	0,905
	GA	37 (32,2%)	22 (33,8%)	
	AA	11 (9,6%)	5 (7,7%)	

Abb. 4.23 Vergleich der Genotypenverteilung für die Variante c.-44G>A des GJA5-Gens zwischen strukturell herzkranken und strukturell herzgesunden VHF-Patienten. Eine strukturelle Herzerkrankung wurde angenommen, wenn die Ejektionsfraktion des linken Ventrikels kleiner als 55%, die Septumdicke größer als 13mm, eine Koronare Herzerkrankung oder Klappenvitien zweiten Grades oder höher vorhanden waren.

5. Diskussion

5.1 Atriales Natriuretisches Peptid

Die kodierenden Abschnitte des für das Atriale Natriuretische Peptid kodierenden Gens (NPPA) wurden für alle VHF-Patienten sequenziert und auf Varianten in der Sequenz geprüft. Dabei wurden sowohl bekannte als auch unbekannte Varianten gefunden (Abb. 4.2). Es wurde zum einen die Assoziation von Vorhofflimmern mit bekannten Polymorphismen des Gens untersucht. Für die Varianten c.94G>A (p.Val32Met, rs5063) und c.454T>C (p.X152Arg, rs5065) sowie bekannte Varianten der 3'-UTR konnte in dieser Arbeit keine Assoziation mit dem Vorliegen von Vorhofflimmern nachgewiesen werden. Zum anderen wurde die Sequenz des NPPA-Gens auf nicht bekannte Varianten untersucht, welche in Zusammenhang mit dem Vorliegen von Vorhofflimmern stehen könnten. Dabei wurden in der VHF-Population synonyme [c.171C>T (p.Val57Val) und c.426C>T (p.Ser142Ser)] sowie Missense-Varianten [c.103G>A (p.Ala35Thr) und c.123G>C (p.Lys41Asn)] gefunden, welche in der Kontrollpopulation nicht nachweisbar waren.

5.1.1 Assoziation von bekannten Polymorphismen mit Vorhofflimmern

5.1.1.1 Polymorphismen c.94G>A und c.454T>C

Die am häufigsten in der Bevölkerung vorkommenden kodierenden Varianten im NPPA-Gen sind die Varianten c.94G>A (p.Val32Met, rs5063) und c.454T>C (p.X152Arg, rs5065). Entsprechend wurden in dieser Arbeit die seltenen Allele c.94A- sowie c.454C- bei 9,8% bzw. 27,1% der VHF-Patienten und 8,6% bzw. 25,3% der Kontrollen gefunden.

c.94G>A ist eine Variante im Exon 1 des NPPA-Gens und führt zu einem Austausch der AS Valin mit der AS Methionin an Position 32 des Präpropeptids. Diese AS betrifft das N-terminale Peptid LANH und ist in verschiedenen Spezies konserviert.²⁸ Die funktionelle Relevanz der Variante ist noch nicht geklärt, sie wurde jedoch mit dem Neuaufreten und der Progression einer Hypertonie in Verbindung gebracht.²⁶

Die Variante c.454T>C (p.X152Arg) befindet sich in Exon 3 und verändert in Anwesenheit des c.454C-Allels das Stopp-Codon des Gens. Dies führt zu einer Verlängerung des PräproANP um 2 zusätzliche Arginine, sodass ein um 2 AS längeres ANP (30 statt 28 AS) entstehen würde.²⁹ Das C-Allel scheint jedoch das angestammte Allel zu sein, da es ebenfalls in den Aminosäuresequenzen von Schimpansen, Makaken²⁶ und verschiedenen Nagetieren²⁸ gefunden wird. Bei letzteren werden die beiden zusätzlichen AS im gleichen

Diskussion

Prozessierungsschritt, in dem ANP vom Prohormon abgespalten wird, ebenfalls vom Peptid entfernt, sodass das biologisch aktive 28 AS umfassende ANP entsteht. Bei Vorhandensein des c.454C-Allels könnten deshalb auch beim Menschen die beiden Arginine entfernt werden, sodass die Variante ohne funktionelle Relevanz bliebe.²⁸ Dennoch wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen von einer Assoziation der Variante mit Erkrankungen wie Hypertonus, Schlaganfall, Albuminurie bei Diabetes mellitus und Asthma bronchiale berichtet.^{27, 29, 61, 62} In Kombination mit der Mutation c.456-457delAA wurde die Variante auch in einem familiären Fall mit dem Auftreten von Vorhofflimmern in Zusammenhang gebracht.¹⁷

Für beide Varianten wurden in dieser Arbeit die Verteilungen der Genotypen zwischen der VHF- und der Kontrollpopulation verglichen. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abb. 4.6). Auch im Vergleich der VHF-Gruppe mit einer der NCBI SNP Datenbank entnommenen Population nord- und westeuropäischer Abstammung (HapMap-CEU) konnten keine signifikanten Unterschiede für diese beiden Varianten gefunden werden (Abb. 4.7). Dies stimmt mit den Ergebnissen von Roberts et al. überein, die die Assoziation von VHF mit den beiden NPPA-Polymorphismen in zwei nordamerikanischen Populationen europäischer Abstammung, insgesamt 620 VHF-Patienten und 2446 gesunden Kontrollen, untersuchten.³¹ Sie fanden keinen Einfluss der Varianten c.94G>A und c.454T>C in diesen Kollektiven. Ren et al. untersuchten die Assoziation der Variante c.94G>A mit VHF in einer chinesischen Population (384 VHF-Patienten und 844 Kontrollen).³⁰ Sie fanden keine Assoziation bei der Betrachtung des gesamten Kollektivs, jedoch zeigte sich das c.94A-Allel bei Betrachtung von 160 "lone AF"-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen in einem dominanten und einem additiven Modell als Risikofaktor für die Entstehung von VHF. Dies konnte in der hier vorliegenden Arbeit weder beim Vergleich strukturell herzgesunder mit strukturell herzkranken VHF-Patienten (siehe Abb. 4.11) noch beim Vergleich von strukturell herzgesunden VHF-Patienten mit dem Kontrollkollektiv bestätigt werden. Diese unterschiedlichen Ergebnisse können auf die ethnischen Unterschiede - bei Ren et al. handelte es sich um eine chinesische Population und in dieser Arbeit um eine kaukasische Population – zurückzuführen sein. Des Weiteren war das untersuchte Kollektiv von Ren et al. (384 VHF-Patienten, 844 Kontrollen) wesentlich größer als das hier untersuchte (184 VHF-Patienten, 182 Kontrollen). Außerdem gab es Unterschiede in der Definition von Herzgesundheit. Während Ren et al. Patienten ohne Klappenfehler, Hypertonus, Koronare Herzkrankheit, Herzinsuffizienz und Diabetes mellitus in die Gruppe der "lone AF"-Patienten aufnahmen, wurde in der vorliegenden Arbeit bei Patienten mit einer Septumdicke von weniger als 14

Diskussion

mm, ohne Herzklappenvitien II° oder höher, ohne KHK und einer EF über 55% strukturelle Herzgesundheit angenommen.

5.1.1.2 Polymorphismen der 3'-UTR

In der 3'-UTR wurden bei den VHF-Patienten die bekannten Varianten c.*71G>T (rs5066), c.*85T>C (rs5067) und c.*92T>C (rs5068) gefunden. Die Genotypenverteilungen aller drei Varianten unterschieden sich nicht signifikant mit denen der HapMap-CEU-Population aus der NCBI SNP Datenbank. Die Variante c.*85T>C trat gekoppelt mit der Variante c.454T>C in Exon 3 auf, das heißt das c.454T-Allel trat immer zusammen mit dem c.*85T-Allel auf und das c.454C-Allel immer mit dem c.*85C-Allel. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Lima et al. überein, die die beiden Varianten in partiellem Linkage Disequilibrium bei ihrer Untersuchung fanden.⁶² Die für diese Arbeit rekrutierte Kontrollgruppe wurde aufgrund dieser nicht signifikanten Ergebnisse im Vergleich mit der HapMap-CEU-Gruppe nicht auf die Varianten der 3'-UTR untersucht.

5.1.2 Weitere bekannte Varianten

Die zuvor beschriebenen Varianten c.209C>T (rs1330598), c.229C>T (rs3170926), c.377G>A (rs1803268) und c.456-457delAA (rs3170926) konnten in der hier untersuchten VHF-Population nicht gefunden werden. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass sie eine zu geringe Häufigkeit besitzen, um in einer Population von der Größe der VHF-Gruppe (n=184) nachgewiesen zu werden.

5.1.3 Neu gefundene Varianten

Insgesamt wurden in der VHF-Population fünf zuvor nicht beschriebene Varianten bei vier Patienten gefunden.

Bei den Varianten c.171C>T (p.Val57Val) und c.426C>T (p.Ser142Ser) handelt es sich um synonyme Varianten, d.h. sie haben keinen Einfluss auf die Sequenz des translatierten Proteins, da sie für die gleiche AS kodieren wie der Wildtyp. Die Variante c.171C>T kodiert für die Aminosäure 57 des PräproANP, d.h. sie betrifft das Peptid Vessel Dilator. Die Variante c.426C>T hingegen kodiert für die Aminosäure 142 des PräproANP und kodiert somit auch für das Peptid ANP (Aminosäure 124-151 des PräproANP). Ein Einfluss der Variante auf die Funktion von ANP ist jedoch wie oben beschrieben bei einer nicht aminosäureändernden Variante sehr unwahrscheinlich.

Diskussion

Die Variante c.450+42A>G liegt im Intron zwischen Exon 2 und Exon 3. Da diese 42 Nukleotide hinter dem letzten Nukleotid des Exons 2 liegt, hat sie wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Splicesite und somit auch nicht auf das translatierte Protein. Dies bestätigt die Software GENSCAN, welche die mRNA und das translatierte Protein nach dem Splicing vorhersagt.

Bei den in Exon 1 gefundenen Varianten c.103G>A (p.Ala35Thr) und c.123G>C (p.Lys41Asn) handelt es sich um Missense-Varianten, d.h. sie führen zu einer Änderung in der Aminosäuresequenz des Proteins. Beide Varianten wurden bei keinem der Kontrollpatienten gefunden. Es wurden auch keine anderen nicht bekannten Varianten in der Kontrollgruppe gefunden.

Die Variante c.103G>A (p.Ala35Thr) führt zu einem Austausch von Alanin zu Threonin an Position 35 des PräproANP. Beide sind kleine, ungeladene, aliphatische und hydrophobe AS. Threonin ist durch seine zusätzliche OH-Gruppe polarisiert, was bei Alanin nicht der Fall ist. Insgesamt sind sich beide AS aber sehr ähnlich (Abb. 5.1).

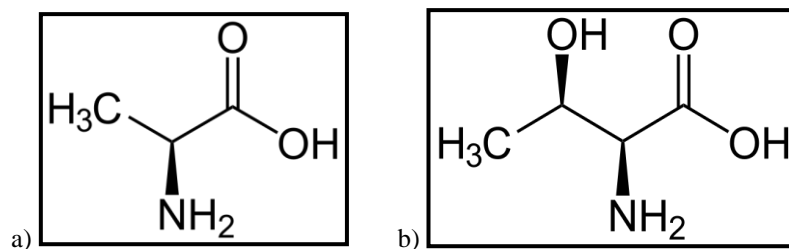


Abb. 5.1 Struktur der Aminosäuren a) Alanin und b) Threonin im Vergleich.

Die AS Alanin ist an dieser Position bei verschiedenen Säugetieren konserviert, bei Nagern ist jedoch Threonin als Wildtyp vorhanden (siehe Abb. 4.18). Dies alles könnte darauf hinweisen, dass die Funktion des Proteins auch mit Threonin an Position 35 nicht beeinträchtigt wird. Außerdem betrifft die AS 35 das Peptid LANH (siehe Abb. 1.2), dessen Funktion nicht abschließend geklärt ist. Vesely et al. beschreiben zwar ähnliche biologische Funktionen für LANH wie für ANP, diese Ergebnisse sind allerdings bisher nicht durch andere Arbeitsgruppen bestätigt worden. Das Peptid ANP ist von der Änderung der AS 35 des Propeptids nicht betroffen.

Die Variante wurde bei einer strukturell herzgesunden Patientin mit persistierendem Vorhofflimmern gefunden. In der Familie der Patientin sind Herzrhythmusstörungen in Form von Palpitationen bekannt. Vorhofflimmern konnte jedoch bisher nur bei der Indexpatientin dokumentiert werden.

Diskussion

Die Variante c.123G>C (p.Lys41Asn) führt zum Austausch der AS Lysin mit der AS Asparagin an Position 41 des Propeptids. Sowohl Lysin als auch Asparagin sind aliphatische, polare AS, Lysin ist jedoch mit zwei C-Gruppen mehr deutlich größer und im Gegensatz zum ungeladenen, sauren Asparagin positiv geladen und basisch (Abb. 5.2). Außerdem ist die AS Lysin an der Position 41 des Propeptids in verschiedenen Säugetieren und Fischen hochkonserviert (siehe Abb. 4.19), was zusammen mit den strukturellen Unterschieden der beiden AS auf eine mögliche funktionelle Einschränkung des Proteins durch den AS-Austausch hinweist. Auch diese AS ist nach der enzymatischen Spaltung des Propeptids Teil des Peptids LANH. Das Peptid ANP ist im letzten Abschnitt des Propeptids, ca. 80 AS entfernt, enthalten, sodass die Variante keinen Einfluss auf die Funktion von ANP haben sollte (siehe Abb. 1.2).

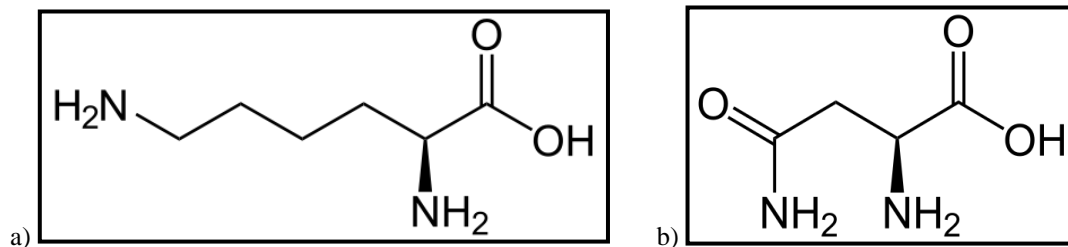


Abb. 5.2 Struktur der Aminosäuren a) Lysin und b) Asparagin im Vergleich.

Bei der Variante c.123G>A besteht außerdem die Besonderheit, dass es sich um das letzte Nukleotid des Exons 1 handelt und somit das Splicing beeinflussen könnte. Mit der Software GENSCAN wurde jedoch keine Veränderung des Splicings gefunden. Dabei handelt es sich allerdings nur um eine Vorhersage, um dies zu sichern müssten weitere Experimente zur Untersuchung der mRNA- und Proteinsequenz bei Vorhandensein der Variante unternommen werden.

Die Variante c.123G>C wurde bei einem Patienten mit permanentem Vorhofflimmern gefunden, welcher aufgrund einer bekannten Koronaren Herzerkrankung im Rahmen dieser Arbeit als strukturell herzkrank angesehen wird. Um einen eventuellen Einfluss der Variante auf das Vorliegen von Vorhofflimmern zu untersuchen, müsste sich auch hier eine weitere familiäre Untersuchung anschließen. Eine weiterführende Untersuchung der Familienmitglieder wurde jedoch von Seiten der Familie abgelehnt.

Ren et al. fanden 6 nicht bekannte Varianten im NPPA-Gen. Einige davon wurden bei mehreren VHF-Patienten und auch bei mehreren Kontrollen gefunden.³⁰ Keine der Varianten stimmt jedoch mit den in dieser Arbeit neu gefundenen Varianten überein.

5.2 Connexin40

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Assoziation des Promotorpolymorphismus c.-44G>A des GJA5-Gens untersucht. Dieses kodiert für das Gap Junction-Protein Connexin40. In den letzten Jahren hatten vermehrt Studien auf einen Zusammenhang zwischen dem Protein Cx40 und dem Auftreten von Vorhofflimmern hingewiesen (vergleiche 1.4.3).

In dieser Arbeit wurden die Genotypenverteilungen des Cx40-Promotorpolymorphismus c.-44G>A der Vorhofflimmer-Gruppe und der Kontrollgruppe verglichen. Dabei zeigte sich keine Assoziation (vergleiche Abb. 4.20 und Abb. 4.21). Dies unterscheidet sich von den Ergebnissen von Juang et al. Sie untersuchten bei 173 Vorhofflimmer-Patienten und 232 Kontrollen eine Assoziation zwischen den GJA5-Polymorphismen c.-44G>A und c.71A>G.⁶³ Beide Varianten wurden, wie auch schon von Groenewegen et al. und Firouzi et al. beschrieben, vollständig gekoppelt vorgefunden.^{56, 57} Aufgrund dieser Koppelung wurde in dieser Arbeit auf eine Untersuchung der c.71A>G-Variante verzichtet. Juang fand in der VHF-Gruppe eine signifikant erhöhte Rate des c.-44A-Allels.⁶³ Dieses Allel war sowohl im dominanten, additiven als auch rezessiven Modell deutlich mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten von Vorhofflimmern assoziiert, am stärksten war diese Assoziation im rezessiven Modell ausgeprägt (OR=2,71; 95%CI 1,34-5,50; p<0,004). Die Größe des untersuchten Patientenkollektivs ist bei Juang et al. vergleichbar mit dem in der vorliegenden Arbeit. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten auf die unterschiedliche ethnische Herkunft der Patientenpopulationen zurückzuführen sein: während Juang taiwanesische Patienten untersuchte, wurden in die vorliegende Studie ausschließlich kaukasische Patienten aufgenommen. Auch war bei Juang et al. der Anteil der Patienten mit paroxysmalem VHF wesentlich geringer als in dieser Studie (37 vs. 93 Patienten mit paroxysmalem VHF, 136 Patienten mit chronischem VHF vs. 74 Patienten mit persistierendem und permanentem VHF).

Derzeit liegen keine Assoziationsstudien bezüglich Vorhofflimmern und Connexin40 mit kaukasischen Patienten vor, welche mit den Ergebnissen dieser Arbeit verglichen werden können.

Es wurden jedoch in mehreren Studien andere Varianten im GJA5-Gen mit VHF assoziiert. Gollob et al. fanden 2006 bei Patienten mit idiopathischem VHF sowohl somatische als auch Keimbahnmutationen innerhalb des Cx40-Gens, welche zu einer abnormen Gap-Junction-Formation und einer verminderten elektrischen Kopplung der benachbarten Zellen führte.⁵⁵ Vor kurzem wiesen außerdem Yang et al. 4 neue Missense-Varianten bei Patienten mit

familiärem Vorhofflimmern bei jeweils allen betroffenen Familienmitgliedern nach.^{59, 60} Diese lagen in Domänen, welche bei allen Cx-Isoformen konserviert sind, bzw. führten sogar zu einem Proteinabbruch und damit zum Fehlen von mehreren konservierten und regulativen Domänen. Eine funktionelle Beeinträchtigung des Cx40-Proteins wäre damit naheliegend.⁶⁰ Die Relevanz von Varianten im GJA5-Gen für das Auftreten von Vorhofflimmern bleibt somit ungeklärt. Eine Assoziation des Gens mit Vorhofflimmern konnte im Gegensatz zu den Arbeiten von Juang, Gollob und Yang in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden.

5.3 Limitationen

5.3.1 Studiendesign

Die durchgeführte Untersuchung wurde als Assoziationsstudie konzipiert. Dabei handelt es sich um eine retrospektive Untersuchung, bei der die Verteilung eines Merkmales bei Patienten, bei denen die zu untersuchende Erkrankungen vorliegt, erfasst wird und mit der Verteilung desselben Merkmales bei einer Gruppe von Probanden, bei denen diese Erkrankung nicht vorliegt, verglichen wird. Diese Studienart ist weniger aussagekräftig im Vergleich zu prospektiven Studien, jedoch ist sie schneller und kostengünstiger durchführbar.⁶⁴

Insgesamt wurden für diese Untersuchung 184 Vorhofflimmer-Patienten und 182 Kontrollpatienten rekrutiert. Dies ist eine moderate Anzahl an Patienten, bei der eine eventuell nur schwache Assoziation nicht erkannt werden könnte. Des Weiteren handelte es sich um Patienten kaukasischen Ursprungs, sodass über andere ethnische Gruppen keine Aussage möglich ist und auch ein Vergleich der Ergebnisse mit Gruppen anderer Herkunft nur bedingt möglich ist.

Die Krankengeschichte der VHF-Patienten wurde durch Befragung dieser mittels eines Fragebogens erfasst und durch Auswertung der an der Charité – Campus Virchow Klinikum vorhandenen medizinischen Unterlagen ergänzt. Bei der Befragung der Patienten können durch verzerrte Erinnerungen bzw. subjektive Darstellung von Ereignissen Fehler auftreten (Recall Bias). Dies konnte in dieser Studie jedoch durch die genannte Auswertung der medizinischen Unterlagen und Untersuchungsergebnisse (zum Beispiel Echokardiographien, Koronarangiographien, bekannte Diagnosen aus Arztbriefen) ergänzt und somit der Recall Bias minimiert werden.

Diskussion

Die Patienten der Kontrollpopulation wurden nicht im Rahmen dieser Studie, sondern im Rahmen einer genetischen Kardiomyopathie-Studie an der Franz-Volhard-Klinik in Berlin-Buch, rekrutiert. Somit war eine persönliche Befragung der Kontrollpatienten nicht möglich. Es wurden jedoch sämtliche zur Verfügung stehenden medizinischen Unterlagen dieser Patienten ausgewertet, mit dem Ziel, Patienten mit Vorhofflimmern aus dem Kontrollkollektiv auszuschließen.

Bei genetischen Untersuchungen dieser Art werden häufig an einem Patientenkollektiv sehr viele verschiedene Kandidatengene bzw. genetische Varianten untersucht. Mit steigender Anzahl der untersuchten Marker kommt es jedoch zu einer steigenden Anzahl zufällig auftretender Auffälligkeiten.⁶⁴ Die hier untersuchte Gruppe von Vorhofflimmer-Patienten wurde auf nur wenige Kandidatengene untersucht. In dieser Arbeit handelte es sich um das NPPA- sowie das GJA5-Gen.

5.3.2 Experimentelle Methoden

Nach Aufklärung und Einwilligung der Patienten wurde diesen Blut abgenommen, aus welchem die DNA der Patienten gewonnen wurde. Die zu untersuchenden Genabschnitte wurden mittels PCR vervielfältigt und durch Sequenzierung oder Enzymverdau auf Varianten in der kodierenden Sequenz geprüft. Es wurden verschiedene bekannte Varianten bei den VHF-Patienten sowie bei den Kontrollen gefunden. Einzelne nicht eindeutig lesbare Stellen der DNA-Sequenzen wurden erneut sequenziert. Hierdurch konnten die Probleme behoben werden. Zur Sicherheit wurden alle Proben außerdem rückwärts sequenziert, wodurch das Vorhandensein einer Variante in der Sequenz bestätigt bzw. ausgeschlossen werden konnte.

5.4 Schlussfolgerungen

In dieser Arbeit konnte keine Assoziation von bekannten Polymorphismen des NPPA-Gens mit Vorhofflimmern nachgewiesen werden. Es wurden jedoch verschiedene neue Varianten bei VHF-Patienten gefunden, von denen 2 zu einer Änderung der Aminosäuresequenz des Peptids LANH führen. Die funktionelle Relevanz dieser Varianten ist unklar. Dennoch ist es aufgrund der Arbeiten von Hodgson-Zingman¹⁷ und Ren³⁰ wahrscheinlich, dass auch die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Varianten im für das LANH kodierenden Bereich des NPPA-Gens mit der Entstehung von Vorhofflimmern zusammenhängen könnten.

Bezüglich des Cx40-Promotorpolymorphismus c.-44G>A konnte in dieser Arbeit kein Zusammenhang mit dem Auftreten von VHF nachgewiesen werden. Trotzdem gibt es

Diskussion

zahlreiche Hinweise für eine funktionelle Relevanz von Connexin40 bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern. Durch die Arbeiten von Firouzi et al.⁵⁷, Gollob et al.⁵⁵ und zuletzt Yang et al.^{59,60} wird die Relevanz von genetischen Varianten im GJA5-Gen vor allem bei familiären Fällen von Vorhofflimmern unterstrichen. Ob GJA5-Varianten auch bei nicht familiärem Vorhofflimmern, wie bei Juang et al.⁶³ in einer taiwanesischen Population gezeigt, hier jedoch in einer kaukasischen Population widerlegt, eine Rolle spielen, muss Gegenstand weiterer Studien sein.

6. Zusammenfassung

Vorhofflimmern ist die häufigste Herzrhythmusstörung des Menschen. In den letzten Jahren ergaben sich zunehmend Hinweise auf einen genetischen Hintergrund für das Auftreten von Vorhofflimmern. In dieser Arbeit wurde die Assoziation von Vorhofflimmern mit den Polymorphismen c.94G>A und c.454T>C des NPPA-Gens, welches für das Atriale Natriuretische Peptid kodiert, sowie des c.-44G>A-Promotorpolymorphismus des GJA5-Gens, welches für das Gap Junction-Protein Connexin40 kodiert, untersucht. Außerdem wurde das NPPA-Gen auf noch nicht bekannte Varianten, welche im Zusammenhang mit Vorhofflimmern stehen könnten, untersucht.

Hierzu wurden 184 Patienten mit Vorhofflimmern sowie 182 Kontrollpatienten rekrutiert und ihre DNA extrahiert. Das NPPA-Gen wurde vollständig, das GJA5-Gen in der Promotorregion sequenziert und die Genotypenverteilungen der Polymorphismen erfasst. Außerdem wurden im NPPA-Gen noch nicht bekannte Varianten erfasst.

Im NPPA-Gen konnte für die Varianten c.94G>A und c.454T>C keine Assoziation mit dem Vorliegen von Vorhofflimmern festgestellt werden ($p=0,766$ bzw. $p=0,457$). Auch der Promotorpolymorphismus im GJA5-Gen konnte in dieser Arbeit nicht mit dem Auftreten von Vorhofflimmern assoziiert werden ($p=0,671$).

Es konnten jedoch nicht bekannte synonyme sowie Missense-Varianten im NPPA-Gen nachgewiesen werden. Die Missense-Variante c.103G>A lag bei einer strukturell herzgesunden Patientin mit persistierendem Vorhofflimmern vor. Bei dieser Patientin könnte aufgrund einer familiären Häufung von Herzrhythmusstörungen eine genetische Ursache vermutet werden. Die funktionelle Bedeutung der gefundenen Variante muss allerdings in weiteren Studien untersucht werden. Die Missense-Variante c.123G>C wurde bei einem strukturell herzkranken Patienten mit permanentem Vorhofflimmern nachgewiesen. Eine weitere genetische Diagnostik wurde von der Familie abgelehnt.

Die von anderen Gruppen gefundenen Assoziationen von Vorhofflimmern mit Polymorphismen in den für ANP und Connexin40 kodierenden Genen konnten in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Es wurden jedoch neue Varianten im NPPA-Gen identifiziert, deren Zusammenhang mit Vorhofflimmern durch weiterführende funktionelle Untersuchungen erhärtet werden muss.

7. Literaturverzeichnis

1. Fuster V, Rydén LE, Cannon DS, et al. 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* 2006;114(7):e257-e354.
2. Nattel S. New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature* 2002; 415(6868):219-226.
3. Sinner MF, Pfeufer A, Kääh S. Genetik von Vorhofflimmern: seltene Mutationen, häufige Genvarianten und klinische Relevanz?. *Herzschr Elektrophys* 2006;17:95-105.
4. Kannel WB, Benjamin EJ. Current Perceptions of the Epidemiology of Atrial Fibrillation. *Cardiol Clin* 2009;27:13-24.
5. Hart RG, Halperin JL. Atrial fibrillation and thromboembolism: a decade of progress in stroke prevention. *Ann Intern Med* 1999;131(9):688-95.
6. Laupacis A, Boysen G, Connolly S, et al. Risk factors for stroke and efficacy of antithrombotic therapy in atrial fibrillation. Analysis of pooled data from five randomized, controlled trials. *Arch Intern Med* 1994;154:1449-57.
7. Wyse DG, Waldo AL, DiMarco JP, et al. A comparison of rate control and rhythm control in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2002;347(23):1825-33.
8. Rienstra M, Van Gelder IC, Hagens VE, Veeger NJ, Van Veldhuisen DJ, Crijns HJ. Mending the rhythm does not improve prognosis in patients with persistent atrial fibrillation: a subanalysis of the RACE study. *Eur Heart J* 2006;27(3):357-64.
9. van Gelder IC, Hagens VE, Bosker HA, et al. A comparison of rate control and rhythm control in patients with recurrent persistent atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2002;347(23):1834-40.
10. Hoffmann E, Janko S, Reithmann C. Schrittmachertherapie und Vorhofflimmern. UNI-MED Verlag 2005;1. Auflage.
11. Ausma J, van der Velden HM, Lenders MH, et al. Reverse structural and gap-junctional remodeling after prolonged atrial fibrillation in the goat. *Circulation* 2003;107:2051-2058.

12. Anderson JL, Gilbert EM, Alpert BL, et al. Prevention of symptomatic recurrences of paroxysmal atrial fibrillation in patients initially tolerating antiarrhythmic therapy. A multicenter, double-blind, crossover study of flecainide and placebo with transtelephonic monitoring. Flecainide Supraventricular Tachycardia Study Group. *Circulation* 1989;80(6):1557-70.
13. Fox CS, Parise H, D'Agostino RB, et al. Parental Atrial Fibrillation as a Risk Factor for Atrial Fibrillation in Offspring. *JAMA* 2004;291(23):2851-2855.
14. Arnar DO, Thorvaldsson S, Manolio TA, et al. Familial aggravation of atrial fibrillation in Iceland. *Eur Heart J* 2006;27(6):708-712.
15. Tsai CT, Lai LP, Hwang JJ, Lin JL, Chiang FT. Molecular Genetics of Atrial Fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2008;52(4):241-250.
16. Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene* 1999;234(2): 177-186.
17. Hodgson-Zingman DM, Karst ML, Zingman LV, et al. Atrial Natriuretic Peptide Frameshift Mutation in Familial Atrial Fibrillation. *N Engl J Med* 2008;359:158-165.
18. Pandey KN. Biology of natriuretic peptides and their receptors. *Peptides* 2005;26(6):901-932.
19. Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Natriuretic Peptides. *N Engl J Med* 1998;339(5):321-328.
20. Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM. Natriuretic Peptides, Their Receptors, and Cyclic Guanosine Monophosphate-Dependent Signaling Functions. *Endocr Rev* 2006;27(1):47-72.
21. Vesely DL. Atrial Natriuretic Peptide Prohormone Gene Expression: Hormones and Diseases that Upregulate its Expression. *IUBMB Life* 2002;53(3):153-159.
22. Vesely DL. Atrial natriuretic peptides in pathophysiological diseases. *Cardiovasc Res* 2001;51(4):647-658.
23. Houweling AC, van Borren MM, Moorman AF, Christoffels VM. Expression and regulation of the atrial natriuretic factor encoding gene *Nppa* during development and disease. *Cardiovasc Res* 2005;67(4):583-93.
24. van der Berg MP, van Gelder IC, van Veldhuisen DJ. Depletion of atrial natriuretic peptide during longstanding atrial fibrillation. *Europace* 2004;6(5):433-437.
25. Crozier I, Richards AM, Foy SG, Ikram H. Electrophysiological effects of atrial natriuretic peptide on the cardiac conduction system in man. *Pacing Clin Electrophysiol* 1993;16(4 Pt 1):738-742.

26. Conen D, Glynn RJ, Buring JE, Ridker PM, Zee RYL. Natriuretic peptide precursor A gene Polymorphisms and risk of blood pressure progression and incident hypertension. *Hypertension* 2007;50(6):1114-1119.
27. Conen D, Cheng S, Steiner LL, Buring JE, Ridker PM, Zee RYL. Association of 77 polymorphisms in 52 candidate genes with blood pressure progression and incident hypertension: The Women's Genome Health Study. *J Hypertens* 2009;27(3):476-483.
28. Rubattu S, Ridker P, Stampfer MJ, Volpe M, Hennekens CH, Lindpaintner K. The gene encoding atrial natriuretic peptide and the risk of human stroke. *Circulation* 1999;100:1722-1726.
29. Rubattu S, Stanzione R, Di Angelantonio E, et al. Atrial natriuretic peptide gene polymorphisms and risk of ischemic stroke in humans. *Stroke* 2004;35(4):814-818.
30. Ren X, Xu C, Zhan C, et al. Identification of NPPA variants associated with atrial fibrillation in a Chinese GeneID population. *Clin Chim Acta* 2010;411(7-8):481-485.
31. Roberts JD, Davies RW, Lubitz SA, et al. Evaluation of non-synonymous NPPA single nucleotide polymorphisms in atrial fibrillation. *Europace* 2010;12(8):1078-1083.
32. Severs JN, Bruce AF, Dupont E, Rothery S. Remodelling of gap junctions and connexin expression in diseased myocardium. *Cardiovasc Res* 2008;80:9-19.
33. Saffitz JE, Schuessler RB, Yamada KA. Mechanisms of remodeling of gap junction distributions and the development of anatomic substrates of arrhythmias. *Cardiovasc Res.* 1999;42(2):309-17.
34. Chaldoupi SM, Loh P, Hauer RN, de Bakker JM, van Rijen HV. The role of connexin40 in atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2009;84(1):15-23.
35. Duffy HS, Wit AL. Is there a role for remodeled connexins in AF? No simple answers. *J Mol Cell Cardiol* 2008;44(1):4-13.
36. van der Velden HM, Jongsma HJ. Cardiac gap junctions and connexins: their role in atrial fibrillation and potential as therapeutic targets. *Cardiovasc Res.* 2002;54(2):270-9.
37. Gollob MH. Begetting atrial fibrillation: Connexins and arrhythmogenesis. *Heart Rhythm* 2008;5(6):888-891.
38. van Veen AA, van Rijen HV, Opthof T. Cardiac gap junction channels: modulation of expression and channel properties. *Cardiovasc Res.* 2001;51(2):217-29.
39. Kostin S, Klein G, Szalay Z, Hein S, Bauer EP, Schaper J. Structural correlate of atrial fibrillation in human patients. *Cardiovasc Res.* 2002;54(2):361-79.

40. Simon AM, Goodenough DA, Paul DL. Mice lacking connexin40 have cardiac conduction abnormalities characteristic of atrioventricular block and bundle branch block. *Curr Biol.* 1998;8(5):295-8.
41. Hagendorff A, Schumacher B, Kirchhoff S, Lüderitz B, Willecke K. Conduction disturbances and increased atrial vulnerability in Connexin40-deficient mice analyzed by transesophageal stimulation. *Circulation* 1999;99(11):1508-15.
42. Verheule S, van Batenburg CA, Coenjaerts FE, Kirchhoff S, Willecke K, Jongsma HJ. Cardiac conduction abnormalities in mice lacking the gap junction protein connexin40. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 1999;10(10):1380-9.
43. Kirchhoff S, Nelles E, Hagendorff A, Krüger O, Traub O, Willecke K. Reduced cardiac conduction velocity and predisposition to arrhythmias in connexin40-deficient mice. *Curr Biol.* 1998;8(5):299-302.
44. Kirchhoff S, Kim JS, Hagendorff A, et al. Abnormal cardiac conduction and morphogenesis in connexin40 and connexin43 double-deficient mice. *Circ Res.* 2000;87(5):399-405.
45. van Rijen HV, van Veen TA, van Kempen MJ, et al. Impaired conduction in the bundle branches of mouse hearts lacking the gap junction protein connexin40. *Circulation* 2001;103(11):1591-8.
46. van der Velden HM, van Kempen MJ, Wijffels MC, et al. Altered pattern of connexin40 distribution in persistent atrial fibrillation in the goat. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 1998;9(6):596-607.
47. van der Velden HM, Ausma J, Rook MB, et al. Gap junctional remodeling in relation to stabilization of atrial fibrillation in the goat. *Cardiovasc Res.* 2000;46(3):476-86.
48. Nao T, Ohkusa T, Hisamatsu Y, et al. Comparison of expression of connexin in right atrial myocardium in patients with chronic atrial fibrillation versus those in sinus rhythm. *Am J Cardiol.* 2003;91(6):678-83.
49. Kanagaratnam P, Cherian A, Stanbridge RD, Glenville B, Severs NJ, Peters NS. Relationship between connexins and atrial activation during human atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2004;15(2):206-16.
50. Polontchouk L, Haefliger JA, Ebelt B, et al. Effects of chronic atrial fibrillation on gap junction distribution in human and rat atria. *J Am Coll Cardiol.* 2001;38(3):883-91.
51. Li DQ, Feng YB, Zhang HQ. The relationship between gap junctional remodeling and human atrial fibrillation. *Chin Med J* 2004;117(8):1256-8.

52. Takeuchi S, Akita T, Takagishi Y, et al. Disorganization of gap junction distribution in dilated atria of patients with chronic atrial fibrillation. *Circ J*. 2006;70(5):575-82.
53. Wilhelm M, Kirste W, Kuly S, et al. Atrial distribution of connexin 40 and 43 in patients with intermittent, persistent, and postoperative atrial fibrillation. *Heart Lung Circ*. 2006;15(1):30-7.
54. Ramanna H, Hauer RN, Wittkamp FH, et al. Identification of the substrate of atrial vulnerability in patients with idiopathic atrial fibrillation. *Circulation*. 2000;101(9):995-1001.
55. Gollob MH, Jones DL, Krahn AD, et al. Somatic mutations in the connexin 40 gene (GJA5) in atrial fibrillation. *N Engl J Med*. 2006;354(25):2677-88.
56. Groenewegen WA, Firouzi M, Bezzina CR, et al. A cardiac sodium channel mutation cosegregates with a rare connexin40 genotype in familial atrial standstill. *Circ Res*. 2003;92(1):14-22.
57. Firouzi M, Ramanna H, Kok B. Association of human connexin40 gene polymorphisms with atrial vulnerability as a risk factor for idiopathic atrial fibrillation. *Circ Res* 2004;95(4):e29-e33.
58. Hauer RN, Groenewegen WA, Firouzi M, Ramanna H, Jongsma HJ. Cx40 polymorphism in human atrial fibrillation. *Adv Cardiol*. 2006;42:284-91.
59. Yang YQ, Liu X, Zhang XL, et al. Novel connexin40 missense mutations in patients with familial atrial fibrillation. *Europace* 2010;12(10):1421-7.
60. Yang YQ, Zhang XL, Wang XH, et al. Connexin40 nonsense mutation in familial atrial fibrillation. *Int J Mol Med*. 2010;26(4):605-10.
61. Nannipieri M, Manganiello M, Pezzatini A, De Bellis A, Seghieri G, Ferrannini E. Polymorphisms in the hANP gene, albuminuria, and hypertension. *Hypertension* 2001;37(6):1416-1422.
62. Lima JJ, Mohapatra S, Feng H, et al. A polymorphism in the NPPA gene associates with asthma. *Clin Exp Allergy* 2008;38(7):1068-1070.
63. Juang JM, Chern YR, Tsai CT, et al. The association of human connexin 40 genetic polymorphisms with atrial fibrillation. *Int J Cardiol* 2007;116(1):107-112.
64. Victor A. Bewertung genetischer Forschungsergebnisse. Methoden und vermeidbare Fehler. *G+G Wissenschaft (GGW)* 2007;7(4):14-22.

8. Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
AP	Aktionspotential
AS	Aminosäure
AV-Knoten	Atrioventrikularknoten
BMI	Body-Mass-Index
BNP	B-Typ Natriuretisches Peptid, Brain Natriuretic Peptide
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CDNA	kodierende DNA
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CNP	C-Typ Natriuretisches Peptid
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
Cx	Connexin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddNTPs	Didesoxyribonukleotide
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
GJA5-Gen	Gap Junction Membrane Channel Protein Alpha 5-Gen
I_{Ca}	Calcium-Ionen-Einwärtsstrom
KHK	Koronare Herzkrankheit
95% KI	95% Konfidenzintervall
LANH	Long Acting Natriuretic Hormone
“lone AF”	Vorhofflimmern bei Patienten ohne nachweisbare strukturelle Herzerkrankung
mANP	mutierte Form des Atrialen Natriuretischen Peptids

Abkürzungsverzeichnis

mRNA	messenger RNA
NP	Natriuretisches Peptid
NPPA-Gen	Natriuretic Peptide Precursor A-Gen
NPRA, B bzw. C	Natriuretic Peptide Receptor A, B bzw. C
OR	Odds Ratio
PCR	Polymerasekettenreaktion
ProANP	Prohormon des Atrialen Natriuretischen Peptids
RLFP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TGF β	Transforming Growth Factor β
TIA	transitorische ischämische Attacke
TNF α	Tumornekrosefaktor α
UTR	Untranslatierte Region
VHF	Vorhofflimmern

Abkürzungsverzeichnis

Aminosäuren

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V
Stopp	X	X

Nukleinbasen

Adenin	A
Cytosin	C
Guanin	G
Thymin	T
Purin	R
Pyrimidin	Y

9. Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde an der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. Haverkamp und der Anleitung von Herrn Dr. med. Boldt durchgeführt. Bei Herrn Prof. Dr. med. Wilhelm Haverkamp möchte ich mich herzlich für die Bereitstellung des Themas sowie der Infrastruktur seines Instituts bedanken. Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Leif-Hendrik Boldt, der diese Arbeit begleitete und zu jeder Zeit für Fragen und Probleme bereitstand.

Außerdem danke ich für die Unterstützung der Mitarbeiter des Kardiogenetischen Labors der Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Berlin-Buch, in dem alle Experimente durchgeführt wurden. Besonders hervorheben möchte ich dort Herrn Dipl.-Ing. Biotech. Andreas Perrot, der mir während der experimentellen Phase der vorliegenden Arbeit eine große Hilfe war. Auch bei den Medizinisch-Technischen Assistentinnen, Andrea Köstner und Nadine Junge, die mich in die Techniken und Verfahren der verwendeten Methoden eingewiesen haben, möchte ich mich herzlich bedanken.

Ein besonderer Dank gilt auch meinem Mann sowie meinen Großeltern, ohne deren Unterstützung sowie allmorgendliches Wecken diese Arbeit wohl noch nicht fertig geschrieben wäre.

Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern, die mich auf meinem Weg zu dieser Arbeit stets unterstützt haben, mir das Studium und das Freisemester für die experimentellen Arbeiten dieser Dissertation ermöglicht haben und immer an mich geglaubt haben.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Maren Theimer, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchung genetischer Varianten im NPPA-Gen und ausgewählter Polymorphismen im GJA5-Gen bei 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) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

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

Berlin, 01.12.2013

Maren Theimer

Lebenslauf

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