

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie
(Prof. Dr. med. J. Brockmöller)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Bedeutung genetischer Varianten für das Auftreten von
Herzrhythmusstörungen bei Patienten mit intrakardialem
Kardioverter-Defibrillator: Eine Pilotstudie zu kardiologisch
relevanten Surrogatmarkern und Prädiktoren von
Herzrhythmusstörungen**

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Stefanie Busse (geb. Schnepf)
aus
Fritzlar

Göttingen 2015

Dekan:

Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatter/in:

Prof. Dr. med. J. Brockmüller

II. Berichterstatter/in:

Prof. Dr. med. M. Zabel

Tag der mündlichen Prüfung:

06.12.2016

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Bedeutung genetischer Varianten für das Auftreten von Herzrhythmusstörungen bei Patienten mit intrakardialem Kardioverter-Defibrillator: Eine Pilotstudie zu kardiologisch relevanten Surrogatmarkern und Prädiktoren von Herzrhythmusstörungen" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der plötzliche Herztod und seine Prävention	1
1.2	Physiologische Mechanismen der Herzerregung	5
1.2.1	Aktionspotential am Kardiomyozyten	5
1.2.2	β -adrenerge Stimulation am Kardiomyozyten	8
1.2.3	Ca^{2+} -Stoffwechsel am junktionalen sarkoplasmatischen Retikulum	9
1.2.3.1	Erregungs-Kontraktions-Kopplung	9
1.2.3.2	Sarkoendoplasmatische Retikulum-ATPase, Typ 2 (SERCA)	12
1.2.3.3	Phospholamban (PLN)	12
1.2.3.4	Interaktion von HRC mit dem quaternären Ca^{2+} -Ausstrom-Proteinkomplex und SERCA im sarkoplasmatischen Retikulum	13
1.2.3.4.1	Ryanodin2-Rezeptor (<i>RyR2</i>)	13
1.2.3.4.2	Triadin und Junctin	14
1.2.3.4.3	Calsequestrin 2 (<i>CASQ2/CSQ2</i>)	14
1.2.3.4.4	Histidin-rich calcium binding protein (HRC)	15
1.2.4	Calsequestrin 1 (<i>CASQ1/CSQ1</i>)	16
1.2.5	NO-Synthetase-1-Adapterprotein (<i>NOS1AP</i>)	16
1.2.6	Ankyrin-B (<i>ANK2</i>)	16
1.3	Pathophysiologie der Herzrhythmusstörung	17
1.3.1	Pathophysiologie der an der Herzerregung beteiligten Proteine	17
1.3.1.1	L-Typ-Kalziumkanal (<i>CACNA1C</i>)	18
1.3.1.2	$\text{Na}_v1.5$ (<i>SCN5A</i>)	18
1.3.1.3	hERG (<i>KCNH2</i>)	18
1.3.1.4	Phospholamban (PLN)	19
1.3.1.5	β_1 -adrenerger Rezeptor (<i>ADBR1</i>)	19
1.3.1.6	β_2 -adrenerger Rezeptor (<i>ADBR2</i>)	20
1.3.1.7	Ryanodin2-Rezeptor (<i>RyR2</i>)	21
1.3.1.8	Triadin	21
1.3.1.9	Calsequestrin 1 (<i>CASQ1/CSQ1</i>)	22
1.3.1.10	Calsequestrin 2 (<i>CASQ2/CSQ2</i>)	22
1.3.1.11	Histidine-rich calcium binding protein (HRC)	22
1.3.1.12	NO-Synthetase-1-Adapterprotein (<i>NOS1AP</i>)	23
1.3.1.13	Ankyrin-B (<i>ANK2</i>)	23
1.3.2	Ca^{2+} -Überladung als Trigger für Arrhythmien	24
1.3.3	Besondere Form der Herzrhythmusstörung: CPVT	24
1.4	Kandidatengene	26
1.4.1	<i>SCN5A</i>	26
1.4.2	Calsequestrin 2 (<i>CASQ2/CASQ2</i>)	26
1.4.3	β_1 -adrenerger Rezeptor (<i>ADRB1</i>)	27
1.4.4	β_2 -adrenerger Rezeptor (<i>ADRB2</i>)	27
1.4.5	<i>KCNQ1</i>	28
1.4.6	<i>KCNH2</i>	28

1.4.7	Histidin-rich calcium binding protein (<i>HRC</i>)	28
1.4.8	Phospholamban (<i>PLN</i>)	29
1.4.9	NO-Synthetase-1-Adaptorprotein (<i>NOS1AP</i>)	29
1.4.10	Ankyrin2 (<i>ANK2</i>)	29
1.4.11	<i>CACNA1C</i>	30
1.4.12	Ryanodin2-Rezeptor (<i>RyR2</i>)	30
1.4.13	Calsequestrin 1 (<i>CASQ1/CSQ1</i>)	30
1.5	Grund für Aufnahme in die Studie	31
1.6	Fragestellung und Aufgabenstellung	34
2	Material und Methoden	35
2.1	Klinische Studie	35
2.1.1	Elektrophysiologische Untersuchungen	36
2.1.1.1	Nicht-invasive Risikostratifikation mittels 24-Stunden-EKG	41
2.1.1.1.1	T-Wellen Alternans im Mikrovoltbereich (MTWA)	42
2.1.1.1.2	Nicht-anhaltende ventrikuläre Tachykardien (Non-sustained ventricular Tachycardia, NSVT)	44
2.1.1.1.3	Herzfrequenzvariabilität (HRV)	45
2.1.1.1.4	Herzfrequenz-turbulenz (HRT)	46
2.1.1.2	Nicht-invasive elektrophysiologische Untersuchung mittels ICD	48
2.1.1.3	N-terminal pro-brain natriuretic protein (NT-proBNP)	49
2.2	Molekulargenetische Laboranalysen	50
2.2.1	Materialien	50
2.2.1.1	Verbrauchsmaterialien	50
2.2.1.2	Reagenzien, Kits und Enzyme	50
2.2.1.3	Geräte	52
2.2.1.4	Software und Datenbanken	52
2.2.1.5	Primer	53
2.2.2	Methoden	58
2.2.2.1	Standardmethoden der Molekulargenetik	58
2.2.2.1.1	Isolation und Lagerung der DNA	58
2.2.2.1.2	Herstellung der Nucleosidtriphosphat (dNTP)-Mischung	58
2.2.2.1.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	59
2.2.2.1.4	Gelelektrophorese	59
2.2.2.2	Genotypisierung genetischer Polymorphismen	61
2.2.2.2.1	Genotypisierungen nach der PCR-RFLP-Methode	61
2.2.2.2.1.1	Genotypisierung des R389G Polymorphismus im adrenergen β_1 - Rezeptor	65
2.2.2.2.2	SNP-Genotypisierung mit TaqMan	66
2.2.2.2.2.1	Vorentwickelte Assays	69
2.2.2.2.3	SNaPshot-Methode	70
2.2.2.2.4	Genotypisierungen mit der SNaPshot-Methode	71
2.2.3	Maßnahmen zur Kontaminationsvermeidung und Ergebniskontrolle	76
2.3	Statistische Analyse	77
3	Ergebnisse	78
3.1	Patientenkollektiv	78
3.2	Gemessene Parameter in der Stichprobe	80
3.3	Häufigkeiten der Genvarianten	81

3.4	Genetische Assoziationen	83
3.4.1	Assoziationen mit Polymorphismen aus den Genen der Kalziumhomöostase	84
3.4.1.1	Phospholamban (PLN)	86
3.4.1.2	Calsequestrin 2 (CASQ2/CSQ2)	87
3.4.1.3	CACNA1C	89
3.4.1.4	Ryanodin2-Rezeptor (RYR2)	89
3.4.2	Assoziationen mit Polymorphismen aus Genen der β -adrenergen Stimulation am Herzen	90
3.4.2.1	β_1 -adrenerger Rezeptor (ADRB1)	91
3.4.2.2	β_2 -adrenerger Rezeptor (ADRB2)	91
3.4.3	Assoziationen mit Polymorphismen in Genen der kardialen elektrischen Erregung	92
3.4.3.1	SCN5A	94
3.4.3.2	KCNQ1	96
3.4.4	Assoziationen mit Polymorphismen in <i>nitric oxidase synthase-1 adaptorprotein (NOS1AP)</i>	97
3.4.4.1	NO-Synthetase-1-Adapterprotein (NOS1AP)	98
3.4.5	Assoziationen mit Polymorphismen in Genen des kardiomyozytären Zytoskeletts	99
3.4.5.1	Ankyrin2 (ANK2)	99
4	Diskussion	100
4.1	Übersicht über die Ergebnisse	100
4.2	Genotypenhäufigkeiten: Eigene Daten und Literaturdaten im Vergleich	101
4.3	Assoziationen mit Genvarianten der Kalziumhomöostase	103
4.3.1	Histidine-rich calcium binding protein (HRC)	103
4.3.2	Phospholamban (PLN)	104
4.3.3	Calsequestrin 1 (CSQ1/CASQ1)	104
4.3.4	Calsequestrin 2 (CSQ2/CASQ2)	105
4.3.5	CACNA1C	105
4.3.6	Ryanodin2-Rezeptor (RYR2)	106
4.4	Assoziationen mit Genvarianten aus dem adrenergen System	107
4.4.1	β_1 -adrenerger Rezeptor (ADRB1)	107
4.4.2	β_2 -adrenerger Rezeptor (ADRB2)	107
4.5	Assoziationen mit Genvarianten in der kardialen elektrischen Erregung	108
4.5.1	SCN5A	108
4.5.2	KCNQ1	110
4.5.3	KCNH2	111
4.6	Assoziationen mit Genvarianten aus dem Bereich des kardiomyozytären Kontraktionsapparates	112
4.6.1	ANK2	112
4.7	Assoziationen mit Polymorphismen im Gen für das Nitric oxidase synthase-1 Adaptorprotein (NOS1AP)	112
4.8	Ausblick und kritische Diskussion von Stärken und Schwächen	113
5	Zusammenfassung	115
6	Literaturverzeichnis	118

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
A	Adenosin
AC	Akzelerationskapazität
AP	<i>alkaline phosphatase</i>
bp	Basenpaare
BNP	<i>brain natriuretic peptide</i>
HRV	Herzfrequenzvariabilität
C	Cytosin
CASQ1/CSQ1	Calsequestrin 1
CASQ2/CSQ2	Calsequestrin 2
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CPVT1	Katecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardie, Typ1
d-	Desoxy-
DAD	<i>delayed afterdepolarizations</i> (späte Nachdepolarisationen)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DC	Dezelerationskapazität
DCM	dilatative Kardiomyopathie
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddH ₂ O	bidestilliertes H ₂ O
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
evtl.	ventuell
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
G	Guanin
G-Protein	Guanin-bindendes Protein

Abkürzung	Bedeutung
G _i	inhibierendes Guaninnucleotid-bindendes Protein
G _s	stimulierendes Guaninnucleotid-bindendes Protein
HRT	Herzfrequenz-turbulenz
HRV	Herzfrequenz-variabilität
ICD	<i>Implantable Cardioverter-Defibrillator</i>
KHK	koronare Herzerkrankung
LQT1	Long-QT-Syndrom Typ 1
LQT2	Long-QT-Syndrom Typ 2
LQT3	Long-QT-Syndrom Typ 3
LQT4	Long-QT-Syndrom Typ 4
LQT8	Long-QT-Syndrom Typ 8
LTCC	L-Typ-Ca ²⁺ -Kanal
LVDD	linksventrikulärer diastolischer Durchmesser
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MAF	<i>minor allele frequency</i> /Minor-Allelfrequenz
MAP	monophasisches Aktionspotential
max.	maximal
Mmol/l	Millimol pro Liter
MTWA	T-Wellen-Alternans im Mikrovoltbereich
MyBP-C	Myosin-bindendes Protein C
mV	Millivolt
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher
NoninvEP	nicht-invasive elektrophysiologische Untersuchung
NOS1AP	<i>Nitric oxide synthase-1 adaptor protein</i>
NSVT	<i>non-sustained ventricular tachycardia</i>
NT-proBNP	<i>N-terminal pro-brain natriuretic peptide</i>
NYHA	New York Heart Association
p	Signifikanzniveau
PCCD	<i>progressive cardiac conduction disease</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	pH-Wert

Abkürzung	Bedeutung
PKA	Proteinkinase A
PP1	Proteinphosphatase-Inhibitor-1
PVC	<i>premature ventricular contraction</i>
r^2	Determinationskoeffizient
RyR2	Ryanodin2-Rezeptor
RFLP	Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus
RMSSD	Quadratwurzel des quadratischen Mittelwertes der Differenzen aufeinanderfolgender RR-Intervalle
SAP	<i>shrimp alkaline phosphatase</i>
SCD	<i>sudden cardiac death</i> / plötzlicher Herztod
SDRR	Standardabweichung der Summe aller RR-Abstände
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
T	Thymin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE-Puffer	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan-EDTA-Puffer
TWA	T-Wellen Alternans
TWM	T-Wellenmorphologie
u. a.	unter anderem
VA	ventrikuläre Arrhythmien
Vt	Variante
vgl.	vergleiche
VT	ventrikuläre Tachykardie(n)
Wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Der plötzliche Herztod und seine Prävention

Der plötzliche Herztod (SCD), definiert als unerwarteter herzbedingter Tod innerhalb einer Stunde nach dem Auftreten erster Symptome, stellt noch immer eine wichtige Herausforderung für die Medizin dar. Die Angaben zur Inzidenz sind unterschiedlich, epidemiologische Studien gehen allerdings von jährlich 300.000 Betroffenen in den USA und schätzungsweise 600.000 in Europa aus (Laszlo et al. 2011, Seegers et al. 2012). Etwa 75% dieser Herz-Kreislauf-Stillstände sind durch lebensbedrohliche Herzrhythmusstörungen bedingt (Arastéh et al. 2009).

Zu den Risikogruppen zählen besonders Patienten mit koronarer Herzerkrankung, unter denen 50% der Todesfälle auf den plötzlichen Herztod zurückzuführen sind. Weiterhin sind Patienten nach Myokardinfarkt, mit Herzinsuffizienz und, seltener, mit arrhythmogenen Erkrankungen der Herzstruktur betroffen. Dabei treten etwa 80% der Fälle von plötzlichem Herztod im Rahmen einer koronaren Herzerkrankung (KHK) auf und etwa 20% bei Kardiomyopathien und genetisch determinierten Erkrankungen des Reizleitungssystems (Laszlo et al. 2011). Etwa zwei Drittel der Betroffenen sind männlich.

Der plötzliche Herztod ist allermeist von einer ventrikulären Tachykardie (VT), die in ein Kammerflimmern (VF) übergeht, verschuldet. Diese Zustände können z.B. im Rahmen akuter myokardialer Ischämie oder nach einem Myokardinfarkt auftreten. Bei dieser sogenannten Reentry-Tachykardie kommt es zu einer kreisenden Erregung im Myokard, oft an einer Infarktnarbe oder an isolierten Regionen mit schädigungsbedingt verlangsamter Leitungsfähigkeit (Martin et al. 2011). Dabei trifft die Erregungsfront immer wieder auf Myokard in der vulnerablen Phase, in der es zumindest teilweise wieder erregbar ist, sodass die Erregung nach einer normalen Aktivierung nicht mehr vollständig erlöschen kann und im Myokard kreist.

In der Prävention des plötzlichen Herztods hat sich am asymptomatischen Patienten der implantierte Kardioverter-Defibrillator (ICD) gegenüber der Prophylaxe mit Amiodaron als überlegen erwiesen. Die EMIAT-Studie hat Postinfarktpatienten, die prophylaktisch mit Amiodaron behandelt wurden, mit solchen verglichen, die ein Placebo erhielten (Julian et al. 1997). Wichtigstes Einschlusskriterium war jeweils u.a. eine LVEF \leq 40%. Hier zeigte sich der Vorteil einer Prophylaxe mit Amiodaron bei arrhythmiebedingten Todesfällen. Insgesamt wiesen jedoch beide Patientengruppen eine gleiche Gesamtmortalität auf, da unter den mit Amiodaron behandelten Patienten die Reinfarktrate und die Rate an anderen kardialen Todesfällen erhöht war. Die CAMIAT-Studie kam zum selben Ergebnis: In der Amiodarongruppe unter Postinfarktpatienten starben weniger am plötzlichen Herztod, die Gesamtmortalität unterschied sich jedoch nicht von jener in der Placebogruppe (Cairns et al. 1997). In der Studie waren > 10 ventrikuläre Salven oder ventrikuläre Extrasystolen pro Stunde wichtigstes Einschlusskriterium.

Die Verlängerung der Lebenszeit durch ICD-Therapie wurde bei chronischen Herzinsuffizienzpatienten in der SCD-HeFT-Studie bestätigt (Bardy et al. 2005). Hier wurden drei Gruppen verglichen: Patienten mit implantiertem Defibrillator, Patienten mit Amiodarontherapie und eine Placebogruppe. Die Patienten der Placebogruppe wiesen eine 5-Jahres-Sterblichkeitsrate von 36% auf. Im Vergleich dazu war die Gesamtmortalität in der Gruppe mit medikamentöser Therapie nicht signifikant niedriger und die Gesamtmortalität der Gruppe mit implantiertem Defibrillator signifikant niedriger.

Die erste Indikation zur sekundärprophylaktischen ICD-Therapie kam mit den Ergebnissen der AVID- und CIDS-Studie (Jung und Lüderitz 1997). Erst später wurde die Indikation zur Primärprävention aus den Ergebnissen von MADIT I und MADIT II abgeleitet. Die MADIT I-Studie war die erste Untersuchung zur primärprophylaktischen ICD-Therapie. Hierbei wurden ICD-Träger mit Patienten mit konventionellem medikamentösem Therapieregime (Medikation mit Amiodaron, β -Blockern, Klasse-I-Antiarrhythmika, ACE-Hemmer, Digitalis und Diuretika) verglichen. Wichtigste Einschlusskriterien waren ein vorangegangener Myokardinfarkt vor 3 oder mehr Wochen, 3 bis 30 nicht-anhaltende Kammertachykardien im 24-Stunden-EKG, LVEF \leq 35% und NYHA-Klasse I-III. Die ICD-Gruppe zeigte hier gegenüber der Gruppe mit konventioneller medikamentöser Therapie eine signifikant niedrigere

Gesamtmortalität. In letzterer Gruppe war die Zahl nicht-arrhythmiebedingter Todesfälle erhöht.

Die ICD-Therapie gilt in der Primärprävention als indiziert im Rahmen von koronaren Herzerkrankungen oder einem Zustand nach Myokardinfarkt, bei nichtischämischer dilatativer Kardiomyopathie sowie bei Herzinsuffizienz mit linksventrikulärer Ejektionsfraktion (LVEF) kleiner oder gleich 35%, unabhängig von der kardialen Grunderkrankung (Jung et al. 2006). In der Sekundärprävention gilt eine ICD-Therapie nach aufgetretenem Herz-Kreislauf-Stillstand oder nach mehrfach aufgetretenen, hämodynamisch instabilen, insbesondere synkopalen ventrikulären Tachykardien als indiziert.

Allerdings hat sich die derzeitige Risikostratifizierung in vielerlei Hinsicht als verbesserungswürdig erwiesen. Zunächst ist der derzeit wichtigste Prädiktionsfaktor, eine LVEF von kleiner oder gleich 35%, von unbefriedigender Spezifität und Sensitivität (Katraxis und Josephson 2012). So zeigte sich, dass in der Gesamtheit der Fälle von plötzlichem Herztod weniger als ein Drittel der Betroffenen eine LVEF aufwies, die sie für eine Primärprävention mit einem ICD qualifizierte. Eine wichtige Gruppe vom plötzlichen Herztod Betroffener wird mit dem Prädiktionsfaktor LVEF nicht erfasst und erscheint gar klinisch gesund. Dies betrifft insbesondere junge Erwachsene mit genetisch determinierten Erkrankungen der kardialen Ionenkanäle, wie etwa dem Long-QT-Syndrom oder dem Brugada-Syndrom oder ebenfalls genetisch determinierten Kardiomyopathien wie zum Beispiel der hypertrophen Kardiomyopathie.

Auch andere Methoden zur Risikostratifizierung als die LVEF, wie zum Beispiel die T-Wellenmorphologie oder die Veränderung der QT-Länge, zeigen in ihrer Zusammenschau keine adäquate Prädiktionsfähigkeit (Laszlo et al. 2011). So gibt es eine große Zahl am plötzlichen Herztod Verstorbener, bei denen eine ICD-Implantation hiernach nicht indiziert gewesen zu sein scheint.

Defizite in der Risikostratifizierung des plötzlichen Herztods führen u.a. dazu, dass lebensbedrohliche Herzrhythmusstörungen nur bei einer Minderheit von ICD-Trägern auftreten und die Mehrheit klinisch niemals von der Therapie profitiert. In einer Studie von Poole et al. belief sich die Inzidenz lebensrettender Schockabgaben durch einen ICD auf

22,68% (Poole et al. 2008). In jener Studie wurden 811 Patienten nach Implantation eines ICD in einer *follow-up*-Periode von durchschnittlich 45,5 Monaten beobachtet und die ICD anschließend nach Schockereignissen abgefragt. Als indizierte Schocks wurden solche bei ventrikulären Tachykardien (VT) und bei Kammerflimmern (VF) definiert. 269 der 811 Patienten (33,2%) erhielten mindestens einen ICD-Schock in der *follow-up*-Periode, 542 (66,8%) dagegen erhielten keinen. Unter den 269 Patienten, bei denen die ICD-Therapie zum Tragen kam, waren insgesamt 128 Patienten (15,8%) mit ausschließlich indizierten Schocks bei VT und VF und 87 Patienten (10,7%) mit ausschließlich nicht-indizierten Schocks. Die übrigen 54 Patienten empfingen beide Arten des Schocks. Insofern haben also lediglich 182 (22,4%) von allen Patienten in der *follow-up*-Periode klinisch von der ICD-Implantation profitiert. Bei 87 Patienten mit ausschließlich nicht-indizierten und 54 Patienten mit sowohl indizierten als auch nicht-indizierten Schockempfängen hat es außerdem 141 Patienten (17,4%) gegeben, die unnötige Schocks empfangen.

Es gibt viele Gründe, warum eine ICD-Therapie indessen besonders bedachtsam erwogen werden sollte. Sowohl die Implantation eines Defibrillators als auch die Schockabgabe bringt Risiken mit sich. Während der transvenösen ICD-Implantation und insbesondere beim intraoperativen Testen des Geräts kommt es zu myokardialen Zellschädigungen, die sich in einem Anstieg des kardialen Troponin I im Serum nachweisen lassen (Hurst et al. 1999). Weiterhin wurden signifikante myokardiale Zellschäden in Zusammenhang mit kumulativer und gemittelter Defibrillationsenergie aufgezeigt. Patienten mit koronarer Herzerkrankung erhalten mit der ICD-Therapie zwar einen lebensverlängernden Vorteil, der allerdings anscheinend mit einem erhöhten Risiko der Herzinsuffizienz nach adäquaten Schocks erkaufte ist (Goldenberg et al. 2006). Auch dies mag ein Hinweis auf konsekutive myokardiale Zellschädigungen sein. Weiterhin könnten die negativ-inotropen Wirkungen der Schocks das Todesrisiko erhöhen, insbesondere bei multipler Schockabgabe durch z.B. Aufnahme von Störsignalen, dem sogenannten *Oversensing*, oder einer fälschlichen Einordnung einer supraventrikulären Tachykardie als ventrikuläre Tachykardie mit konsekutiver nicht-adäquater Schockabgabe (Poole et al. 2008). Es gilt weiterhin zu bedenken, dass jede ICD-Implantation ein Infektionsrisiko mit sich bringt. Auch ist eine bedachtsame Erwägung der ICD-Therapie insofern wichtig, als inadäquate Schockabgaben durch das Gerät vom Träger oft als schmerzhaft oder gar traumatisch wahrgenommen werden. Bei betroffenen Patienten

sind erhöhte Ausprägungen von Depression und generalisierter Angst beschrieben worden (Saha und Goldberger 2011).

Weiterhin ist die Identifizierung neuer Prädiktoren für die Primärprävention von Familienangehörigen von am plötzlichen Herztod Verstorbener von Vorteil. Im Vergleich zur Normalbevölkerung tragen erstgradige Familienangehörige der von plötzlichem Herztod Betroffenen ein erhöhtes relatives Risiko, ebenfalls einen plötzlichen Herztod zu erleiden (Laszlo et al. 2011). Herzerkrankungen, die zum plötzlichen Herztod führen können, wie etwa Vorhofflimmern, koronare Herzerkrankung und der Myokardinfarkt, zeigen familiäre Häufungen, sodass ein genetisch begründeter Zusammenhang naheliegend ist. Die regelrechte Elektrophysiologie des Herzens hängt maßgeblich von der Funktion der beteiligten Ionenkanäle sowie weiteren Proteinen, wie zum Beispiel solchen, die in der myokardialen Ca^{2+} -Homöostase involviert sind, sowie Proteinen des Zytoskeletts ab. Es ist daher naheliegend, dass Variationen an den für diese Proteine kodierenden Genen proarrhythmische Auswirkungen haben könnten. In diesem Sinne könnte es sein, dass genetische Polymorphismen eine Neigung zum Auftreten eines plötzlichen Herztods bedingen können. Darum sollte weiter untersucht werden, ob und inwiefern sich bestimmte genetische Profile zur Prädiktion und Risikostratifizierung der ICD-Therapie eignen.

Schließlich ist zu bedenken, dass durch ICD-Implantationen einem Gesundheitssystem Kosten entstehen. Diese können zwar im Vergleich zu anderen Aufwendungen durchaus gering erscheinen, dennoch ist es wünschenswert, Ressourcen bestmöglich einzusetzen.

1.2 Physiologische Mechanismen der Herzerregung

1.2.1 Aktionspotential am Kardiomyozyten

Im Ruhezustand des Kardiomyozyten ist die extrazelluläre K^+ -Konzentration mit 4 mmol/l niedrig, verglichen mit der intrazellulären K^+ -Konzentration von 140 mmol/l (Schmidt et al. 2007). Umgekehrt verhält es sich mit den Na^+ -Konzentrationen, wobei die intrazelluläre Konzentration 10 mmol/l und die extrazelluläre Konzentration 140 mmol/l beträgt. In diesem Ruhezustand beträgt das sogenannte Membranruhepotential des Kardiomyozyten

etwa -90 mV. Diese Spannung wird maßgeblich durch einen Kaliumioneneinstrom in die Zelle über den K^+ -Einwärtsgleichrichter (i_{K1}) in der Nähe des K^+ -Gleichgewichtspotentials von -94 mV gehalten (vgl. Abbildung 1).

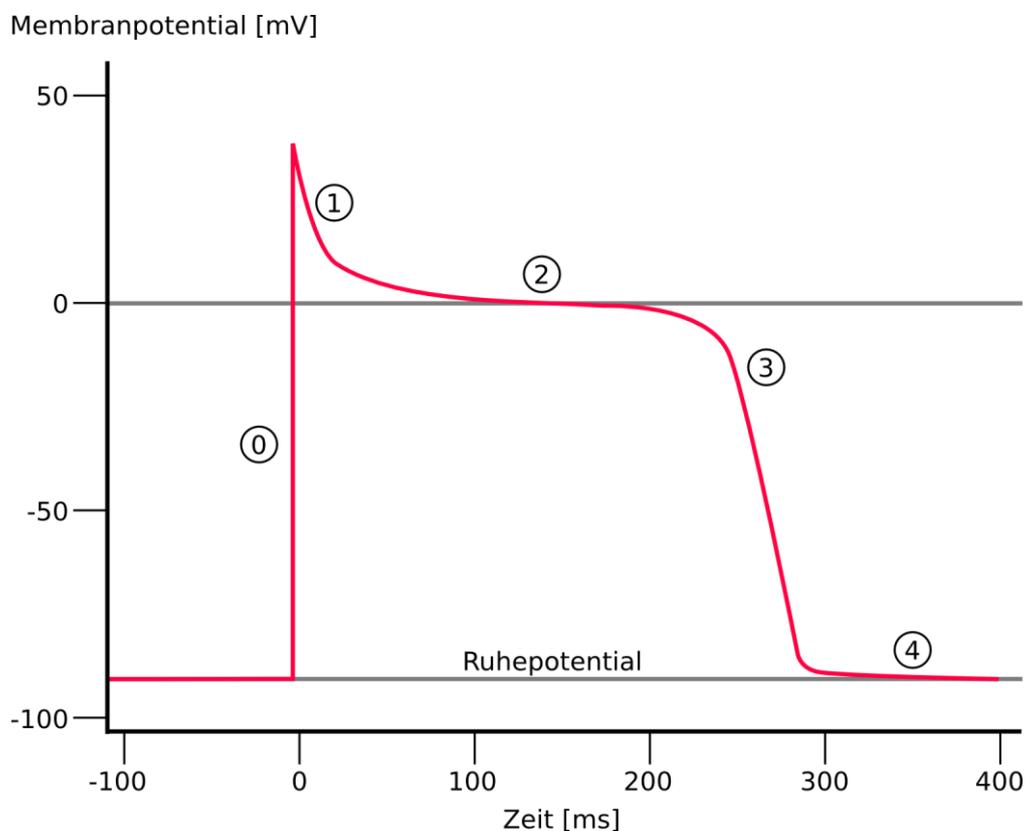


Abbildung 1: Aktionspotential des Kardiomyozyten. Das Aktionspotential am Kardiomyozyten lässt sich in fünf Phasen aufteilen: Die Aufstrich- oder Depolarisationsphase (0), das Erreichen der initialen Spitze (1) mit nachfolgender schneller Repolarisation, die Plateauphase mit langsamer Repolarisation (2), die terminale Repolarisationsphase (3) und die Ruhephase (4) mit Erreichen des Ruhemembranpotentials (verändert nach Schmidt et al. 2007, S. 567).

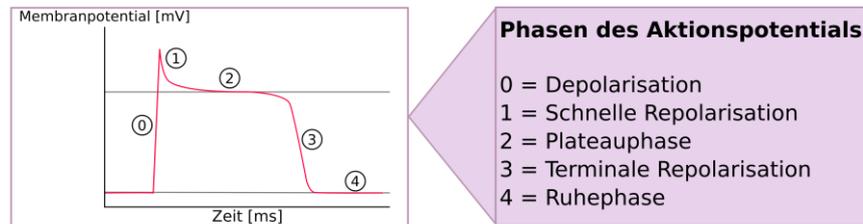
Die Übertragung der Erregung zwischen benachbarten Kardiomyozyten erfolgt direkt über Ionenaustausch durch *gap junctions*. Wird dabei das Membranpotential einer Zelle über eine Schwelle von etwa -70 mV angehoben, kommt es zur schnellen Inaktivierung des Einwärtsgleichrichters (i_{K1}) und zur Öffnung der schnellen inwärts gerichteten Na^+ -Kanäle (i_{Na}), welche das Aktionspotential einleiten.

Der Natriumioneneinstrom leitet die Phase der Depolarisation ein, in der das Membranpotential auf einen Spitzenwert von etwa +20 mV steigt. Ab einer Spannung von -40 mV werden Dihydropyridinrezeptoren am Sarkolemm erregt, die ein Teil der

Kalziumkanälen vom langsamen Typ (L-Typ- Ca^{2+} -Kanal; i_{Ca}) sind. Infolgedessen kommt es zum Einstrom von Ca^{2+} in den Intrazellularraum des Kardiomyozyten. Die Natriumkanäle (i_{Na}) schließen und inaktivieren sich spannungsunabhängig nach nur kurzer Zeit und beenden die Depolarisation. Das Membranpotential erfährt dann durch einen auswärtsgerichteten transienten Kaliumionenstrom (i_{to}) sowie durch einen Cl^- -getragenen elektrischen Auswärtsstrom (i_{Cl}) eine partielle Repolarisation. Es ist dann der Kalziumeinstrom (i_{Ca}) aus den L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen, der das Membranpotential in einer Plateauphase auf etwa 0 mV angehoben hält. Diese Plateauphase hält je nach Herzfrequenz etwa 200 bis 400 ms an. Schließlich schließen und inaktivieren sich die Kalziumkanäle und die Repolarisationsphase beginnt.

Die Repolarisation wird maßgeblich von zwei K^+ -Auswärtsgleichrichterströmen (i_{K}) getragen, welche mit zeitlicher Verzögerung in der depolarisierten Zelle aktiviert werden. Hierbei handelt es sich zum einen um einen Strom aus dem langsamen verzögerten Gleichrichter (i_{Ks}) und zum anderen um einen Strom aus dem schnellen verzögerten Gleichrichter (i_{Kr}). Im Rahmen dieser Hyperpolarisation werden zunehmend wieder K^+ -Einwärtsgleichrichter (i_{K1}) aktiviert, die ein Ruhemembranpotential von -90 mV stabilisieren. Die Ströme der K^+ -Auswärtsgleichrichter (i_{K}) versiegen in der frühen Ruhephase. Abbildung 2 zeigt die relativen Stromstärken der beteiligten Ionenkanäle sowie die an den Ionenkanälen beteiligten Proteine mit dem jeweiligen dafür kodierenden Gen.

Während der Plateauphase beginnt die absolute Refraktärzeit des Kardiomyozyten, während derer er nicht durch weitere Aktionspotentiale erregt werden kann, da die schnellen Natriumkanäle inaktiviert sind. Diese werden während der Repolarisationsphase unterhalb eines Membranpotentials von circa -40 mV wieder teilweise aktivierbar. Es lassen sich nun Aktionspotentiale auslösen, die allerdings von kürzerer Dauer sind und nur langsam fortgeleitet werden. Dieser Umstand beschreibt die relative Refraktärphase, bei der die Erregbarkeit des Arbeitsmyokards über dem gesamten Herzmuskel inhomogen ausgeprägt ist. In dieser Phase wird die Entstehung kreisender Erregungen, wie sie bei Arrhythmien vorkommen, möglich. Daher spricht man auch von der vulnerablen Phase.



Strom	Protein	Gen
Natriumeinstrom (i_{Na})	Nav 1.5	<i>SCN5A</i>
Kalziumeinstrom (i_{Ca})	Cav 1.2	<i>CACNA1C</i>
Schneller verzögerter K^+ -Auswärtsgleichrichterstrom (i_{Kr})	KvLQT1/minK	<i>KCNQ1</i>
Langsamer verzögerter K^+ -Auswärtsgleichrichterstrom (i_{Ks})	HERG	<i>KCNH2</i>

Abbildung 2: Dargestellt sind ausgewählte Ionenströme während des Aktionspotentials am Kardiomyozyten mit den beteiligten Proteinen sowie mit den codierenden Genen. Es werden nur solche Ionenströme von Proteinen dargestellt, deren codierende Gene in dieser Arbeit genotypisiert wurden (verändert nach Camm et al. 2006, S. 200).

1.2.2 β -adrenerge Stimulation am Kardiomyozyten

Die Zellmembran des Kardiomyozyten besitzt β -Adrenorezeptoren, an die die sympathischen Neurotransmitter Adrenalin und Noradrenalin binden (Schmidt et al. 2007). Der β -Adrenorezeptor ist an ein stimulatorisches G-Protein (G_s) gekoppelt, das nachfolgend membranständige Adenylzyklase aktiviert. Dieses Enzym katalysiert die Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) über die Abspaltung von Diphosphat aus ATP. cAMP ist ein allosterischer Aktivator der Proteinkinase A (PKA), einem zytosolischen Protein, das weitere Proteine, wie etwa den Ca^{2+} -Kanal vom langsamen Typ (LTCC), Phospholamban, den Ryanodin2-Rezeptor (RyR2), Troponin I, *myosin-binding protein C* (MyBP-C) sowie Protein-Phosphatase-Inhibitor-1 (PPI-1) durch Phosphorylierung aktiviert oder deaktiviert (Lohse et al. 2003). Dadurch kommt es zu prokontraktiven Effekten, wie etwa erhöhtem AP-getriggertem Ca^{2+} -Einstrom über L-Typ Kalziumkanäle im Rahmen der Ca^{2+} -getriggerten Ca^{2+} -Ausschüttung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) sowie Modulation der Ca^{2+} -Sensitivität an den Myofilamenten über Troponin I und MyBP-C. Weiterhin wird auch die Ca^{2+} -Aufnahme ins SR mithilfe der Modulation von SERCA und Phospholamban beschleunigt,

was essenziell für schnell aufeinanderfolgende Kontraktionen wie beim adrenerg vermittelten Anstieg der Herzfrequenz im Sinne der positiven Lusitropie ist. Abbildung 3A zeigt die Vorgänge bei β -adrenerger Stimulation am Kardiomyozyten.

Die sarkoplasmatische Ca^{2+} -Pumpe SERCA, die zytosolisches Ca^{2+} zurück ins SR fördert, liegt in einem Komplex mit ihrem Regulatorprotein Phospholamban vor, welches von *PLN* kodiert wird (Wang et al. 2011). Dieses erniedrigt die Ca^{2+} -Affinität von SERCA und inhibiert damit die Ca^{2+} -Aufnahme ins SR. Phospholamban selbst erfährt durch die β -adrenerge, PKA-getragene Phosphorylierung eine Inaktivierung. Diese β -adrenerge Stimulation führt also gegenüber der nicht derart stimulierten Zelle zum verstärkten zytosolischen Ca^{2+} -Anstieg und konsekutiv zu verstärkter Kraftentwicklung im Sinne einer positiven Inotropie.

1.2.3 Ca^{2+} -Stoffwechsel am junktionalen sarkoplasmatischen Retikulum

1.2.3.1 Erregungs-Kontraktions-Kopplung

Am T-Tubulus des Sarkolemm eines Kardiomyozyten befinden sich etwa 10 bis 25 L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle zusammen mit einem Cluster von 100 bis 200 Ryanodinrezeptoren in einem Signalkomplex, *Couplon* genannt (Schmidt et al. 2007; Bers 2008). Bei der elektromechanischen Kopplung im Myokard kommt es, ausgelöst durch lokale Aktionspotentiale, an den T-Tubuli zur Öffnung spannungsgesteuerter, von *CACNA1C* kodierter L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle vom Typ $\text{Ca}_v1.2$ und darüber zum Ca^{2+} -Einstrom vom Extrazellularraum in den Kardiomyozyten. In nur kurzer Entfernung zu diesen Kanälen befinden sich Ryanodinrezeptoren vom Typ 2 (RyR2) am junktionalen sarkoplasmatischen Retikulum. An diese gelangt Ca^{2+} durch Diffusion und induziert dort die Öffnung des im Ryanodinrezeptor integrierten Ca^{2+} -Kanals. Getrieben durch den hohen Ca^{2+} -Konzentrationsunterschied strömt Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum ins Zytosol und erhöht dort die Ca^{2+} -Konzentration von etwa 10^{-7} mol/l auf 10^{-6} mol/l. Diese Vorgänge entsprechen einer Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung. Die Ca^{2+} -Konzentrationserhöhung bedingt die Sättigung der Ca^{2+} -Bindungsstellen an Troponin C, sodass es über weitere

Kettenreaktionen zur Myofibrillenkontraktion kommt. Abbildung 3A stellt die elektromechanische Kopplung bei Myofibrillenkontraktion am Kardiomyozyten dar.

Für die nachfolgende Relaxationsphase wird die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration auf Ruhewerte gesenkt. Dies geschieht zum einen durch den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX), der drei Natriumionen in die Zelle hinein- und im gleichen Zuge ein Kalziumion aus der Zelle hinaus transportiert. Damit wird hauptsächlich jenes Ca^{2+} in den Extrazellularraum befördert, welches zuvor von dort über die L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle eingeströmt war. Weiterhin pumpen Proteine in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums, sogenannte sarkoendoplasmatische Retikulum-ATPasen (SERCA), Ca^{2+} wieder zurück in die sarkoplasmatischen Ca^{2+} -Speicher. Mit Erreichen der Ca^{2+} -Ruhekonzentrationen im Zytosol wird die Muskelkontraktion beendet. Abbildung 3B zeigt die elektromechanische Kopplung am Kardiomyozyten bei Myofibrillenrelaxation.

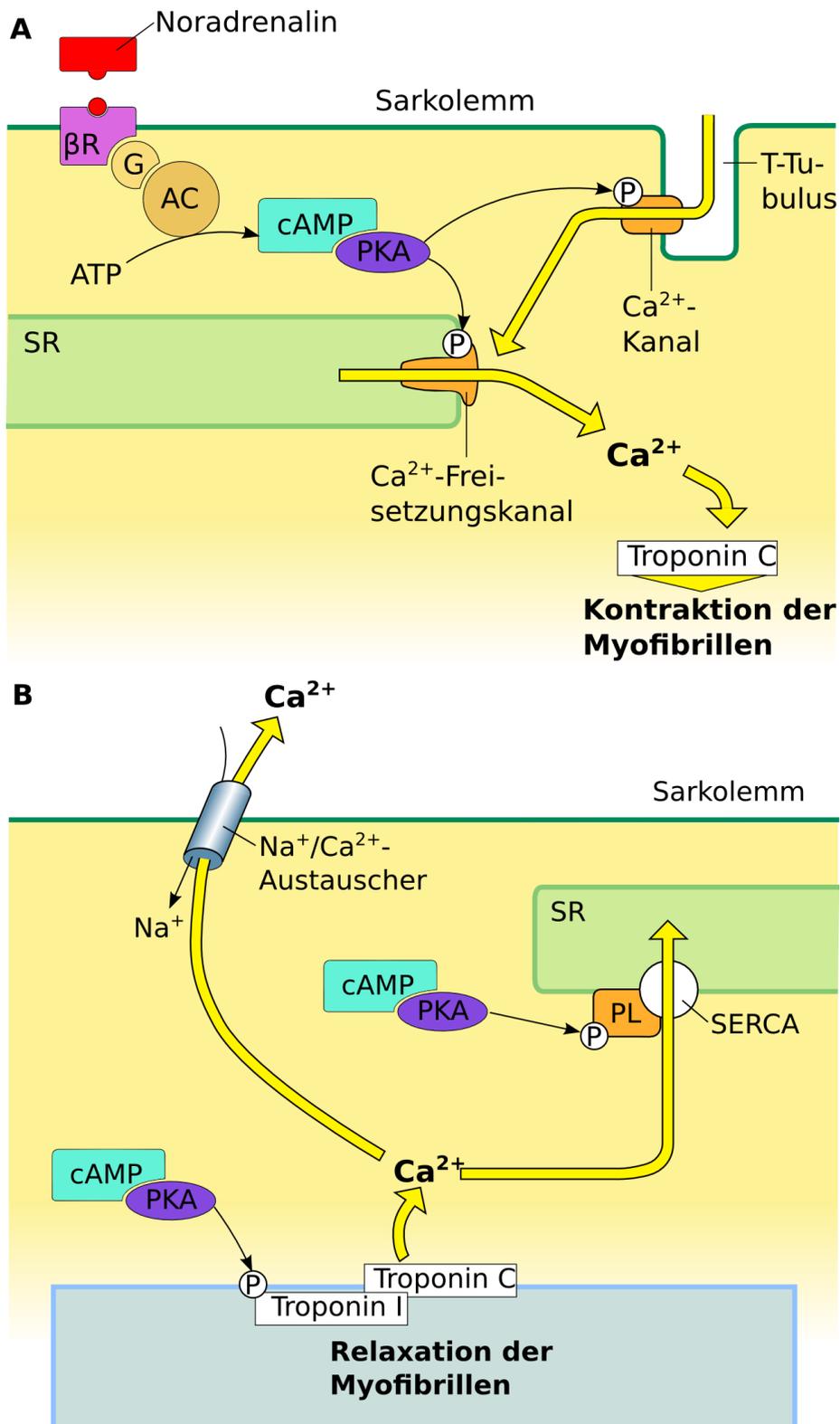


Abbildung 3: Elektromechanische Kopplung am Kardiomyozyten bei Myofibrillenkontraktion (A) und Myofibrillenrelaxation (B) (verändert nach Schmidt et al. 2007, S. 570). A: Ausgelöst von einem lokalen Aktionspotential öffnen sich L-Typ-Ca²⁺-Kanäle am T-Tubulus des Kardiomyozyten. Durch den konsekutiven Einstrom von Ca²⁺ in das Zytosol kommt es zur Ca²⁺-getriggerten Öffnung eines im Ryanodinrezeptor integrierten Ca²⁺-Freisetzungskanals mit Erhöhung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration in einen Bereich, in dem über Troponin C die Myofibrillenkontraktion ausgelöst wird.

β -adrenerge Stimulation durch Noradrenalin wirkt verstärkend kontraktile auf dieses System. Durch die Bindung von Noradrenalin am β -Rezeptor wird ein an den Rezeptor gekoppeltes G-Protein aktiviert, das daraufhin Adenylzyklase (AC) aktiviert. Adenylzyklase katalysiert die Bildung von cAMP aus ATP, welches Proteinkinase A (PKA) aktiviert. Proteinkinase A wirkt über Phosphorylierungen am sarkolemalem Ca^{2+} -Kanal und am Ca^{2+} -Freisetzungskanal am sarkoplasmatischen Retikulum aktivierend auf die Ca^{2+} -Ausschüttung.

B: In der Relaxationsphase pumpt die vom zytosolischen Ca^{2+} -Anstieg aktivierte SERCA Ca^{2+} in das sarkoplasmatische Retikulum und erniedrigt so die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration, zusammen mit dem $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, der Ca^{2+} in den Extrazellulärraum pumpt. Phospholamban inhibiert im unphosphorylierten Zustand SERCA. Durch β -adrenerge Stimulation wird Phospholamban über Proteinkinase A phosphoryliert und die Inhibition von SERCA beendet, sodass Ca^{2+} in das sarkoplasmatische Retikulum aufgenommen wird. Proteinkinase A phosphoryliert weiterhin Troponin I, welches nun die Ca^{2+} -Affinität von Troponin C herabsetzt, sodass sich Ca^{2+} von Troponin C weg in Richtung Zytosol bewegt und so die Myofibrillenkontraktion schneller beendet wird. Im Sinne positiver Lusitropie bewirkt β -adrenerge Stimulation die schnellere Entspannung des Herzmuskels.

1.2.3.2 Sarkoendoplasmatische Retikulum-ATPase, Typ 2 (SERCA)

Die sarkoendoplasmatische Retikulum-ATPase vom Typ 2 (SERCA) des Kardiomyozyten ist ein ATP-abhängiger Transporter, der am Ende der Exzitations-Kontraktions-Kopplung etwa 75% des zytosolischen Ca^{2+} in das SR fördert und über die daraus resultierende Senkung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration maßgeblich an der Beendigung der Kontraktion beteiligt ist (Schmidt et al. 2007). Etwa 25% der zytosolischen Ca^{2+} -Ionen verlassen die Zelle durch den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher. Dies entspricht in etwa der Menge an Ca^{2+} , die während des Aktionspotentials durch L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle in die Zelle gelangt war.

1.2.3.3 Phospholamban (PLN)

Phospholamban ist ein Protein des Kardiomyozyten, das über die reversible Inhibition der SERCA am SR die Ca^{2+} -Aufnahme ins sarkoplasmatische Retikulum herabsetzt und dementsprechend Einfluss auf die Kalziumhomöostase ausübt (Wang et al. 2011). Der inhibitorische Effekt auf SERCA wird durch Phosphorylierung des Phospholambans, wie sie nach β -adrenerger Stimulation auftritt, wieder aufgehoben und dabei die Ca^{2+} -Aufnahme ins sarkoplasmatische Retikulum gesteigert.

1.2.3.4 Interaktion von HRC mit dem quaternären Ca^{2+} -Ausstrom-Proteinkomplex und SERCA im sarkoplasmatischen Retikulum

Die sarkoplasmatischen Proteine Calsequestrin, Triadin, Junctin und RyR2 bilden im Kardiomyozyten einen quaternären Ca^{2+} -Ausstrom-Proteinkomplex (Arvanitis et al. 2010). Abhängig von der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration tritt *histidine-rich calcium binding protein* (HRC) sowohl mit diesem Proteinkomplex als auch mit der SERCA in Interaktion. Abbildung 4 zeigt die Interaktion von HRC mit dem quaternären Ca^{2+} -Ausstromkomplex und SERCA.

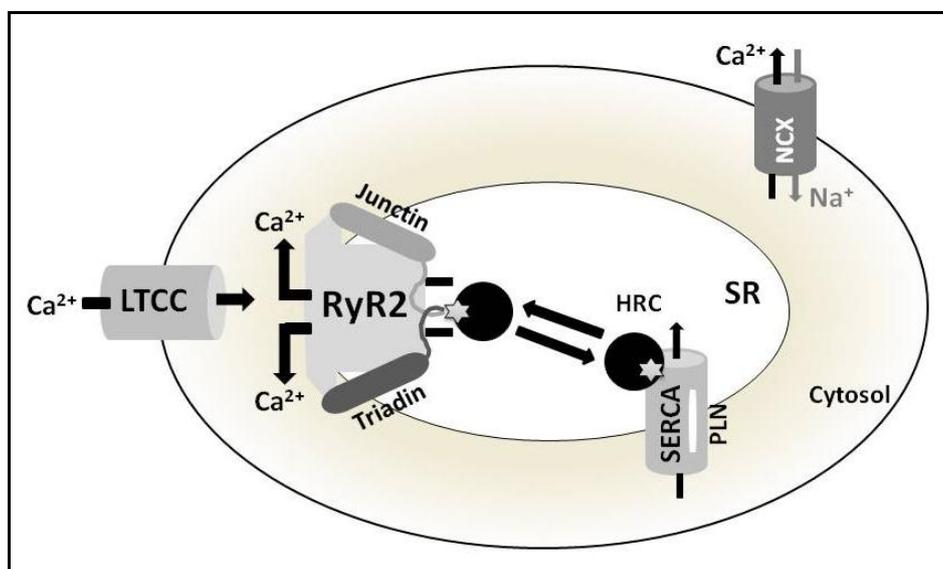


Abbildung 4: Quaternärer Ca^{2+} -Ausstromkomplex und Interaktion mit HRC, verändert nach Arvanitis et al. 2010.

1.2.3.4.1 Ryanodin2-Rezeptor (RyR2)

Der Ryanodin2-Rezeptor ist zentrales Element des Ca^{2+} -Ausstroms aus den sarkoplasmatischen Speichern des Myozyten, der über die Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und deren Einfluss auf den Querbrückenzyklus der Muskulatur zur Kontraktion der Muskelfaser führt (Schmidt et al. 2007). Die Koordination der Öffnungs- und Schließungswahrscheinlichkeiten des Ryanodin2-Rezeptors sind essenziell für den rhythmischen Herzschlag. Sie werden beeinflusst durch seine Assoziation im quaternären Ca^{2+} -Ausstromkomplex sowie durch *histidine-rich calcium binding protein* und (Arvanitis et al. 2010).

RyR2 befindet sich in der Membran des kardiomyozytären SR, in enger Nachbarschaft zu den L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen an den T-Tubuli des Sarkolemms (Schmidt et al. 2007). Der durch das Aktionspotential getriggerte Einstrom relativ geringer Ca^{2+} -Mengen über die spannungsabhängigen L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle triggert den relativ starken Ca^{2+} -Ausstrom aus dem SR über den Ryanodin2-Rezeptor. Auf diese Weise löst das AP den Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Ausstrom aus. Dabei kommt es pro geöffnetem L-Typ- Ca^{2+} -Kanal zur Aktivierung von etwa vier bis sechs Ryanodin2-Rezeptoren. Ein Verband aus etwa 25 L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen und etwa 100 Ryanodin2-Rezeptoren bilden eine funktionelle Einheit, das *Couplon*. Jeder Herzschlag wird über die koordinierte globale Aktivierung der Kardiomyozyten über Aktionspotentiale ausgeführt, die an jeder einzelnen Muskelfaser zur simultanen Aktivierung von ungefähr 10.000 *Couplons* und konsekutiv zur Kontraktion führt.

1.2.3.4.2 Triadin und Junctin

Triadin ist ein transmembranäres, integrales Membranprotein des kardiomyozytären sarkoplasmatischen Retikulums (Arvanitis et al. 2010). Die Rolle des Triadins ist noch nicht eindeutig geklärt, es werden zwei Möglichkeiten in der Literatur beschrieben. Zum einen die direkte Regulation der Aktivität des Ryanodin2- Ca^{2+} -Kanals (Gyorke und Terentyev 2008). Zum anderen, dass Triadin zusammen mit Junctin innerhalb des quaternären Ca^{2+} -Freilassungskomplexes als Gerüst dienen, welches das Ca^{2+} -bindende Calsequestrin in direkter Nähe zum Ryanodinrezeptor hält. Dadurch könnten hohe Ca^{2+} -Konzentration an der luminalen Seite des Ryanodinrezeptors gehalten werden und bei Aktivierung desselben einen schnellen Ca^{2+} -Ausstrom ins Zytosol unterstützen (Lee et al. 2012). Die Triadin-Junctin-Assoziation ist dabei unabhängig von Ca^{2+} -Konzentrationen. Triadin tritt in Interaktion mit *histidine-rich calcium binding protein* (HRC), wobei die Bindungsstärke zwischen den beiden Proteinen bei Ca^{2+} -Werten nahe der mittleren physiologischen Konzentration am größten ist. Die Verbindung wird bei hohen oder niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen unterbrochen.

1.2.3.4.3 Calsequestrin 2 (CASQ2/CSQ2)

Beim Calsequestrin 2 handelt es sich um ein kardiales Protein innerhalb der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums, das etwa 50-90% des Ca^{2+} im SR bindet und Komponente im

quaternären Ca^{2+} -Freilassungskomplex ist (Gyorke und Terentyev 2008). Es wird von *CASQ2*, auch *CSQ2* genannt, kodiert. Im sarkoplasmatischen Retikulum des Kardiomyozyten dient Calsequestrin 2 nicht nur der Ca^{2+} -Speicherung, sondern auch als aktiver Modulator des Ca^{2+} -Ausstroms über RyR2. Dazu übt es, abhängig von der intraluminalen Ca^{2+} -Konzentration, über eine Protein-Protein- Interaktion Einfluss auf die Öffnungswahrscheinlichkeit des Ca^{2+} -Kanals im Ryanodinrezeptor aus, wobei es möglicherweise als Ca^{2+} -Sensor für Ryanodin fungiert.

Calsequestrin 2 zeigt abhängig von der lokalen Ca^{2+} -Konzentration Zustandsänderungen, wobei im Herzen etwa ein Drittel des Ca^{2+} in einer löslichen Form des Calsequestrins und etwa zwei Drittel gebunden an eine ausgefällte Form vorliegt (Gyorke and Terentyev 2008). Dabei zeigte sich das Protein bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen im gelösten, tendentiell depolymerisierten Zustand und mit zunehmenden Ca^{2+} -Konzentrationen polymerisiert und ausfallend. Die Polymerisierung des Calsequestrins scheint der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -Speicherung zuträglich zu sein (Lee et al. 2010).

Im Ca^{2+} -konzentrationsabhängigen Mechanismus der Konformationsänderung des Calsequestrins könnte indessen eine Schlüsselrolle in der Dissoziation des Ca^{2+} vom Calsequestrin in der Phase des Ca^{2+} -Ausstroms aus dem SR im Rahmen der Erregungs-Kontraktionskopplung des Kardiomyozyten liegen (Gyorke und Terentyev 2008). Die Depolymerisation des Calsequestrins geschieht ausschließlich in der stochiometrischen Anwesenheit von Junctin (Lee et al. 2010). Die Interaktion beider Proteine zeigt sich konstant und unabhängig von der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration. Die Untersuchungen von Lee, Maeng et al. zeigen, dass die Junctin-Calsequestrin-Interaktion die Polymerisation des Calsequestrins inhibiert und dies zur reduzierten sarkoplasmatischen Ca^{2+} -Speicherung sowie reduziertem, spontanen Ca^{2+} -Ausstrom aus dem SR führt (Lee et al. 2010).

1.2.3.4.4 Histidin-rich calcium binding protein (HRC)

An der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums im Kardiomyozyten interagiert *histidine-rich calcium binding protein* (HRC) zum einen mit SERCA und zum anderen mit dem quaternären Proteinkomplex mit Triadin, Junctin, Ryanodin und Calsequestrin (Arvanitis et

al. 2010). Dabei übt HRC dort Einfluss auf Ca^{2+} -Aufnahme, Ca^{2+} -Abgabe und die Ca^{2+} -Speicherung im SR aus, indem es in direkter Interaktion mit SERCA und Triadin tritt. Die Interaktion zwischen HRC und SERCA ist Ca^{2+} -abhängig. Die größte Bindungsstärke zwischen diesen beiden Proteinen herrscht bei sehr niedriger Ca^{2+} -Konzentration, während die Interaktion bei ansteigenden Konzentrationen abschwächt und SERCA von HRC dissoziiert. Das aus diesem Komplex gelöste HRC kann so an Triadin binden und dabei innerhalb des quaternären Komplexes die Regulation des Ca^{2+} -Ausstroms über Ryanodinrezeptoren beeinflussen. In diesem Sinne könnte HRC als Sensor für die Ca^{2+} -Konzentration im SR dienen.

1.2.4 Calsequestrin 1 (CASQ1/CSQ1)

Beim Calsequestrin 1, welches von *CASQ1*, beziehungsweise *CSQ1* kodiert wird, handelt es sich um eine Isoform des Proteins Calsequestrin 2, die allerdings nicht nur im Herzmuskel, sondern auch in Skelettmuskelfasern vom schnellzuckenden Typ vorkommt (Dainese et al. 2009). Es ist über die Speicherung und Freilassung von Kalziumionen ins Zytoplasma in einem Mechanismus zur Glucoseaufnahme in die Muskelzelle involviert (Fu et al. 2004).

1.2.5 NO-Synthetase-1-Adapterprotein (NOS1AP)

NOS1AP kodiert für das Adapterprotein für die Stickstoffmonoxid-Synthetase1, dessen Funktion in neuronalen Zellen zwar beschrieben ist, in den Kardiomyozyten allerdings noch nicht verstanden ist. Es wird angenommen, dass es eine Rolle in der kardialen Repolarisation und Kontraktilität spielt (Aarnoudse et al. 2007).

1.2.6 Ankyrin-B (ANK2)

Ankyrin-B ist ein von *ANK2* kodiertes Adapterprotein in unterschiedlichen Zellen, wie zum Beispiel Neuronen oder β -Zellen des Pankreas. Im Kardiomyozyten ist Ankyrin-B ein multifunktionelles Adapterprotein im Zytoskelett des Kardiomyozyten, dessen Funktion in der zielgerichteten räumlichen Anordnung von Membranproteinen wie Transportern, Ionenkanälen und Signalmolekülen liegt (Sedlacek et al. 2008, Cunha et al. 2011). In diesem

Sinne ist Ankyrin-B wichtig für die Funktion von einer Untergruppe von LTCC, den Cav1.3-Kanälen, der Na⁺/K⁺-ATPase und dem NCX, mit denen Ankyrin-B direkt assoziiert ist und interagiert.

1.3 Pathophysiologie der Herzrhythmusstörung

1.3.1 Pathophysiologie der an der Herzerregung beteiligten Proteine

Da es in dieser Arbeit um erblich bedingte oder zumindest teilweise erblich mitbedingte Herzrhythmusstörungen geht, werden im Folgenden viele der Strukturen dargestellt, bei denen bekannt ist, dass erbliche Varianten zu Herzrhythmusstörungen führen können. Abbildung 5 zeigt wichtige kardiakale Ionenkanäle, das NO-Synthetase-1-Adapterprotein sowie Proteine der Kalziumhomöostase in räumlicher Anordnung im Kardiomyozyten und unter Angabe der jeweils codierenden Gene.

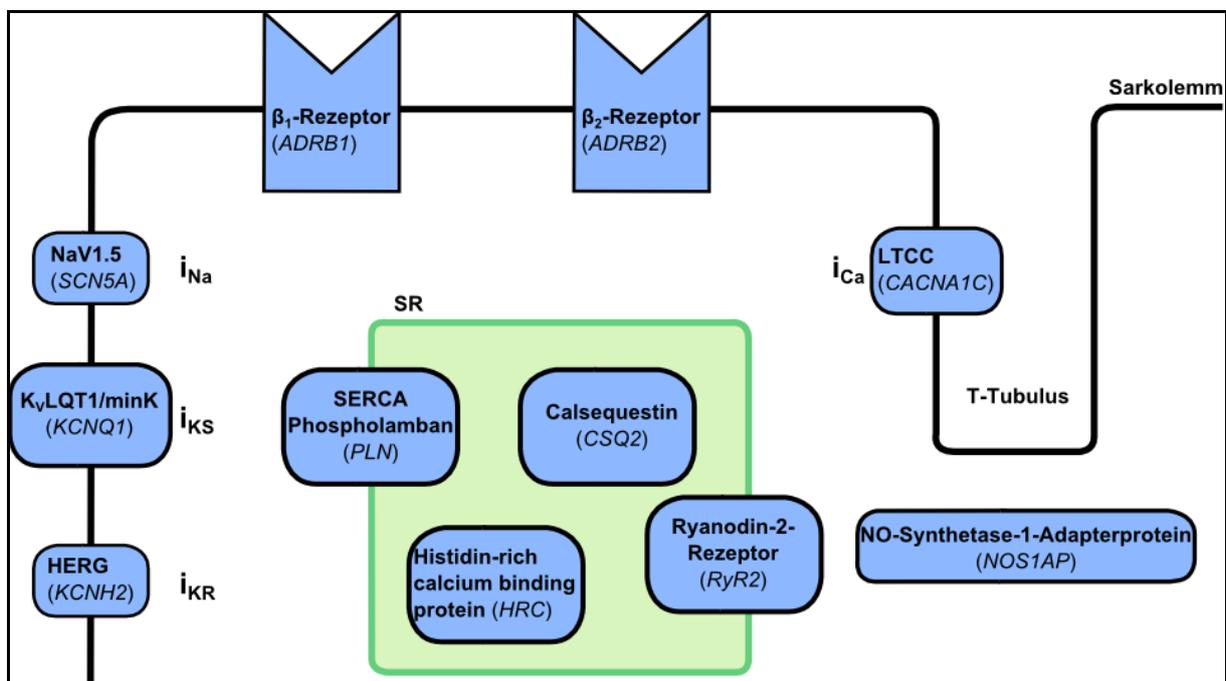


Abbildung 5: Übersicht über die räumliche Anordnung ausgewählter kardiomyozytärer Proteine mit den jeweiligen kodierenden Genen (verändert nach Camm et al. 2006, S. 197).

1.3.1.1 L-Typ-Kalziumkanal (*CACNA1C*)

CACNA1C kodiert für den L-Typ-Kalzium-Kanal (LTCC) vom Typ $\text{Ca}_v1.2$. *De novo missense*-Mutationen in *CACNA1C* zeigen sich derzeit als alleinig für das Auftreten des Timothy-Syndroms verantwortlich, einem Syndrom, bei dem unter anderem auch die frequenzkorrigierte QT-Zeit extrem, teilweise sogar um länger als 500 ms, verlängert ist (Gillis et al. 2011). Weiterhin führen Genvarianten im *CACNA1C* zum Long-QT-Syndrom vom Typ 8 (LQTS8). Für das Ansprechen auf eine Therapie mit Ca^{2+} -Kanalblockern scheinen SNPs für die Bindungsstelle des Medikaments mitverantwortlich zu sein (Beitelshees et al. 2009).

1.3.1.2 $\text{Na}_v1.5$ (*SCN5A*)

SCN5A kodiert für den einwärts gerichteten Na^+ -Kanal ($\text{Na}_v1.5$), der bei Öffnung den schnellen Na^+ -Einstrom zur Aufstrichphase des kardialen APs ermöglicht. Mutationen dieses Gens können zu verschiedenen Phänotypen führen. So sind sowohl *gain-of-function* Mutationen bekannt, die zum Long-QT-Syndrom vom Typ 3 (LQT3) oder familiärem Vorhofflimmern führen, als auch *loss-of-function* Mutationen, die sich in idiopathischem Kammerflimmern oder Sick-Sinus-Syndrom manifestieren (Chen et al. 2011). *Loss of function* Mutationen in *SCN5A* mögen auch für bis zu 20% aller Brugada-Syndrome verantwortlich sein (Camm et al. 2006). Weiterhin sind Assoziationen mit *SCN5A*-Varianten und *Progressive Cardiac Conduction Disease* (PCCD), einer unter anderem zu Bradykardie führenden Herzerkrankung, beschrieben (Martin et al. 2011).

1.3.1.3 *hERG* (*KCNH2*)

Der *hERG*- K^+ -Kanal wird von *KCNH2* kodiert und trägt durch K^+ -Ausströme (I_{Kr}) maßgeblich zur Repolarisierung des AP bei (Adeniran et al. 2011). Eine *gain-of-function*-Mutation des *hERG*, N588K kann zur Erhöhung der T-Wellenamplitude und über eine Verstärkung des I_{Kr} zur Verkürzung des QT-Intervalls, bis hin zum Short-QT-Syndrom vom Typ 1 (SQT1) führen. Eine Verkürzung des QT-Intervalls ist ein prädisponierend für die Erhaltung kreisender Erregungswellen im Sinne einer Reentry-Tachykardie.

1.3.1.4 Phospholamban (*PLN*)

Bei Veränderungen in der Expression des für Phospholamban kodierenden Gens *PLN* zeigen sich signifikante Veränderungen in der Morphologie des ventrikulären Aktionspotentials sowie in dessen K^+ - und Ca^{2+} -Strömen (Wang et al. 2011). Phospholamban mag über die Superinhibition der SERCA signifikante Änderungen in der Kalziumhomöostase des Kardiomyozyten spielen und somit indessen bei Mutationen und Defekten des *PLN* von Krankheitswert sein.

1.3.1.5 β_1 -adrenerger Rezeptor (*ADRB1*)

Patienten mit Herzinsuffizienz zeigen erhöhte Katecholaminspiegel, was am β_1 -Rezeptor stimulierend wirkt (Engelhardt et al. 2001). β_1 -Rezeptorstimulation am Herzen führt zwar zunächst zu verstärkter systolischer und diastolischer Pumpfunktion, eine chronische Stimulation mit β -adrenergen Agonisten hat sich jedoch in der Behandlung der Herzinsuffizienz eher als schädlich erwiesen. Stattdessen zeigt die langwährende β -Blockertherapie bei Herzinsuffizienten eine niedrigere Mortalität und verbessertes klinisches *outcome*. In diesem Sinne bestätigten Experimente *in vivo*, dass eine Überexpression der kardialen β_1 -Rezeptoren zu kardiotoxischen Effekten wie linksventrikulärer Fibrose und veränderter kardiomyozytärer Kalziumhomöostase führen kann.

Die in dieser Arbeit untersuchte Gly389-Variante im *ADRB1* weist eine verminderte Auftrittswahrscheinlichkeit für ventrikuläre Tachykardien bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) auf (Iwai et al. 2002). Ventrikuläre Tachykardien bergen das Risiko in ein lebensbedrohliches Kammerflimmern überzugehen welches zum plötzlichen Herztod führen kann. So ist anzunehmen, dass Träger dieser Variante gegenüber den Trägern der Arg389-Variante ein geringeres Risiko für den plötzlichen Herztod haben. Indessen wurde beobachtet, dass β_1 -Rezeptorblocker bei Herzinsuffizienzpatienten zu einem reduzierten Risiko für den plötzlichen Herztod und Arrhythmien führen. Da Träger der Gly389-Variante nach Stimulation mit β_1 -sympathomimetischem Isoproterenol im Sinne eines *loss-of-function* eine dreifach niedrigere Adenylylzyclase-Aktivität aufweisen als Träger der Arg389-Variante,

lässt sich annehmen, dass die erstere Variante in ähnlicher Weise wirkt wie β_1 -Rezeptorblocker. Dies würde mit sich häufenden Hinweisen, dass β_1 -Rezeptoraktivitäten kardiotoxische Wirkungen entfalten könne, einhergehen (Bernstein et al. 2011).

Zu einem weiteren Polymorphismus im *ADRB1*, S49G gibt es Hinweise auf eine unterschiedliche Rezeptorfunktion zwischen den Trägern der beiden Varianten, welche kardioprotektiv wirken können (Borjesson et al. 2000). In einem Modell mit Nagetieren zeigen sich diese Unterschiede in unterschiedlicher Agonisten-induzierter Herunterregulation, wobei die Ser49-Variante weniger empfänglich für Stimulation ist (Muthumala et al. 2008). Allerdings bleiben die genauer zugrundeliegenden Mechanismen derzeit unklar.

1.3.1.6 β_2 -adrenerger Rezeptor (*ADBR2*)

Rezeptorvarianten des β_2 -Rezeptors, die verändert auf agonistische Stimuli reagieren, zum Beispiel über abnorme Ionenkanalmodulation, können einen Risikofaktor für den plötzlichen Herztod darstellen (Sotoodehnia et al. 2006). Der β_2 -Rezeptor findet sich auch in Blutgefäßen, Lungenparenchym, Blutplättchen und Adipozyten. Auch hier könnten Rezeptorvarianten zur Erhöhung des Risikos für den plötzlichen Herztod führen. So kommt es in Adipozyten unter adrenerger Stimulation zu Lipolyse und der Freisetzung gesättigter Fettsäuren. Im Rahmen einer erhöhten Rezeptorsensitivität könnte es dabei zur inadäquat erhöhten Freisetzung und Akkumulation dieser Fettsäuren kommen, welche mit plötzlichem Herztod und ventrikulären Ektopien assoziiert ist.

Über den β_2 -Rezeptor kann nicht nur die sogenannte klassische Kaskade über ein stimulatorisches G-Protein initiiert werden, sondern, anders als beim β_1 -Rezeptor, auch zusätzlich der sogenannte nicht-klassische Signalweg über ein inhibitorisches G-Protein (G_i) (Lohse et al. 2003). Dies sowie eine unterschiedliche räumliche Anordnung der Rezeptoren werden als Ursache der Wirkungsunterschiede zwischen den beiden Rezeptorsubtypen gehandelt. So zeigt die Aktivierung des adrenergen β_2 -Rezeptors kardioprotektive Wirkungen, wie etwa eine hemmende Wirkung auf die Apoptose sowie eine verbesserte ventrikuläre Pumpfunktion und Kontraktion. Weiterhin führen β_2 -Rezeptor-vermittelte

Stimuli zur Phosphorylierung des Phospholambans über die Proteinkinase A (PKA) (Ikeda et al. 2008).

In der Literatur sind Assoziationen zwischen Polymorphismen in *ADRB2* und dem Risiko einen plötzlichen Herztod zu erleiden sowie einem schlechterem Verlauf bei Herzinsuffizienz und koronarer Herzkrankheit beschrieben (McLean et al. 2011).

1.3.1.7 Ryanodin2-Rezeptor (*RyR2*)

Der Ryanodin2-Rezeptor interagiert mit Triadin, Calsequestrin und Junctin innerhalb eines quaternären Ca^{2+} -Ausstromkomplexes (Priori und Napolitano 2005). Da dieser im kardiomyozytären Ca^{2+} -Stoffwechsel für den rhythmischen Herzschlag essenziell ist, ist davon auszugehen, dass Mutationen in *RyR2* eine Rolle bei Herzrhythmusstörungen spielen könnten. Tatsächlich sind häufig vorkommende Varianten des *RyR2* mit ventrikulären Arrhythmien und plötzlichem Herztod bei chronischem Herzversagen assoziiert (Ran et al. 2010). Neben *RyR2*-Mutationen haben weitere Faktoren wie die sarkoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration, Phosphorylierung und Nitrolierung am Rezeptor, Mutationen in Interaktionspartnern sowie andere Einfluss auf die Sensitivität und Öffnungswahrscheinlichkeit des Ryanodin2-Rezeptors (Prosser et al. 2010).

Bestimmte Varianten des *RyR2* zeigen sich ferner assoziiert mit catecholamin-induzierter polymorpher ventrikulärer Tachykardie (CPVT), wobei diese Mutationen zu einer zytosolischen Ca^{2+} -Überlagerung führen können (Martin et al. 2011).

1.3.1.8 Triadin

Überexpression des Triadins zeigte eine erhöhte Aktivität des Ryanodin- Ca^{2+} -Kanals mit Abnahme der im SR gespeicherten Kalziumionen sowie Abnahme spontaner Ca^{2+} -Ausströmungen und Membrandepolarisationen, ähnlich wie in CPVT-assoziierten Calsequestrinmutanten (Gyorke und Terentyev 2008). Hierbei ist allerdings zu bedenken, dass die Überexpression zu anderen pathophysiologischen Anpassungen oder Veränderungen führen können, die eine direkte Kausalität vortäuschen.

1.3.1.9 Calsequestrin 1 (*CASQ1/CSQ1*)

Allelvarianten in Polymorphismen des für Calsequestrin codierenden *CSQ1* zeigten Assoziationen mit Typ-2-Diabetes (Fu et al. 2004). Typ-2-Diabetes ist ein wichtiger Risikofaktor für die koronare Herzerkrankung und diese wiederum ist ein wichtiger Risikofaktor für Herzinsuffizienz und den plötzlichen Herztod (Arastéh et al. 2009, Chiha et al. 2012).

1.3.1.10 Calsequestrin 2 (*CASQ2/CSQ2*)

In K.o.-Mäusen, denen *CASQ2* fehlt, zeigt sich eine beinahe normale Herzfunktion mit der Ausnahme, dass sie nach Katecholamingabe polymorphe ventrikuläre Tachykardien entwickeln (Gyorke und Terentyev 2008). Dabei ist die aus dem SR ausströmende Ca^{2+} -Fraktion erhöht und so auch die spontanen Ca^{2+} -Ausströme aus dem SR, sogenannte *Sparks*. Diese Veränderungen könnten mit jenen Veränderungen einhergehen, die bei *CASQ2*-Mutanten mit CPVT-Syndrom auftreten. Dabei könnten jene Mutanten eine zytosolische Ca^{2+} -Überladung generieren (Martin et al. 2011).

Transgene Mäuse mit Überexpression von Calsequestrin 2 hingegen entwickeln eine Herzinsuffizienz (Engelhardt et al. 2001).

1.3.1.11 Histidine-rich calcium binding protein (*HRC*)

Polymorphismen des *HRC* zeigen hohe Assoziationen mit dem Auftreten lebensbedrohlicher Herzrhythmusstörungen (Arvanitis et al. 2010). Ein möglicher Mechanismus hierfür könnte in einer gestörten Phosphorylierung der Ser96Ala-Träger durch die Casein-Kinase II liegen. Ein Funktionsverlust der Phosphorylierungsseite des *histidine-rich calcium binding protein* (*HRC*) könnte dabei dessen Interaktion mit SERCA und/ oder Triadin stören und so zur Destabilisierung des Ryanodinrezeptors führen. Im Rahmen solch einer Destabilisierung könnte eine Zunahme spontaner Ca^{2+} -Ausströmungen aus dem SR im Zusammenhang mit späten Nachdepolarisationen zu tödlichen Herzrhythmusstörungen bei Patienten mit idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie führen. In der Tat zeigt der Ser96Ala-Polymorphismus eine statistisch signifikante Korrelation mit lebensbedrohlichen

Herzrhythmusstörungen unter den Trägern bei Patienten mit idiopathischer, dilatativer Kardiomyopathie (Han et al. 2011). Des Weiteren scheint HRC eine wichtige kardioprotektive und antiapoptotische Rolle bei Reperfusion nach Myokardischämien zu spielen.

1.3.1.12 NO-Synthetase-1-Adapterprotein (*NOS1AP*)

Das Genprodukt von *NOS1AP*, das NO-Synthetase-1-Adapterprotein, reguliert die intrazelluläre Kalziumkonzentration im Kardiomyozyten und beeinflusst dessen Kontraktion (Jamshidi et al. 2012). Dabei interagiert es mit der neuronalen NO-Synthetase (nNOS), was über die Inhibition des L-Typ-Kalziumkanals zur beschleunigten kardialen Repolarisation führt. Dies mag zur QT-Intervallverkürzung führen.

Arking et al. gehen davon aus, dass etwa 60% der Personen europäischer Herkunft Träger einer *NOS1AP*-Variante sind, die bis zu 1,5% aller Variationen des QT-Intervalls erklären würden (Arking et al. 2006). Weitere genetische Varianten von *NOS1AP* sind mit dem Auftreten lebensbedrohlicher Herzrhythmusstörungen sowie dem plötzlichen Herztod assoziiert (Crotti et al. 2009).

1.3.1.13 Ankyrin-B (*ANK2*)

ANK2 kodiert für das Adapterprotein Ankyrin-B im Zytoskelett des Kardiomyozyten. Unter anderem ist es von Bedeutung für die Funktion von LTCC von der Untergruppe $Ca_v1.3$ in atrialen Kardiomyozyten (Cunha et al. 2011). Hierbei stellte sich heraus, dass eine reduzierte Ankyrin-B-Expression in einer reduzierten $Ca_v1.3$ -Expression und -Funktion resultiert. Bei Patienten mit dokumentiertem Vorhofflimmern zeigte sich eine solche Pathophysiologie, die nahelegt, dass eine Mutation im *ANK2* mit Vorhofflimmern assoziiert ist. Dafür spricht auch, dass Patienten mit *loss-of-function*-Mutation im *ANK2* ein früh auftretendes Vorhofflimmern entwickeln.

In ventrikulären Kardiomyozyten ist Ankyrin-B direkt mit Na^+/K^+ -ATPase und dem NCX assoziiert (Sedlacek et al. 2008). Hier zeigte sich eine verminderte Ankyrin-B-Expression in abnormaler Ionenkanalfunktion, die zur Ca^{2+} -Überladung im sarkoplasmatischen Retikulum

sowie katecholamininduzierten späten Nachdepolarisationen führt. Es konnten verschiedene *ANK2*-Varianten identifiziert werden, die Sinusknotendysfunktion, Vorhofflimmern, plötzlicher Herztod, ventrikuläre Arrhythmien und sogar das Long-QT-Syndrom vom Typ 4 (LQTS4) zur Folge haben können. Häufig vorkommende Varianten offenbarten außerdem einen signifikant modulierenden Einfluss auf das QT-Intervall. Eine Verlängerung des QT-Intervalls bringt ein erhöhtes Risiko lebensbedrohlicher Herzrhythmusstörungen und plötzlichen Herztodes mit sich. Dabei ist das QT-Intervall etwa bis zu 35% hereditär beeinflusst (Aarnoudse et al. 2007).

1.3.2 Ca^{2+} -Überladung als Trigger für Arrhythmien

Sowohl Ca^{2+} -Überladung im Zytosol als auch Ca^{2+} -Überladung im SR des Kardiomyozyten sind dafür bekannt, an der Entstehung von getriggerten Arrhythmien beteiligt zu sein (Gyorke und Terentyev 2008). Dabei steigert eine hohe Ca^{2+} -Konzentration im SR die Empfindlichkeit der RyR2, sodass diese mit höherer Öffnungswahrscheinlichkeit des Ca^{2+} -Kanals spontane Ca^{2+} -Sparks ins Zytosol provozieren. Die resultierende Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration induziert an der Zellmembran späte Nachdepolarisationen, auch *delayed afterdepolarizations* (DAD) genannt, in Richtung der AP-auslösenden Schwelle durch einwärts gerichtete Ströme (i_{ti}) des $3\text{Na}^+/1\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, NCX (Bers 2008). In diesem Sinne stellen spontane Ca^{2+} -Ausströme aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) einen Angriffspunkt für Arrhythmien dar, indem sie verfrühte Aktionspotentiale in der vulnerablen Phase ermöglichen (vgl. 1.2.1). Kommt es am Sarkolemm der einzelnen Zelle zu späten Nachdepolarisationen, die nah an die AP-auslösende Schwelle von -70 mV heranreichen, kann dies nicht zur Entstehung einer globalen Herzrhythmusstörung führen, da die Nachbarzellen von abgeschwächten Strömen erreicht werden. Allerdings können sich solche Impulse im Herz ausbreiten, wenn sie einer ganzen Gruppe benachbarter Zellen synchron ihren Ursprung nehmen.

1.3.3 Besondere Form der Herzrhythmusstörung: CPVT

Mutationen im *RyR2* werden in etwa 40% der Patienten mit katecholaminergem polymorpher ventrikulärer Tachykardie vom Typ 2 (CPVT2) angenommen.

Dabei handelt es sich um eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung, die insbesondere bei sowohl physischem Stress als auch emotionaler Belastung meist im Kindesalter erstmals auftritt und zu Synkopen und plötzlichem Herztod führen kann (Betzenhauser und Marks 2010). Die Sterblichkeitsrate Betroffener beträgt bis zum 35. Lebensjahr 30-50% (Medeiros-Domingo et al. 2009). Betroffene Patienten sind homozygote Defekträger, weisen eine normale Herzstruktur auf und haben ein unauffälliges Ruhe-EKG.

Dabei zeigen die auftretenden bidirektionalen VTs starke Ähnlichkeiten mit Digitalis-induzierten Arrhythmien deren elektrophysiologischer Mechanismus gut verstanden ist (Priori und Napolitano 2005). Digitalis ist ein Herzglykosid, welches von extrazellulär an die α -Untereinheit der $3\text{Na}^+/2\text{K}^+$ -ATPase des Sarkolemm bindet und inhibiert, was zur erhöhten intrazellulären Na^+ -Konzentration und erniedrigter K^+ -Konzentration im Kardiomyozyten führt (Aktories et al. 2009). Der $\text{Na}^+/3\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher am Sarkolemm, NCX, vermindert bei therapeutischen Digitalisdosen konsekutiv seinen auswärts gerichteten Ca^{2+} -Transport. Daraus ergibt sich eine intrazelluläre Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration, die eine positive Inotropie bewirkt.

Außerhalb der therapeutischen Digitalisdosis kann der Mechanismus allerdings eine intrazelluläre Ca^{2+} -Überladung im Kardiomyozyten bewirken (Priori und Napolitano 2005). Der NCX-Austauscher ändert dabei seine Transportrichtung und schafft nun Ca^{2+} im Austausch von drei Na^+ aus der Zelle. Dieser elektrogene, depolarisierende Ionentransport erleichtert indessen das Auftreten später Nachdepolarisationen, in Richtung der Aktivierungsschwelle des i_{Na} . Innerhalb der vulnerablen Phase können pro-arrhythmische Aktionspotentiale ausgelöst werden. Weiterhin hat sich gezeigt, dass bei β -adrenerger Stimulation, welche über intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen die Inotropie erhöht, späte Nachdepolarisationen sowohl in Kardiomyozyten als auch in Purkinjefasern auftreten. Unter diesen Aspekten scheinen gewisse Mutationen im *RyR2* intrazelluläre Ca^{2+} -Überladungen bei sympathischer Stimulation zu provozieren, welche über späte Nachdepolarisationen zu Herzrhythmusstörungen führen könnten. Die Therapie der CPVT besteht derzeit aus der Einnahme von β -Blockern (Betzenhauser und Marks).

Bei Patienten mit CPVT werden Mutationen in *CASQ2* gefunden, welche mindestens 50% der CPVT-Fälle ausmachen (Medeiros-Domingo et al. 2009). Man spricht hier von der CPVT vom Typ1 (CPVT1). *CASQ2* kodiert für das sarkoplasmatische Ca^{2+} -bindende Calsequestrin,

welches mit RyR2 interagiert. Auch diese Tatsache demonstriert, dass die Veränderung des Ca^{2+} -Stoffwechsels im Kardiomyozyten Ursache für diese Art der Arrhythmien sein könnte.

1.4 Kandidatengene

Genetische Polymorphismen sind durch Mutation entstandene interindividuelle Unterschiede in der Nukleotidsequenz der DNA, die in der gesunden Normalbevölkerung mit einer Allelfrequenz von über 1% anzutreffen sind. Die in dieser Arbeit untersuchten Polymorphismen befinden sich in oder in der Nähe von Genen, deren Genprodukte vor allem über Herzrhythmusstörungen an der Pathophysiologie des plötzlichen Herztods beteiligt sind, oder beteiligt sein könnten.

1.4.1 *SCN5A*

SCN5A befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosom 3 (3p21) und kodiert für die α -Untereinheit des spannungsabhängigen Natriumkanals $\text{Na}_v1.5$, hauptsächlich im Kardiomyozyten (Camm et al. 2006). Dieses Protein ist für den schnellen Aufstrich des Aktionspotentials (i_{Na}) verantwortlich. Defekte in diesem Gen sind als Ursache des Brugada-Syndroms sowie des autosomal-dominant vererbten Long-QT-Syndroms vom Typ 3 (LQT3). Weiterhin ist das idiopathische ventrikuläre Flimmern, der plötzliche Kindstod sowie eine fehlerhafte Reizweiterleitung im Herzen damit assoziiert (Darbar et al. 2008). Außerdem wurden Assoziationen zwischen bestimmten Polymorphismen und Vorhofflimmern entdeckt (Pfeufer). Darunter ist der H558R Polymorphismus zu nennen, dessen SNP, rs1805124, in dieser Arbeit untersucht wurde (Chen et al. 2011). Bestimmte Genvarianten von *SCN5A* zeigen des weiteren phänotypische Assoziationen mit Verlängerung des QRS- und PR-Intervalls sowie Verkürzung des QT-Intervalls (Sotoodehnia et al. 2010).

1.4.2 Calsequestrin 2 (*CASQ2/CASQ2*)

CASQ2 befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 (1p23-21) (Camm et al. 2006). Es kodiert für das Protein Calsequestrin 2 im Herzmuskel. Bei Calsequestrin 2 handelt es sich

um ein kalziumbindendes Protein, das sich im sarkoplasmatischen Retikulum der Herzmuskelzelle und im Skelettmuskel vom langsamen Typ befindet und dort Kalzium für die Muskelaktivität speichert. Calsequestrin ist physisch und funktional an den Ryanodinrezeptor gebunden und an der Erregungs-Kontraktions-Kopplung der glatten Muskulatur beteiligt. Mutationen in diesem Gen führen zur Herzerkrankung der katecholaminergen polymorphen ventrikulären Tachykardie (CPVT). Assoziationen mit plötzlichem Herztod zeigten sich bei bestimmten Varianten (Westaway et al.).

1.4.3 β_1 -adrenerger Rezeptor (*ADRB1*)

ADRB1 kodiert für den adrenergen β_1 -Rezeptor, der zu einer Familie von regulatorischen Guanosin-Triphosphat(GTP)-bindenden Rezeptoren gehört, die die Effekte der Transmitter Norepinephrin und Epinephrin modulieren. Die Ser49Gly-Variante ist mit verstärkter agonistisch-induzierter Downregulation assoziiert (Brockmoller und Tzvetkov 2008, Cresci 2012). Andere Polymorphismen im Gen des Rezeptors sind am Herzversagen beteiligt. Eine weitere Variante, Arg389Gly, betrifft die Domäne des *ADRB1*, die das G-Protein bindet und darüber Veränderungen in der Aktivität der Adenylyzyklase bedingt.

1.4.4 β_2 -adrenerger Rezeptor (*ADRB2*)

Das intronlose *ADRB2* kodiert für den adrenergen β_2 -Rezeptor (Sotoodehnia et al. 2006). Dieser gehört zu einer Superfamilie aus an ein G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Er ist direkt mit einem L-Typ-Kalziumkanal assoziiert, den er auch effektiv beeinflusst. Es finden sich genetische Varianten, die mit einem erhöhten Risiko des plötzlichen Herztods vergesellschaftet sind, wie zum Beispiel Gln27Glu. Studienteilnehmer, die Homozygot für die Gln27-Variante sind, zeigen im Vergleich zu jenen Teilnehmern, die mindestens ein Glu27-Allel tragen, ein um 58%-64% erhöhtes Risiko, am plötzlichen Herztod zu versterben. Dabei zeigt diese Variante auch eine Assoziation mit hohen ungesättigten Blutfetten, welche wiederum mit erhöhtem Risiko, am plötzlichen Herztod zu sterben, assoziiert sind. Die Gly16Arg-Variante hingegen ist nicht mit einem erhöhten Risiko, am plötzlichen Herztod zu sterben, vergesellschaftet.

Eine andere Variante, Gly389Arg, offenbart ferner eine vierfach verstärkte agonistisch induzierte Signaltransduktion am G_s -Protein gegenüber dem Gly-Allel (Brockmoller und Tzvetkov 2008).

1.4.5 *KCNQ1*

KCNQ1 befindet sich auf Chromosom 11 und kodiert für das Protein KvLQT1/minK, einen spannungsabhängigen Kaliumkanal, der während des Aktionspotentials des Herzens in der Repolarisationsphase aktiv ist und langsam hyperpolarisierende Ströme (i_{Ks}) ermöglicht (Camm et al. 2006). Mutationen in diesem Gen finden sich beim Long-QT-Syndrom vom Typ 1 (LQT1) und auch beim Short-QT-Syndrom (Beckmann 2011).

1.4.6 *KCNH2*

KCNH2 kodiert für das Protein hERG, einen spannungsabhängigen Kaliumkanal, der in der Repolarisationsphase des Aktionspotentials am Kardiomyozyten hyperpolarisierende Ströme vom schnellen Typ (i_{Kr}) generiert. Bestimmte Polymorphismen in *KCNH2* zeigen Assoziationen mit kontinuierlicher Verlängerung der QT-Intervalldauer (Newton-Cheh et al. 2007). Defekte in diesem Gen können Ursache für das Long-QT-Syndrom vom Typ 2 (LQT2) sein und sind sogar für etwa 30% aller Long-QT-Syndrome verantwortlich. Minor-Allelträger der in dieser Arbeit untersuchten K897T-Variante (rs1805123) zeigen signifikant gehäuft kürzere QT-Intervalle (Gouas et al. 2005). Mutationen in *KCNH2* werden auch in Patienten mit Short-QT-Syndrom gefunden (Monteforte et al. 2012).

1.4.7 Histidin-rich calcium binding protein (*HRC*)

HRC besteht aus sechs Exons und befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom 19 (19q13.3) (Arvanitis et al. 2010). *HRC* kodiert für das *histidine-rich calcium binding protein* (HRC), einem Protein an der luminalen Seite des sarkoplasmatischen Retikulums, das eine regulatorische Funktion bei der Kalziumausschüttung vom sarkoplasmatischen Reticulum in das Zytosol erfüllt. Die Transkription von *HRC* ist gewebespezifisch und besonders

ausgeprägt in Herzmuskulatur und Skelettmuskulatur sowie, etwas weniger, in der glatten Muskulatur der Arteriolen.

Ein Polymorphismus im Gen, Ser96Ala, suggeriert eine Verbindung zwischen der Ser96-Variante und lebensbedrohlichen Herzrhythmusstörungen und plötzlichem Herztod bei Patienten mit idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie (Han et al. 2011).

1.4.8 Phospholamban (*PLN*)

PLN kodiert für das Protein Phospholamban, ein Protein, das in der Herzmuskelzelle als reversibler Inhibitor der SERCA fungiert (Wang et al. 2011). Im nicht-phosphorylierten Zustand zeigt sich Phospholamban hierbei inhibierend aktiv. Phosphorylierung des Phospholambans, wie sie im Rahmen β -adrenerger Stimulation vorkommt, beendet diese Inhibition. Die SERCA-Funktion verstärkt dann die Herzmuskelrelaxation und trägt zur β -adrenerg vermittelten Inotropie des Herzens bei. Defekte dieses Gens verursachen die erbliche dilatative Kardiomyopathie. Bestimmte Genvarianten von *PLN* zeigen Assoziationen mit Verlängerung des QRS- und QT-Intervalls (Sotoodehnia et al. 2010).

1.4.9 NO-Synthetase-1-Adaptorprotein (*NOS1AP*)

NOS1AP kodiert für das *Nitric oxide synthase 1 adaptor protein*, welches neben neuronalem Gewebe auch im Kardiomyozyten vorkommt, wobei in letzterem die spezifische Rolle des Proteins noch nicht verstanden ist. Allerdings haben sich Assoziationen zwischen häufigen *NOS1AP*-Varianten und Verlängerungen des QT-Intervalls sowie plötzlichem Herztod gezeigt (Westaway et al. 2011).

1.4.10 Ankyrin2 (*ANK2*)

ANK2 befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 4 und kodiert für das zytoskelettäre Adapterprotein Ankyrin-B, welches für die räumliche Anordnung von Ionenkanälen, Transportern und Signalmolekülen und darüber hinaus für deren Funktion von Bedeutung ist (Camm et al. 2006).

1.4.11 CACNA1C

CACNA1C befindet sich auf 12p13.3 und besteht aus 55 Exons. Das Transkriptionsprodukt unterliegt ausgeprägten alternativen Spleißvorgängen, welches zu den vielen verschiedenen Isoformen in unterschiedlichen Geweben führt (Gillis et al. 2011). Es kodiert für jene α -Untereinheit des L-Typ-Calciumkanals vom Typ $Ca_v1.2$, welche den Kanaltunnel formt. *Missense*-Mutationen in diesem Gen führen zu allen soweit dokumentierten Fällen von Long-QT-Syndromen vom Typ 8 (Camm et al. 2006). Weiterhin handelt es sich um das einzige Gen, welches für das Timothy-Syndrom verantwortlich zu sein scheint, einem Syndrom, das unter anderem zu Fehlbildungen des Bewegungsapparats, verlängertem QT-Intervall, ventrikulären Tachykardien, mentaler Retardierung und geringer Lebenserwartung führt (Gillis et al. 2011).

1.4.12 Ryanodin2-Rezeptor (RyR2)

RYR2 befindet sich auf 1q43 und kodiert für das Ryanodin-Rezeptorprotein 2 im kardialen sarkoplasmatischen Retikulum. RyR2-Mutationen sind mit ventrikulären Arrhythmien und plötzlichem Herztod assoziiert (Ran et al. 2010).

1.4.13 Calsequestrin 1 (CASQ1/CSQ1)

CASQ1, auch als *CSQ1* bezeichnet, ist ein Gen auf dem langen Arm des Chromosom 1, welches für das kardiomyozytäre und myozytäre Kalziumspeicherprotein Calsequestrin 1 kodiert. Es handelt sich dabei um eine Isoform von Calsequestrin 2. Mehrere Studien in unterschiedlichen Populationen zeigen Assoziationen zwischen Allelvarianten von SNPs in diesem Gen und Diabetes mellitus vom Typ 2 (Das et al. 2004, Fu et al. 2004).

1.5 Grund für Aufnahme in die Studie

Die untersuchten SNPs wurden anhand von Hinweisen in der Literatur auf Assoziationen mit pathologischen Auswirkungen auf das Herz gewählt. Manche SNPs wurden von Anderen ohne Literaturangabe ausgewählt. Tabelle 1 zeigt die analysierten SNPs und nennt nach Möglichkeit die SNP-Lokalisation, die in der Literatur angegebene *minor allele frequency* (MAF) sowie Gründe für die Aufnahme in die Studie.

Tabelle 1: Grund für Aufnahme

Gen	SNP	Loka- lisation	Grund für Aufnahme: Assoziation mit	Literaturangabe	MAF*
Gene der Kalziumhomöostase					
HRC	Ser96Ala		VA	(Arvanitis et al. 2008)	
PLN	rs11756438		QT-Intervalllänge	(Newton-Cheh 2009)	0,47
	rs11153768	6q22	LVDD	(Vasan et al. 2009)	0,469
	rs3734381				
	rs11153730	Intergen	QRS-Dauer, QT- Intervall	(Sotoodehnia et al. 2010)	0,491
	rs11970286	Intergen	QT-Zeit	(Pfeufer 2010)	0,491
	rs12210810		Modulation der QT- Intervalldauer	(Pfeufer 2010)	0,07
CSQ1	rs2275703	Intron 4	Typ-2-Diabetes	(Fu et al. 2004)	0,5
	rs617698	Intron 4	Typ-2-Diabetes	(Fu et al. 2004)	0,354
CSQ2	rs7536370	Intron	SCD	(Westaway et al. 2011)	0,342
	rs3010396	Intron	SCD	(Westaway et al. 2011)	0,455
CACNA1C	rs1051375		Ansprechen auf β - Blockertherapie	(Beitelshees et al. 2009)	

Gen	SNP	Loka- lisation	Grund für Aufnahme: Assoziation mit	Literaturangabe	MAF*
CACNA1C	rs1558322		SCD	(Westaway et al. 2011)	0,278
RYR2	rs3766871		Reduziertes SCD- Risiko	(Ran et al. 2010)	
	rs72549415				
	rs6678625		SCD	(Westaway et al. 2011)	0,149

Gene der kardialen β -adrenergen Stimulation

ADRB1	Ser49Gly		Vorhofflimmern	(Nicoulina et al. 2010)	
	Arg389Gly		Empfindlichkeit für Agonisten u. Antagonisten	(Leineweber und Heusch 2009)	
ADRB2	Gly16Arg		<i>Down-</i> Regulierung	(Leineweber und Heusch 2009)	
	Gln27Glu		<i>desensitizing</i>	(Leineweber und Heusch 2009)	

Gene der elektrischen Herzerregung

SCN5A	rs11710077	Intron 5	QRS-Dauer	(Sotoodehnia et al. 2010)	0,195
	rs1805124		evtl. modulierende Effekte durch Arrhythmie- verursachende Mutationen	(Gouas et al. 2005)	0,179
	rs3922844		QRS-Dauer PR-Intervall (African American)	(Sotoodehnia et al. 2010) (Smith et al. 2011)	0,2 0,41**
	rs7638909	Intron27	PR-Zeit	(Smith et al. 2009)	0,4

Gen	SNP	Loka- lisation	Grund für Aufnahme: Assoziation mit	Literaturangabe	MAF*
SCN5A	rs1805126	Exon 28	QT-Dauer	(Gouas et al. 2005)	0,317
	rs11129795	Intergen	QT-Zeit, LQT3, Brugada- syndrom	(Pfeufer 2010)	0,248
KCNH2	rs3807375	Intron 2	QT-Intervall	(Newton-Cheh et al. 2007)	0,376
	rs1805123	Lys897Thy, Exon11	QT-Intervall	(Newton-Cheh et al. 2007)	0,239
	rs2968863	Downstream	QT-Intervall	(Pfeufer 2010)	0,229
	rs3815459	Intron 13	Verlängerung des QT-Intervall	(Pfeufer 2010)	0,5
KCNQ1	rs2237892	Exon	increased risk of SCD	(Westaway et al. 2011)	0,376
	rs12296050	Intron 1	QT- Intervalldauer	(Pfeufer 2010)	0,186
	rs757092	Intron 1		(Pfeufer 2010)	0,179

Gene von Strukturproteinen des kardialen Kontraktionsapparates

ANK2	rs2107026		SCD	(Westaway et al. 2011)	0,158
NOS1AP	rs10918859		SCD	(Westaway et al. 2011)	0,194
	rs12084280		SCD	(Westaway et al. 2011)	0,11

*MAF aus der angegebenen Literatur

**in Afroamerikanern

1.6 Fragestellung und Aufgabenstellung

Diese Arbeit sollte zur Klärung der Frage beitragen, welche Rolle genetische Polymorphismen für das Auftreten von lebensbedrohlichen Herzrhythmusstörungen bei Patienten mit implantiertem Kardioverter-Defibrillator (ICD) spielen. Medizinische Konsequenzen dieses Projektes könnten sein, dass man in Zukunft bei der Entscheidung, ob ein Patient einen ICD benötigt oder nicht, auch Genvarianten berücksichtigen würde.

Bei der Auswahl der untersuchten Gene hat man sich hauptsächlich auf Gene konzentriert, die eine Bedeutung in der Kalziumregulation und der Elektrophysiologie des Kardiomyozyten haben. Aus anderen Funktionssystemen wurden nur wenige Gene untersucht. Es wurden spezielle elektrophysiologische Parameter mit Prädiktionsfähigkeit für den plötzlichen Herztod erhoben, da noch keine finalen Daten zum Auftreten für den plötzlichen Herztod verantwortlicher Herzrhythmusstörungen, bei den in dieser Arbeit genotypisierten Patienten vorliegen.

Spezifisch sollte folgende Frage geklärt werden: Gibt es eine Häufung bestimmter Genvarianten bei Patienten mit lebensbedrohlichen Herzrhythmusstörungen?

Aufgabenstellung dieser Arbeit ist es an der Selektion der Polymorphismen mitzuwirken, die molekularbiologischen Analysen zu etablieren, durchzuführen und auszuwerten. Die Ergebnisse sollen zusammen mit statistischen Analysen der anthropometrischen, klinischen und elektrophysiologischen Daten interpretiert werden. Die Selektion und Untersuchung des Patientenkollektivs wurde durch ärztliche und nichtärztliche Mitarbeiter in mehreren europäischen Klinikzentren im Rahmen der EUTrigTreat-Studie durchgeführt. Die hierbei erhobenen Daten wurden von Herrn PD Dr. Klaus Jung vom Institut für Medizinische Statistik der Universitätsmedizin Göttingen statistisch analysiert.

2 Material und Methoden

2.1 Klinische Studie

Diese Arbeit geschah im Rahmen der klinischen Studie EUTrigTreat, die auf eine verbesserte Risikostratifizierung für jene Patienten, für die eine ICD-Implantation evaluiert werden muss, abzielt (Seegers et al. 2011).

Bei der EUTrigTreat-Studie handelt es sich um eine prospektive Kohortenstudie zur Risikostratifizierung von ICD-Trägern hinsichtlich der Sterblichkeit jeder Ursache sowie durch Schockabgaben durch den ICD (Seegers et al. 2011). Der primäre Studienendpunkt wird mit dem Tod aus jeder Ursache innerhalb des *follow-ups* von durchschnittlich etwa 2,8 Jahren definiert. Die sekundären Studienendpunkte sind: plötzlicher Herztod, Herztod, nicht-herzbedingter Tod, indizierte und nicht-indizierte ICD-Schocks sowie die Kombination aus indiziertem Schock und Tod jeder Ursache. Es wurden 1000 Patienten in 5 akademischen Klinikzentren Europas rekrutiert, von denen 250 Patienten in dieser Arbeit untersucht wurden. Unter diesen Patienten waren solche, bei denen eine ICD-Implantation oder ein ICD-Austausch indiziert waren und solche, die dauerhaft und seit mindestens drei Monaten einen ICD trugen und ambulant überwacht wurden. Alle Patienten wurden nicht-invasiv untersucht und dabei unter anderem spezielle elektrophysiologische, zur Risikostratifizierung des plötzlichen Herztods relevante Parameter erhoben.

Bei diesen speziellen elektrophysiologischen Parametern handelte es sich um Parameter des T-Wellen Alternans (TWA), der Herzfrequenzvariabilität (HRV) und der Herzfrequenz-turbulenz (HRT), welche abnorme Repolarisationen sowie abnorme vegetative Regulationen am Herzen evaluieren.

Die ATRAMI-Studie kommt zu dem Schluss, dass die Barorezeptorsensitivität (BRS), zusammen betrachtet mit der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF), bei Postinfarktpatienten ≤ 65 Jahre ein stärkerer Marker für den plötzlichen Herztod ist, als die Herzfrequenzvariabilität (La Rovere et al. 1998). Das hier untersuchte Patientenkollektiv war im Durchschnitt 62 Jahre alt. Dennoch wurde hier nicht die Barorezeptorsensitivität

evaluiert, sondern Herzfrequenzvariabilität und Herzfrequenzvariabilität als Ersatz für Parameter des autonomen Tonus gewählt, da der Test zur Barorezeptorsensitivität die intravenöse Gabe eines blutdruckerhöhenden Noradrenalinderivats erfordert und hier nicht-invasiv zu erhebbende Parameter gewünscht waren. Patienten, die einen ICD *de novo* implantiert bekamen, oder bei denen das Gerät ausgewechselt wurde, wurden in der EUTrigTreat-Studie zusätzlich invasiv elektrophysiologisch untersucht. In dieser Arbeit wurden die elektrophysiologischen Parameter dieser invasiven Untersuchung jedoch nicht betrachtet.

Zum Zeitpunkt dieser Arbeit liegen keine finalen Daten zu klinischen Ergebnissen der ICD-Therapien vor. Somit wurden hier keine Assoziationen zwischen Allelvarianten und dem manifesten Auftreten für den plötzlichen Herztod verantwortlicher Herzrhythmusstörungen, oder der Gesamtmortalität bei ICD-Trägern untersucht. Anstelle klinischer Ergebnisse wurden spezielle elektrophysiologische Parameter mit Prädiktionsfähigkeit für den plötzlichen Herztod verwendet und das so ermittelte Risikoprofil mit Allelvarianten verglichen. Bei diesen Allelvarianten handelte es sich hauptsächlich um genetische Polymorphismen in den Genen kardialer Proteine des Kalziummetabolismus, kardialer Ionenkanäle sowie Strukturproteine. Hierfür wurden 12 Gene zur Analyse von Polymorphismen ausgewählt. Es wurden aus isolierter DNA von jeweils 250 ICD-Trägern Varianten in 35 *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) bestimmt. Bei zwei weiteren Polymorphismen, Ser49Gly auf *ADRB1* und rs1558322 auf *CACNA1C*, gelang die Feststellung des Genotyps bei 249 Probanden, sodass insgesamt 37 Polymorphismen genotypisiert wurden.

2.1.1 Elektrophysiologische Untersuchungen

In den elektrophysiologischen Untersuchungen wurden insbesondere solche Parameter erhoben, die sich als nützliche positiv-prädiktive Marker für Herzrhythmusstörungen erwiesen haben. Tabelle 2 zeigt die klinischen und elektrophysiologischen Parameter, für die in dieser Arbeit zu prüfen ist, ob sie von genetischen Varianten wesentlich beeinflusst werden. Weiterhin sind die erhobenen anthropometrischen Parameter aufgeführt.

Tabelle 2: Anthropometrische, klinische und elektrophysiologische Parameter. Dargestellt sind die erhobenen anthropometrischen Parameter sowie klinische und elektrophysiologische Parameter mit kurzen Definitionen nach Löllgen 1999, Zehender 1999, Yi et al. 2000, Bloomfield et al. 2002, Hoppe et al. 2005, Strümpell 2007, Friedlbinder 2008, Arastéh et al. 2009, Zuern et al. 2011, Barthel et al. 2003, Katritsis und Camm 2004.

Anthropometrische, klinische und elektrophysiologische Parameter

Einbezogene Risikofaktoren für die möglich und hier zu prüfen ist, ob sie von den Genvarianten abhängig sein könnten

NYHA-Klasse	Schweregradeinteilung der Herzinsuffizienz von I bis IV nach der New York Heart Association (NYHA). *
I	Herzerkrankung ohne körperliche Limitation. Alltägliche körperliche Belastung verursacht keine inadäquate Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina pectoris.
I-II	Patienten mit nur leichten Beschwerden bei NYHA II.
II	Herzerkrankung mit leichter Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit. Keine Beschwerden in Ruhe. Alltägliche körperliche Belastung verursacht Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina pectoris.
II-III	Patienten mit starken Beschwerden bei NYHA II.

Einbezogene Risikofaktoren für die möglich und hier zu prüfen ist, ob sie von den Genvarianten abhängig sein könnten

NYHA-Klasse

III Herzerkrankung mit höhergradiger Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit bei gewohnter Tätigkeit. Keine Beschwerden in Ruhe. Geringe körperliche Belastung verursacht Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina pectoris.

LVEF (%) Linksventrikuläre Ejektionsfraktion.

Nt-proBNP (ng/l) Herzinsuffizienzbiomarker.

TWA onset HF (Schläge pro Minute) Onset-Herzfrequenz, bei der ein Daueralternans auftritt.

TWA-Amplitude in VM (μV) Maximale Amplitude in der Ableitung Vektor Magnitude (VM), wenn TWA-Test positiv ausgefallen war.

TWA max. Amplitude (μV) Maximale Amplitude in einer beliebigen Ableitung außer VM, wenn der TWA-Test positiv ausgefallen war.

TWA max. neg. HF (Schläge pro Minute) Maximale negative Herzfrequenz im T-Wellen-Alternans-Test.

Einbezogene Risikofaktoren für die möglich und hier zu prüfen ist, ob sie von den Genvarianten abhängig sein könnten

<p>TWA-Klassifikation <i>negativ</i> <i>positiv</i> <i>unbestimmt</i></p>	<p>Beurteilung ob T-Wellen Alternans negativ, bzw. normal, unbestimmt oder positiv ist.</p>
<p>Ventrikuläre Extrasystolen 24 h</p>	<p>Zahl der ventrikulären Extrasystolen im Langzeit-EKG über 24 Stunden.</p>
<p>NSVT 24 h</p>	<p>Zahl der nicht-anhaltenden ventrikulären Tachykardien im Langzeit-EKG über 24 Stunden. Diese sind definiert als drei oder mehr aufeinanderfolgende Herzschläge bei einer Herzfrequenz von über 100 Schlägen pro Minute mit weniger als 30 Sekunden Dauer. Die elektrische Erregung dieser Schläge entsteht dabei definitionsgemäß distal des AV-Knotens.</p>
<p>SDRR (ms)</p>	<p>Standardabweichung aller RR-Intervalle im Langzeit-EKG zur Charakterisierung der Herzfrequenzvariabilität.</p>
<p>RMSSD (ms)</p>	<p>Quadratischer Mittelwert der Differenzen aufeinanderfolgender RR-Intervalle zur Charakterisierung der Herzfrequenzvariabilität.</p>

Einbezogene Risikofaktoren für die möglich und hier zu prüfen ist, ob sie von den Genvarianten abhängig sein könnten

HRT onset (%)	Im Langzeit-EKG erhobener Parameter zur Herzfrequenzvariabilität über die Beschleunigung der Sinusrhythmusfrequenz nach einer Extrasystole.
HRT slope (ms/RR)	Im Langzeit-EKG erhobener Parameter zur Herzfrequenzvariabilität über die Verlangsamung der Sinusrhythmusfrequenz nach dem <i>turbulence onset</i> .
HRT-Kategorie <i>TO+TS normal</i> <i>TO oder TS abnormal</i> <i>TO+TS abnormal</i>	Einteilung der Herzfrequenz-turbulenz im Langezeit-EKG über 24 Stunden anhand des <i>turbulence onset</i> (TO) und des <i>turbulence slope</i> (TS) in drei Kategorien. Kategorie 0 entspricht dabei dem physiologischen Zustand mit normalem TO und TS. Kategorie 1 wird mit einem abnormalen TO oder TS definiert und ist unphysiologisch. Kategorie 3 ist mit abnormalem TO und TS am gravierendsten.
AC (ms)	Akzelerationskapazität im Langzeit-EKG über 24 Stunden.
DC (ms)	Dezelerationskapazität im Langzeit-EKG über 24 Stunden.

Einbezogene Risikofaktoren für die möglich und hier zu prüfen ist, ob sie von den Genvarianten abhängig sein könnten

VT-Induzierbarkeit	Induzierbarkeit ventrikulärer Tachykardien in der nicht-invasiven elektrophysiologischen Ventrikelstimulation.
<i>Nein</i>	
<i>Ja</i>	
Induzierte Tachykardie	Art der induzierten tachykarden Rhythmusstörung, falls eine solche in der nicht-invasiven elektrophysiologischen Untersuchung induziert werden konnte.
<i>Kammerflimmern</i>	
<i>Monomorphe VT</i>	
<i>Polymorphe VT</i>	
cQT-Zeit	nach Bazett frequenzkorrigierte QT-Zeit
Herzfrequenz in Ruhe	(Schläge/min)

Einbezogene Risikofaktoren, für die unwahrscheinlich ist, dass sie von den Genvarianten determiniert werden

Alter	
Geschlecht	
Ethnie	
Body mass index (BMI)	(kg/m ²)

*In dieser Arbeit wurde mit NYHA-Zwischenstufen gearbeitet, da Zwischenstufen häufig vorkommen und so eine bessere quantitative Abstufung möglich ist.

2.1.1.1 Nicht-invasive Risikostratifikation mittels 24-Stunden-EKG

Die hier untersuchten Langzeit-Elektrokardiogramme (Langzeit-EKGs) wurden bei Aufnahme in die Studie über 24 Stunden aufgezeichnet. Solche über 24 Stunden aufgezeichneten EKGs werden im angloamerikanischen Raum als Holter-EKG bezeichnet. Weitere Aufzeichnungen erfolgten nach 6 und 12 Monaten sowie anschließend jährlich bis zum Studienende im September 2014. Die Untersuchungen wurden mit den herkömmlichen, den Standards

entsprechenden EKG-Geräten der jeweiligen Klinik bzw. Ambulanz durchgeführt. Die EKG-Geräte wurden im Hinblick auf ventrikuläre Extrasystolen und vorübergehende ventrikuläre Tachykardien (*non-sustained ventricular tachycardia*, NSVT) abgefragt. Bei letzterem wurde auch die Art der ventrikulären Tachykardie bestimmt. Des Weiteren wurden Parameter der Herzfrequenzvariabilität und der Herzfrequenz-turbulenz ermittelt.

2.1.1.1.1 T-Wellen Alternans im Mikrovoltbereich (MTWA)

Beim T-Wellen-Alternans (TWA) handelt es sich um von Herzschlag zu Herzschlag alternierende morphologische Veränderungen der T-Welle im 12-Kanal-EKG (Zehender 1999). Der TWA wurde im 12-Kanal-EKG und mit den orthogonalen Ableitungen nach Frank gemessen. Die EKG-Daten wurden computergestützt durch das Cambridge Heart System® aufbereitet, sodass der TWA anhand der Amplitude sowie der Herzfrequenzen, bei denen er auftritt, charakterisiert werden konnte. Bei der Untersuchung wurden die Probanden bei leichter Fahrradergometrie unter steigender körperlicher Leistung in zwei Stufen bis zu einer maximalen Herzfrequenz von 119 Schlägen pro Minute belastet. Dabei musste der Proband zur Verringerung von Störsignalen die Arme locker hängen lassen. Für das EKG wurden an den orthogonalen Ableitungen X, Y und Z nach Frank sowie an den thorakalen Ableitungen V4 und V6 spezielle Multisegment-Elektroden verwendet, die durch eine hohe Abschirmung eine artefaktfreie Aufzeichnung des EKGs erleichtern (Frank 1956). Die Ableitung Vektor Magnitude ist eine Summation der X-Y-Z-Vektoren und stellt eine Einkanal-Ableitung des globalen Herzens dar. An den übrigen Stellen der standardgemäßen 12-Kanal-EKG-Ableitung wurden herkömmliche Elektroden verwendet. Die Hautstellen, an denen die Elektroden aufgetragen wurden, wurden zur Herabsetzung des Störpegels gereinigt und gegebenenfalls rasiert.

Der TWA kann manchmal visuell im 12-Kanal-Oberflächen-EKG erkannt werden, jedoch lassen sich andere verborgene TWA erst im Mikrovoltbereich aufgezeichnet darstellen. Die Berechnung des TWA erfolgt mit der Methode der Spektralanalyse, die Auswertung wurde computergestützt mit dem Cambridge Heart System® durchgeführt und doppelblind von zwei Experten nach Bloomfield et al. klassifiziert. Mit der Methode der Spektralanalyse wurde ermittelt, ob ein TWA vorliegt. Dazu werden im EKG 128 konsekutive Herzschläge zur

Auswertung herangezogen. Zunächst wird ein konstanter Zeitabstand der T-Welle zum QRS-Komplex festgelegt. In diesem zeitlichen Abstand vom QRS-Komplex wird die Amplitude des EKG in μV bestimmt. Die gemessenen T-Wellen-Amplituden werden gegen eine fortlaufende Nummerierung der Herzschläge aufgetragen, sodass sich eine Gesamtdarstellung aller T-Wellen-Amplituden ergibt. Mittels Fast-Fourier-Transformation (FFT) lässt sich aus der Gesamtdarstellung ein Frequenzspektrum errechnen. In diesem Spektrum lassen sich die Frequenzen, die im Messsignal enthalten sind, ablesen. Da ein TWA typischerweise bei jedem zweiten Schlag auftritt, muss dieser eine charakteristische Frequenz bei 0,5 Zyklen pro Herzschlag besitzen und sich so von anderen Frequenzen, die zum Beispiel von periodischer Atmung oder periodischem Treten des Probanden in die Pedale des Fahrradergometers herrühren, abgrenzen lassen.

Unter physiologischen Bedingungen kommt es bei kardialer Belastung zu Repolarisationsveränderungen, die allerdings über das Herz synchronisiert sind. Man spricht von konkordantem Alternans. Bei weiterer Steigerung der Herzfrequenz, beispielsweise wie hier durch körperliche Arbeit induziert, werden diese Veränderungen in der myokardialen Repolarisation zunehmend asynchron, was als diskordanter Alternans bezeichnet wird. Beide Formen kommen am erkrankten Herzen bei deutlich geringeren Herzfrequenzen vor, als unter physiologischen Bedingungen. Auf zellulärer Ebene ist der TWA ein Ausdruck von Veränderungen der myokardialen Repolarisation und elektrischer Instabilität (Arvanitis et al. 2010). Hier mag eine gestörte Kalziumhomöostase im Kardiomyozyten eine Rolle spielen. So wird das Auftreten eines TWA zum Beispiel bei geringeren Ryanodinkonzentrationen, im Bereich nmol/l vereinfacht, im Bereich $\mu\text{mol/l}$ eher unterdrückt.

Das Auftreten eines T-Wellen-Alternans im Mikrovoltbereich gilt als Vorläufer für das Auftreten von lebensbedrohlichen Herzrhythmusstörungen sowie dem plötzlichen Herztod und ist darüber hinaus mit Herzinsuffizienz und elektrophysiologischen Herzerkrankungen assoziiert (Arvanitis et al. 2010, Bao et al. 2007). Patienten, die positiv getestet werden, profitieren mit höherer Wahrscheinlichkeit mehr von einer ICD-Therapie als solche, die negativ getestet werden (Chow et al. 2007).

Zur Klassifizierung werden dabei folgende Begriffe herangezogen:

- **Daueralternans:** TWA der bei Herzfrequenzen beständig ist, die über der patientenspezifischen Onset-Herzfrequenz liegt.
- **Onset Herzfrequenz:** Herzfrequenz oberhalb der die Kriterien für einen positiven Alternans ununterbrochen erfüllt sind.
- **Maximale Herzfrequenz :** Hierbei handelt es sich um die höchste Intervall-Herzfrequenz. Die Intervall-Herzfrequenz ist dabei die niedrigste Herzfrequenz, die in einem unspezifischen Intervall von einer Minute Dauer gemessen wird.
- **Maximale negative Herzfrequenz:** Dieser Wert gibt die höchste Herzfrequenz an, bei der noch kein positiver TWA auftritt.
- **Positiver TWA:** Ein positiver TWA ist als ein Daueralternans definiert, der mit einer Onset-Herzfrequenz von weniger oder gleich 110 Schlägen pro Minute oder der bei Ruhefrequenzen auftritt.
- **Negativer TWA:** Ein negativer TWA erfüllt nicht die Kriterien des positiven TWA und besitzt eine maximale negative Herzfrequenz von größer oder gleich 105 Schlägen pro Minute.
- **Unbestimmter TWA:** Dies bezeichnet einen Test, der nicht eindeutig als positiv und nicht eindeutig als negativ klassifiziert werden kann.

2.1.1.1.2 Nicht-anhaltende ventrikuläre Tachykardien (Non-sustained ventricular Tachycardia, NSVT)

Nicht-anhaltende ventrikuläre Tachykardien (NSVTs), sind definiert als drei oder mehr aufeinanderfolgende Herzschläge mit Erregungsursprung distal des Atrioventrikularknotens (AV-Knotens) bei einer Herzfrequenz von über 100 Schlägen pro Minute für eine Dauer von weniger als 30 Sekunden (Katraxis et al. 2012).

NSVTs treten sowohl beim Herzgesunden als auch beim scheinbar Herzgesunden und dem gesichert Herzkranken auf. Bei vielen Herzerkrankungen, u.a. bei den Häufigsten Ionenkanalerkrankungen und nach Nicht-ST-Hebungsinfarkt (NSTEMI), besitzt ihr Auftreten eine prognostische Signifikanz hinsichtlich beständiger ventrikulärer Tachykardien und dem plötzlichen Herztod. Bei anderen Herzerkrankungen hingegen, wie beispielsweise bei

Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie, ist eine prognostische Signifikanz nicht gesichert. Auch beim scheinbar Herzgesunden wird das Auftreten von NSVTs beobachtet, wobei es bei Sportlern unter gewissen Umständen als gutartig angesehen wird. Bei Anderen jedoch kann ihr Auftreten unter körperlicher Belastung oder in der Erholungsphase danach, jedoch Ausdruck einer verborgenen zugrundeliegenden Pathologie sein, die zur erhöhten kardiovaskulären Sterblichkeit innerhalb der nächsten Lebensdekade führt.

Medikamente wie Adenosin oder Verapamil, die den intrazellulären Ca^{2+} -Level senken, können auf NSVTs wirken, sodass der zugrunde liegende Mechanismus der NSVT-Entstehung möglicherweise in einer gestörten kardiomyozytären Kalziumhomöostase mit späten Nachdepolarisationen liegen kann. Ob aber NSVTs selbst lebensgefährliche Herzrhythmusstörungen provozieren, oder ob sie lediglich Surrogatmarker einer zugrundeliegenden Herzerkrankung sind, die zum plötzlichen Herztod führt, ist im klinischen Umfeld meist nicht sicher zu differenzieren.

2.1.1.1.3 Herzfrequenzvariabilität (HRV)

Die Herzfrequenzvariabilität stellt Schwankungen in der Herzfrequenz von Herzschlag zu Herzschlag dar (Löllgen 1999). Wie auch die Herzturbulenz, hängt sie von vagalen Effekten ab (Lombardi und Stein 2011). Die Herzfrequenzvariabilität kann Hinweise auf eine etwaige erhöhte Sympathikusaktivierung mit einer damit einhergehenden reduzierten vagalen Stimulation aufdecken. Über Wirkung auf den Sinusknoten kann es dabei zu lebensbedrohlichen elektrophysiologischen Instabilitäten am Herzen kommen.

Die Herzfrequenzvariabilität ist ein positiv-prädiktiver Wert für den plötzlichen Herztod nach Myokardinfarkt und hat sich in der nicht-invasiven Risikostratifizierung des plötzlichen Herztods etabliert (Kleiger et al. 1987). Zur Ermittlung der Herzfrequenzvariabilität wurden in dieser Arbeit im Langzeit-EKG über 24 Stunden die Standardabweichungen aller RR-Intervalle (SDRR) und der quadratische Mittelwert der Differenzen aufeinanderfolgender RR-Intervalle (RMSSD) errechnet. Dabei werden SDRR-Werte von >100 ms als günstig und von <50 ms als ungünstig betrachtet. Der RMSSD-Wert gilt bei unter 20 ms als pathologisch.

2.1.1.1.4 Herzfrequenz-turbulenz (HRT)

Die Herzfrequenz-turbulenz wurde in dieser Arbeit im Langzeit-EKG über 24 Stunden ermittelt. Es handelt sich dabei um kurzweilige physiologische, über den Baro-Rezeptorreflex vermittelte Fluktuationen in der Zykluslänge der Herzerregung, die spontan nach verfrühten ventrikulären Komplexen auftreten (Zuern et al. 2011). Das Fehlen der Herzfrequenz-turbulenz ist mit einer signifikant erhöhten Sterblichkeit assoziiert (Schmidt et al. 1999).

Kommt es zu einer ventrikulären Extrasystole, so schließt sich eine kompensatorische Pause an, in der die vom Sinusknoten ausgehende Erregung auf refraktäre Herzmuskelfasern trifft und so nicht wirksam wird (Friedlbinder 2008). Schmidt et al. gingen davon aus, dass der arterielle Blutdruckabfall nach kompensatorischer Pause eine physiologische Gegenregulierung durch das autonome Nervensystem bedingt, bei der die Herzfrequenz barorezeptorvermittelt beschleunigt wird. Die Herzfrequenz-turbulenz würde sich demnach aus dieser ersten Phase der Akzeleration der Herzfrequenz und aus einer zweiten Phase der Dezeleration der Herzfrequenz zusammensetzen. Jedoch zeigte sich diese Erklärung aufgrund der sehr kurzen Zeit nach der die Herzfrequenz-turbulenz im Vergleich zum Blutdruckabfall auftritt, als unzureichend (Lombardi und Stein 2011). Schließlich wurde später die Hypothese aufgestellt, dass nach der kompensatorischen Pause die ventrikuläre Füllung und konsekutiv der arterielle Blutdruck überschießend ansteigt. Dadurch würde es zur Dezeleration der Herzfrequenz aufgrund eines Zusammenspiels zwischen sympathischen und vagalen Einflusses auf den Herzrhythmus kommen. Die genauen zugrundeliegenden Ursachen und Vorgänge sind jedoch nicht ausreichend verstanden.

Zur Quantifizierung der Akzeleration bzw. der Dezeleration werden die Akzelerations- und die Dezelerationskapazität eingeführt (Bauer et al. 2006). Die Berechnung der Akzelerations- und Dezelerationskapazität geschieht aus EKG-Langzeitmessungen (Holter-EKG). Dazu wird die Methode des PRSA (phaserektifiziert signal averaging) angewendet. Dabei werden in den RR-Intervallen Ankerpunkte der PRSA-Methode markiert. Alle RR-Intervalle, die kürzer als das vorausgehende RR-Intervall sind, werden zu Ankerpunkten für die Bestimmung der Akzelerationskapazität. Zu Ankerpunkten der Bestimmung der Dezelerationskapazität werden alle RR-Intervalle, die länger als das vorausgehende RR-

Intervall sind. Es werden die Mittelwerte $X(0)$ der Ankerpunkte für den Fall der Akzelerationskapazität und für den Fall der Dezelerationskapazität berechnet. Zusätzlich werden auch die Mittelwerte $X(1)$ der RR-Intervalle gebildet, die unmittelbar auf die Ankerpunkte folgen. Ebenso werden die Mittelwerte $X(-1)$ der RR-Intervalle, die den Ankerpunkten unmittelbar vorausgehen und die Mittelwerte $X(-2)$ der RR-Intervalle, die den Ankerpunkten um zwei RR-Intervalle vorausgehen, gebildet. Die Akzelerationskapazität (AC) bzw. Dezelerationskapazität (DC) wird dann mit der Formel $AC(DC) = [X(0) + X(1) - X(-1) - X(-2)]/4$ berechnet.

Anhand der Dezelerationskapazität (DC) lässt sich das Risiko für kardiale Ereignisse klassifizieren. Dabei geht man bei Werten $\leq 2,5$ ms von einem hohen, bei Werten von 2,6 bis 4,5 ms von einem intermediären, und bei Werten $\geq 4,6$ ms von einem niedrigen Risiko aus (Bauer et al. 2006). Zwar wurde in der Literatur schon berichtet, dass die Dezelerationskapazität ein starker Risikomarker für kardiale Ereignisse ist- sogar noch stärker als die etablierte LVEF-, jedoch konnte für die Akzelerationskapazität bisher noch keine bemerkenswerte Aussagekraft ermittelt werden.

Schmidt et al. haben im Zusammenhang mit der Herzfrequenz-turbulenz zwei weitere Parameter, *turbulence onset* (TO) und *turbulence slope* (TS), definiert (Schmidt et al. 1999). Sie charakterisieren die Änderung der Sinusrhythmusfrequenz direkt nach einer stattgefundenen Extrasystole. Die normalerweise zunächst auftretende Beschleunigung der Sinusrhythmusfrequenz wird als *turbulence onset* (TO) festgehalten. Dieser ist definiert als die Differenz zwischen dem Mittelwert der ersten beiden RR-Intervalle nach der Extrasystole und dem Mittelwert der letzten beiden RR-Intervalle im Sinusrhythmus vor Extrasystole geteilt durch den Mittelwert dieser beiden letzten RR-Intervalle im Sinusrhythmus vor der Extrasystole. Ein positiver *turbulence onset* tritt bei einer Entschleunigung des Sinusrhythmus nach stattgehabter Extrasystole auf. Ein negativer *turbulence onset* entsteht bei Beschleunigung des Sinusrhythmus nach stattgehabter Extrasystole. Da eine solche Beschleunigung des Sinusrhythmus nach Extrasystole physiologisch ist, wird ein *turbulence onset* von ≥ 0 als abnormal definiert.

Zur Berechnung des *turbulence slope* (TS) werden die 20 RR-Intervalle im Sinusrhythmus nach einer stattgehabten Extrasystole als Funktion der Zahl der Herzschläge nach der Extrasystole aufgetragen. Es wird jeweils an fünf aufeinanderfolgende RR-Intervalle eine lineare Regressionsgerade angepasst. Dies ist 16-mal innerhalb der 20 RR-Intervalle nach der Extrasystole möglich. Der *turbulence slope* (TS) ist nun die Steigung der Regressionsgeraden mit der größten positiven Steigung aller 16 Regressionsgeraden. Der *turbulence slope* wird in Millisekunden angegeben. Werte von $\leq 2,5$ ms gelten als abnormal.

Nach Barthel et al. werden drei Kategorien der Herzfrequenz-turbulenz unterschieden (Barthel et al. 2003). Bei Kategorie 0 sind TO und TS normal und in der Kategorie 1 sind entweder der TO oder der TS abnormal. Sind sowohl TO als auch TS abnormal, handelt es sich um Kategorie 2. Für Patienten der Kategorie 2 mit einer linksventrikulären Ejektionsfraktion von weniger oder gleich 30% ergibt sich eine fast 40%ige 2-Jahres-Mortalität.

2.1.1.2 Nicht-invasive elektrophysiologische Untersuchung mittels ICD

Die nicht-invasive elektrophysiologische Untersuchung beinhaltet die ICD-getriggerte elektrische Erregung des Myokards. Hierzu steuert ein externes Abfragegerät, der ICD-Programmer, per Übertragung den implantierten ICD an. Es werden dann mit einer programmierten Stimulation nach verkürztem Ann Arbor-Protokoll die Induzierbarkeit von ventrikulären Arrhythmien getestet (Seegers et al. 2011). In der Elektrode im Apex des rechten Ventrikel wurden dabei drei Extrastimuli ausgelöst und aufgezeichnet, ob anhaltende ventrikuläre Arrhythmien auftraten (VT-Induzierbarkeit). Die stimulierenden monophasischen Aktionspotentiale (MAP) wurden dabei nicht aufgezeichnet. Es wurde differenziert, ob es sich bei den auftretenden Arrhythmien um monomorphe oder polymorphe Tachykardien oder Kammerflimmern handelte. Der Parameter *TWA onset HF* beschreibt die maximal negative Frequenz, bei der in dieser Untersuchung ein T-Wellen Alternans auftrat. Weiterhin wurde die maximale TWA-Amplitude in der Ableitung Vektor Magnitude (TWA-Amplitude in VM) sowie in einer anderen beliebigen Brustwandableitung (TWA max. Amplitude) gemessen. Der T-Wellen Alternans wurde dabei als negativ, positiv oder unbestimmt klassifiziert (TWA-Klassifikation negativ/positiv/unbestimmt).

2.1.1.3 N-terminal pro-brain natriuretic protein (NT-proBNP)

Beim N-terminalen pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) handelt es sich um einen Laborparameter, der im Blutserum mittels Immunoassay gemessen wird. Die Laboruntersuchungen wurden von den jeweiligen Laboren der Kliniken, in denen die Patienten untersucht wurden, durchgeführt.

NT-proBNP ist das enzymatische Spaltprodukt des Vorläuferproteins für BNP, dem proBNP (Luchner et al. 2003). Das Neurohormon BNP wird von den atrialen Myozyten nach Dehnung ausgeschüttet, zum Beispiel bei intrakavitärer Volumenzunahme im Rahmen von Herzinsuffizienz (Schmidt et al. 2007). Bei hämodynamischer Überlastung wird das Hormon zusätzlich und maßgeblich von ventrikulären Kardiomyozyten sezerniert. Dazu wird das Vorläuferprotein proBNP in einen aktiven Teil, das BNP und in einen inaktiven Teil am N-Terminus, dem NT-proBNP, gespalten. NT-pro-BNP eignet sich besser als Biomarker für Herzinsuffizienz als BNP, da es weniger rasch metabolisiert wird. Der Wert ist stark altersabhängig, so sind ab 45 Jahren für Männer Werte von bis zu 65 ng/l, bei Frauen bis zu 130 ng/l im Referenzbereich (Arastéh et al. 2009). Ab 75 Jahren gelten für Männer Werte bis 278 ng/l und für Frauen bis 303 ng/l als normwertig. Weitere wichtige Einflussgrößen sind, neben dem Alter, die kardiale Auswurfraction, die linksventrikuläre Masse, die Größe des rechten Vorhofs, Alter, Geschlecht und die Nierenfunktion (Luchner et al. 2003).

NT-proBNP ist ein vielversprechender Biomarker zur Bewertung und Detektion linksventrikulärer Dysfunktionen, wie sie im Rahmen der Herzinsuffizienz gegeben sind (Luchner et al. 2003).

2.2 Molekulargenetische Laboranalysen

2.2.1 Materialien

2.2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterialien	Lieferant/Hersteller
Adhesive PCR Sealing Sheets	Thermo Scientific (Epsom, UK)
Pipettenspitzen, steril (200 µl)	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipettenspitzen, steril (10 µl)	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipettenspitzen, steril (1000 µl)	Sarstedt (Nümbrecht)
Multipipettenspitzen, steril 0,1 ml	Eppendorf (Hamburg)
Multipipettenspitzen, steril 1 ml	Eppendorf (Hamburg)
Multipipettenspitzen, steril 0,5 ml	Eppendorf (Hamburg)
384-Well-Platten	4titude (Wotton, UK)
96-Well-Platten	Thermo Scientific (Epsom, UK)
8er Kettendeckel (Flat Cap Strip)	Thermo Scientific (Epsom, UK)
Optically Clear Adhesive Seal Sheets für TaqMan	Thermo Scientific (Epsom, UK)
384-Well-Platten für Realtime-PCR	Thermo Scientific (Epsom, UK)
Reagenzgefäße (Eppis)	Sarstedt (Nümbrecht)
Agarosepulver	Invitrogen (Paisley, UK)
Thermo-Fast® 384-Well-PCR-Platte	Thermo Scientific (Epsom, UK)

2.2.1.2 Reagenzien, Kits und Enzyme

Tabelle 4 zeigt die verwendeten Reagenzien, Kits und Enzyme, die zur Genotypisierung verwendet wurden. Die verwendeten Geräte sind in Tabelle 5 verzeichnet.

Tabelle 4: Reagenzien, Kits und Enzyme.

Reagenzien, Kits und Enzyme	Lieferant/Hersteller
100 bp Längenstandard für Agarosegel	Rapidozym, Berlin
Agarose Ultra Pure	Invitrogen, Karlsruhe
dNTP-Set	ABgene (Epsom, UK)
Ethidiumbromid 1% in H ₂ O	Merck, Darmstadt
TaqMan® Genotyping Master Mix	Applied Biosystems (Foster City, USA)
SNaPshot® Multiplex Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Multiplex PCR Master Mix	Qiagen, Hilden
BSA 100x Puffer	New England Biolabs, Beverly, USA
10x SAP-Puffer	usb, Staufen
Fast-AP	Fermentas
Fast-AP-Puffer	Fermentas
Exonuklease I (20 U/μl)	Fermentas
SAP (1 U/μl)	Affymetrix (Cleveland, USA)
10x SAP-Puffer	Affymetrix (Cleveland, USA)
GeneScan™-120 LIZ™ Größenstandard	Applied Biosystems (Foster City, USA)
<i>Sau96I</i> (5000 U/ml)	New England Biolabs, Beverly, USA
NEBuffer 4 (10x)	New England Biolabs, Beverly, USA
<i>BsmFI</i> (2 U/μl)	New England Biolabs, Beverly, USA

2.2.1.3 Geräte

Tabelle 5: Verwendete Geräte.

Geräte	Hersteller
Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Fluor-S TM Multimager	BioRad, München
MS2 Minishaker-Vortexer	IKA, Staufen
Peltier Thermal Cycler: Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Peltier Thermal Cycler: PTC-200	BioRad, München
TaqMan 7900 HAT	Applied Biosystems, Darmstadt

2.2.1.4 Software und Datenbanken

Tabelle 6: Verwendete Software.

Software	Hersteller
MS Office	Microsoft, USA
OpenOffice Calc 4.01	Opensource
Quantity One S	BioRad, München
TaqMan-Analysesoftware SDS	Applied Biosystems, Darmstadt
National Center for Biotechnological Information	NCBI (Bethesda, USA)
Clone Manager Suite	SECentral (Timberlake, USA)
CorelDraw	Corel Corporation (Ottawa, USA)
Adobe Photoshop	Adobe Systems GmbH, München
XFluor4 Software	Tecan, Crailsheim

2.2.1.5 Primer

Tabelle 7: Primer.

Gen	SNP	vor-PCR-Sequenz	PCR-Amplikonlänge	SNaPshot-Primer	Primer-Länge	Konzentration
SCN5A	rs11710077	5'-AACATGGCCCCAGACATTCCACACC-3' 3'-GCAGCTGGTGGCCGTGTGTCTGTCT-5'	103 bp	(gatc) ₆ GAGAGCAATCATGAGTTAGAGG	46 bp	1,5 µM
	rs1805124	5'-CACCCGTGGCCTCAGCAGGACTTCT-3' 3'-CCACCCATTGCAGTCCACAGTGCT-5'	269 bp	GGGGGAGACGAGAGCCACC	19 bp	1 µM
	rs3734381	5'-CATGGAATCCAGGCAATATTGAAGAGTTAC-3' 3'-ATTGCTCCCCAAAATGGTTGTACCA-5'	303 bp	(gatc) ₇ gACAAGCTGTGAGTTCCCACT	49 bp	1,5 µM
	rs11153730	5'-CAGGGCTGGAAGGCCATCAAGGAAA-3' 3'-GGTGTGCGCCAGCTTTGCCTCTAGAA-5'	142 bp	gatcgTCTTACCTTCTGTACATATTCCAC	30 bp	0,5 µM
	rs7638909	5'-ACCTCGGAGCCCAGATCTTTTTTTT-3' 3'-CAGTTTGGTGGTCCCTCAAACTTT-5'	279 bp	(gatc) ₈ GGGAAATGAATGGGGATTGAC	53 bp	3 µM
	rs1805126	5'-CAGCCGTGGGCATCCTCTTCTTAC-3' 3'-CCATGGGCAGGTCCATGTTGATGAG-5'	294 bp	gatcGTCCTGTCTGACTTTGCCGA	24 bp	1 µM
	rs11129795	5'-TAAGCCAGTCACAAGAGGACAAATA-3' 3'-GCTTTTTCATCCCTACAAATTTGAC-5'	248 bp	gatTATTATATGATTCCACTTATATAAG	28 bp	1 µM

Gen	SNP	vor-PCR-Sequenz	PCR-Amplikonlänge	SNaPshot-Primer	Primerlänge	Konzentration
PLN	rs11756438	5'- ATGGCTGGCCATGGGKCATCTTAAA-3' 3'- CGAACTCCTGGCCTCAAGTGATCTG-5'	238 bp	ATGGCTGGCCATGGGGCATCTTAAA	25 bp	0,5 µM
	rs11153768	5'- GGACCCGAAGGATCCCTCTTTCTTC-3' 3'- AATGGCTGCTTTCAAACCACTCAG-5'	169 bp	(gatc) ₂ gaTGAGTGAATTTGTGGCAACTAATTAA	36 bp	1 µM
	rs3734381	5'-ATTCCAGCGCTTCAATTTCCAAACT-3' 3'-TATCCGGGGCAGTGAGTTTGATAA-5'	183 bp	(gatc) ₄ gatAGAGTCCTGCTCCCCCTAC	39 bp	1 µM
	rs11153730	5'-GCTGGGGCTAAATCTTAATTCTGTA-3' 3'-TCATAGTACTCTTGTGTAAGCTTT-5'	177 bp	(gatc) ₂ gTTTAACCTCTACTCTTAATTCA	35 bp	1 µM
	rs11970286	5'-GAAGCCAAAGTGTCTCTTTGTAAAG-3' 3'-TTGAGGGTCTGGATAGAACACAAAG-5'	412 bp	gatcgGCCAAAGGCATGAGAACTAG	25 bp	1 µM
	rs12210810	5'-CAGCAATGGGGACTGTAGAGAGAAG-3' 3'-GGCAACCAGCAATCAACACTATA-5'	173 bp	(gatc) ₈ gatCTGTCCTGTGTTACACAGA	55 bp	3 µM
KCNQ1	rs2237892	5'-TAAGGCCCCACAGAGTGTGCATCC-3' 3'-GCAGCTGGGCTGGTAGGGAACAACT-5'	275 bp	(gatc) ₆ gTGTCACAGGACTTTGCCACC	45 bp	1,5 µM
	rs12296050	5'-CTGTGCCCGAAAATGCACTGTCTC-3' 3'-GTCGAGGCTGCAGTGAACCAAGATC-5'	159 bp	(gatc) ₃ gCACTGTCTCTCTGGGCTCC	33 bp	0,5 µM
	rs757092	5'-CAGGGCTGGAAGGCCATCAAGGAAA-3' 3'-GGTGTGCCAGCTTGCCTCTAGAA-5'	143 bp	(gatc) ₅ gaGGCAGGGGTTCAAAGAGCTG	42 bp	1 µM

Gen	SNP	vor-PCR-Sequenz	PCR-Amplikonlänge	SNaPshot-Primer	Primerlänge	Konzentration
KCNH2	rs3807375	5'-CTGGGTGGGGTGATTTTGGAGGTC-3' 3'-CGTCGGGAGGGAAGTTCTGTAAAC-5'	215 bp	gatcgCCCTTAGAGAACTTCTGCGTTTAGA	32 bp	1 µM
	rs1805123	5'-CAACGCAAGCGCAAGTTGTCCTTCC-3' 3'-ACAGCTGCAGGGGCCCTGAAAGATG-5'	224 bp	(gatc) ₇ gaCTTCCGCAGGCGCACGGACA	50 bp	1,5 µM
	rs2968863	5'-CCTCCTGGATTTTTGACTGTTGTAA-3' 3'-AGTGAAAGGCTATTGACAGATCTT-5'	260 bp	(gatc) ₄ gAACAACACAAATGACTGGAAAGC	40 bp	1 µM
	rs3815459	5'-GGGGCGACGTGGAGAGCAGGCTGGA-3' 3'-GGGGCGACGTGGAGAGCAGGCTGGA-5'	201 bp	GACTCCAGGGCGTGCCCCC	20 bp	0,5 µM
CASQ1	rs2275703	5'-CTGTCCTCCACCTCCACATCAC-3' 3'-TTGCAGGCAGGGTTCATTTTGAGAC-5'	206 bp	(gatc) ₆ gCTGGGGTTCCAGACAAGC	50 bp	1 µM
	rs617698	5'-GAGGGCTTGGGAATCTCTCAGATT-3' 3'-GCTGCCCCCTAGTGGCTGACTGCTC-5'	430 bp	(gatc) ₄ gcGGGATTTGAGCATGGAATTCA	40 bp	1 µM
CASQ2	rs7536370	5'-CCCCATGGAGTTGTCTTGTATTCT-3' 3'-GCTGGGGCTGATAATTAAGGTCCTC-5'	157 bp	(gatc) ₉ CAGATGTGCACCCACTCAG	55 bp	3 µM
	rs3010396	5'-AATCCAACAAGGCTACATGAACACT-3' 3'-AGGTGAGGTCAGGCTATGATTAATA-5'	102 bp	(gatc) ₅ ATGACTCAGTGTCTACAGA	36 bp	1 µM

Gen	SNP	vor-PCR-Sequenz	PCR-Amplikonlänge	SNaPshot-Primer	Primerlänge	Konzentration
RYR2	rs6678625	5'-ACCCAGGCTTACATCATCAGACTTA-3' 3'-AATCCCACAATGTCAGAGTTTCAG-5'	279 bp	(gatc) ₆ gCCTTTCTTGGGTAATTCAGCC	46 bp	1 µM
	rs3766871	5'-CCACTCCGGAGGAGGAGAGTGACAC-3' 3'-TTAACTGGCTCTGGCAGTTTCATTT-5'	145 bp	GCCTTCCTTGGGCCGCTTGC	20 bp	1 µM
	rs72549415	5'-GGACGGTGGTATTTTGAATTTGAGA-3' 3'-CTGTGGRAAACACTGGTACTGTGAA-5'	229 bp	(gatc) ₃ gaCTCAGATGAACGTGCCTTTG	34 bp	2 µM
CACNA1C	rs1558322	5'-AAGCCGCCTTTCCAATAAAATAAG-3' 3'-AATCCCGTGACTGCTACAAAATGTG-5'	376 bp	(gatc) ₅ ACATGTTGGCTGCAAAAGCAAA	42 bp	4 µM
	rs1051375	5'-AGTCGCCATCCCACGAGAAGCTGGT-3' 3'-CTGCACCCGGATGGCAGGGGACAAG-5'	194 bp	(gatc) ₂ gaCCCGCCGGCTACCCCAGCAC	30 bp	1 µM

Gen	SNP	vor-PCR-Sequenz	PCR-Amplikonlänge	SNaPshot-Primer	Primerlänge	Konzentration
NOS1AP	rs12084280	5'-TGACCAGGAATGTCTGAATCTGTGA-3' 3'-TTGGGTTGGTTCCAAGTCTTGATA-5'	119 bp	(gatc) ₇ gGTTTCTTCACACTTCCAGG	50 bp	2 µM
	rs10918859	5'-TGTAAGGCTCCATAGATGAAGTGAG-3' 3'-GTCCAGGCTCTAGACTTTTCTTGTG-5'	111 bp	(gatc) ₃ gGTGTTTCTAAACTTTCTGAGGGAT	38 bp	1 µM
ANK2	rs2107026	5'-TACCAGGCGCTGTGTTAGATGCTAG-3' 3'-CTGGCTCTGTTTTCCACCTGACTTA-5'	308 bp	(gatc) ₈ gaAAGTAGACCCAGGGAGATCC	54 bp	3 µM

Die Längen der PCR-Amplikone und des SnaPshot-Primers sind in Basenpaaren (bp) angegeben.

2.2.2 Methoden

2.2.2.1 Standardmethoden der Molekulargenetik

2.2.2.1.1 Isolation und Lagerung der DNA

Die Extraktion von DNA wurde automatisch mit dem BioRobot® EZ 1 vorgenommen. Die Trennung der DNA von den restlichen Bestandteilen der Zelle wird dabei durch Magnetismus ermöglicht. Hierzu werden Blutzellen lysiert und Siliziumdioxid-beschichtete Magnetpartikel hinzugefügt, die die DNA binden und sie während des Waschvorgangs von den übrigen Zellbestandteilen trennen. Die DNA-Extraktionen erfolgten mit dem BioRobot® EZ 1 aus je 350 µl venösem Blut. Nach Herstelleranleitung wurde hierfür das *EZ 1 DNA Blood 350 µl KIT* verwendet. Nach der Extraktion erhält man 200 µl Wasser-DNA-Lösungen, die jeweils unterschiedlich stark konzentriert sind. Vor dem weiteren Gebrauch wurden die Konzentrationen der DNA-Proben bestimmt. Die Proben für die TaqMan-Analysen wurden bis zur Verwendung noch auf 10 ng DNA pro µl verdünnt. Für die Genotypisierungen wurde die DNA bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert, um DNase-Spaltungen sowie Wachstum von Mikroorganismen zu verhindern.

2.2.2.1.2 Herstellung der Nukleosidtriphosphat (dNTP)-Mischung

Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) sind die Bausteine für die Amplifikation der DNA-Stränge. Zur Herstellung einer Mischung aus dNTPs wurden Stammlösungen mit jeweils 100 mmol/l Desoxyadenosintriphosphat (dATP), Desoxythymidintriphosphat (dTTP), Desoxyguanosintriphosphat (dGTP) und Desoxycytosintriphosphat (dCTP) im destilliertem Wasser im Verhältnis von 1:50 zu einer Konzentration von 2 mmol/l verdünnt. Hierfür wurden jeweils 120 µl Stammlösungen von dATP, dTTP, dCTP und dGTP in einem Gefäß mit 5520 µl H₂O vermischt, sodass sich eine dNTP-Lösung von 6000 µl ergab. Diese Lösung wurde bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Vor Gebrauch der Lösung wurde diese aufgetaut, gevortext und abzentrifugiert.

2.2.2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist ein Verfahren zur enzymatischen in vitro Replikation eines vordefinierten DNA-Fragmentes. Dabei werden zwei sogenannte Primer, synthetisch hergestellte Oligonukleotide von etwa 18-25 Nukleotiden, benutzt, die sich an den zu replizierenden DNA-Abschnitt flankierend anlagern und dem synthetisierenden Enzym Taq-Polymerase als Start- und Endpunkt dienen (Strachan 2004). Ein PCR-Durchlauf umfasst dabei 25 bis 40 Zyklen, wobei ein Zyklus drei Schritte beinhaltet. Im ersten Schritt, der Denaturierung, werden die beiden DNA-Stränge bei 94-95 °C durch das Aufbrechen ihrer Wasserstoffbrückenbindungen aufgetrennt, sodass zwei Einzelstränge resultieren. Im ersten Zyklus wird die DNA meist längere Zeit erhitzt um sicherzustellen, dass die Doppelstränge in jeweils zwei Einzelstränge getrennt werden. Im zweiten Schritt, dem *annealing*, wird die Temperatur, in Abhängigkeit von der Schmelztemperatur des Primers auf etwa 50 bis 70 °C gesenkt, um das Anlagern desselben an die komplementären DNA-Abschnitte möglich zu machen. Diese *annealing*-Temperatur liegt im Normalfall bei etwa 5 °C unter dem jeweiligen Primerschmelzpunkt, welcher vom Guanosin- und Cytosingehalt der Sequenz abhängig ist. Bei hohem Guanosin-/Cytosingehalt der Sequenz kann Q-solution hinzugegeben werden, die das Schmelzverhalten der DNA moduliert, um die Amplifikation zu vereinfachen. Im dritten Arbeitsschritt werden die Oligonukleotidprimer verlängert. Dazu wird in Abhängigkeit von der Polymerase eine Temperatur gewählt, die im Falle der hier verwendeten Taq-Polymerase bei 72 °C liegt. In diesem Schritt, der Elongation, wird der DNA-Matrizenstrang ausgehend von den Primern durch die Polymerase in 3'-5'-Richtung komplementär zum codogenen Strang verlängert, sodass am Ende des dritten Arbeitsschritts die DNA-Vorlage wieder als Doppelstrang vorliegt. Die in einem Zyklus erzeugten Kopien des DNA-Abschnitts dienen in den nachfolgenden Zyklen als Vorlage. So kommt es zur exponentiellen Replikation des DNA-Abschnittes.

2.2.2.1.4 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ermöglicht die Identifizierung der in der PCR amplifizierten DNA-Fragmente. Dabei werden die DNA-Produkte in einem elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt und anhand eines mitlaufenden DNA-Längenstandards größenweise zugeordnet. Dazu gibt man die DNA in die Taschen eines Agarosegels, welches sich in TRIS-

Borat-EDTA (TBE)-Puffer einfacher Konzentration getaucht in einer Gelkammer befindet und legt eine elektrische Spannung an. In dieser Arbeit wurde eine Spannung von 120 V verwendet. Das Agarosegel bildet auf Molekularebene eine Geflechtstruktur mit Poren aus. Die DNA, die aufgrund der Phosphatgruppen negativ geladen ist, bewegt sich im elektrischen Feld aus Richtung der Anode auf die Kathode zu und wird anhand der Molekülgröße durch das Porengeflecht des Gels aufgetrennt, da kurze DNA-Fragmente in kürzerer Zeit den Weg durch die Poren zurücklegen als längere Fragmente. Es bilden sich Banden, die mithilfe von Ethidiumbromid im Gel sichtbar gemacht werden. Das Ethidiumbromid interkaliert nach seiner Zugabe zwischen den Basenpaaren und besitzt unter UV-Licht fluoreszierende Eigenschaften, die sich hier zunutze gemacht werden.

Bei der Herstellung des Agarosegels wird dessen Konzentration unter Berücksichtigung der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente gewählt. In dieser Arbeit wurden Konzentrationen von 2-3% verwendet. Zur Herstellung eines kleinen 2%igen Agarosegels wurden 50 ml einfachen TBE-Puffers mit 1 g Agarosepulver vermischt, zur Herstellung eines großen Gels wurden 400 ml einfachen TBE-Puffers mit 8 g Agarosepulver verwendet. Im kleinen 3%igen Gel wurden 50 ml TBE-Puffer mit 1,25 g Agarosepulver vermischt.

Die jeweilige entstandene Lösung wurde in der Mikrowelle aufgeköcht und anschließend bei Raumtemperatur und unter Rühren auf etwa 60 °C abgekühlt und anschließend Ethidiumbromid bis zur Endkonzentration von 5 µg pro 100 ml Agaroselösung hinzugefügt. Im Anschluss wurde das flüssige Gel in die Gelkammer gegossen, in der zuvor Kämme als Platzhalter platziert wurden, sodass sich Taschen im Gel bilden können. Nach Erstarrung des Gels werden die Kämme entfernt und das fertige Gel in die mit einfachem TBE-Puffer gefüllten Gelkammern gegeben. Dabei muss das Agarosegel vollständig bedeckt in der Pufferlösung liegen. Bevor die Geltaschen mit den DNA-Proben gefüllt werden, werden die Proben mit 0,25%igem Bromphenolblau farblich markiert, sodass der Fortschritt der Elektrophorese durch Sicht abgeschätzt werden kann. Nach längenmäßiger Auftrennung der Fragmente in der Gelelektrophorese wird das Ergebnis mithilfe des Fluor-S-Multiimager® und der Software Quantity One® festgehalten und ausgewertet. Das Bromphenolblau wurde in aliquotierten Eppendorff-Cups bei -20 °C gelagert.

Zur Herstellung der verwendeten TBE-Pufferlösung wurden 109,02 g Tris mit einem pH von 8,3 mit 55,64 g Borsäure und mit 9,3 g Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und 100 ml destilliertem Wasser zu einem zehnfach konzentrierten TBE-Puffer gemischt. Der Puffer wird auf einfache Konzentration verdünnt, indem 200 ml 10facher Konzentration auf 1600 ml destilliertem Wasser verteilt werden.

2.2.2.2 Genotypisierung genetischer Polymorphismen

Die Bestimmung genetischer Polymorphismen wurde in dieser Arbeit mittels drei verschiedener Verfahren durchgeführt: Der Methode des Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus (RFLP, vgl. 2.2.2.2.1), der SNaPshot-Methode (vgl. 2.2.2.2.3) und der TaqMan-Analyse (vgl. 2.2.2.2.2). Für die Verfahren wurden jeweils die Amplifikationsprodukte der Polymerase-Kettenreaktion verwendet.

Die beiden Rezeptoren im adrenergen Beta-1-Rezeptor (*ADRB1*) wurden mittels PCR-RFLP-Verfahrens analysiert, da dieses für diese SNPs bereits gut etabliert ist. Die beiden Polymorphismen im β_2 -Rezeptor (*ADRB2*) und der Serin96Alanin-Polymorphismus in *HRC* wurden mittels TaqMan-Analyse bestimmt. Das TaqMan-Verfahren ist besonders gut geeignet zur Determinierung weniger SNPs in vielen, bis zu etwa 1500, Proben pro Lauf. Zudem ist es die schnellste unter den drei Methoden. Allerdings sind die Kosten hierfür gegenüber den Alternativen deutlich höher, weshalb nur die vier oben erwähnten SNPs auf diese Weise bestimmt wurden. Alle anderen Genvarianten wurden mittels des so genannten SNaPshot-Verfahrens analysiert. Dieses Verfahren eignet sich besonders gut zur Diskriminierung vieler, meist 6-9 SNPs pro Lauf bei einigen hundert Proben. Nur im SNaPshot-Verfahren lassen sich verschiedene SNPs simultan genotypisieren. Zudem ist das Verfahren relativ kostengünstig.

2.2.2.2.1 Genotypisierungen nach der PCR-RFLP-Methode

Die PCR-Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (PCR-RFLP)-Analyse setzt einen Polymorphismus voraus, der sich innerhalb einer natürlichen oder künstlich hinzugefügten Schnittstelle für Restriktionsendonukleasen befindet und dort zum Funktionsverlust führt.

Nach Voranschaltung einer PCR (vgl. 2.2.2.1.3) wird ein Restriktionsenzymverdau angewandt. Dabei schneidet das jeweilige Restriktionsenzym das PCR-Produkt nur unter der Bedingung, dass eine Schnittstelle vorhanden ist. In diesem Falle resultieren aus einem Strang zwei DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge. Ein Polymorphismus innerhalb dieser Schnittstelle zerstört dieselbe und führt dazu, dass das Restriktionsenzym den DNA-Strang nicht mehr schneiden kann, sodass der Strang seine Ursprungslänge beibehält.

Die nach dem Restriktionsverdau durchgeführte Gelelektrophorese trennt die DNA-Proben der Länge nach auf und macht so das vorliegende allelspezifische Schnittmuster kenntlich, wodurch Rückschluss auf den vorhandenen Genotyp gegeben wird. Abbildung 6 zeigt die für den S49G-RFLP, bzw. R389G-Polymorphismus typischen Banden im Elektrophoresegel. Die Genotypisierung nach PCR-RFLP-Methode ist geeignet zur Detektion von Einzelnukleotid-Basenaustauschen (*single nucleotide polymorphisms, SNPs*).

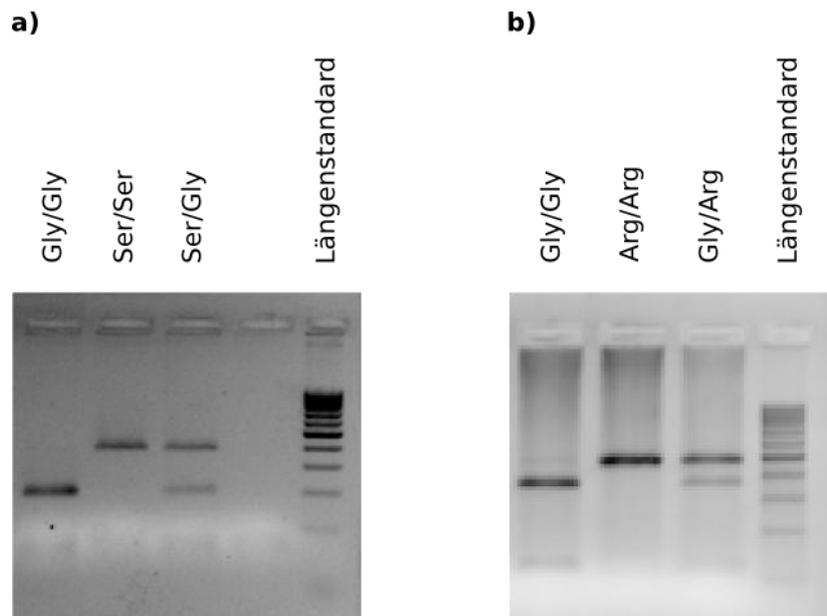


Abbildung 6:

a) Auswertung des S49G-RFLP. Dargestellt sind von links nach rechts Proben von Individuen, die den ADRB1-S49G-Polymorphismus des ADRB1 in homozygot deletierter, homozygot inserierter sowie heterozygoter Form aufweisen. Die PCR-Amplifikationsprodukte wurden auf 2 %igem Agarosegel aufgetragen. Es wurde ein 100 bp Längenstandard hinzugefügt.

b) Auswertung des R389G-RFLP. Dargestellt sind von links nach rechts Proben von Individuen, die den ADRB1-R389G-Polymorphismus des ADRB1 in homozygot inserierter, homozygot deletierter sowie heterozygoter Form aufweisen. Die PCR-Amplifikationsprodukte wurden auf 2 %igem Agarosegel aufgetragen. Es wurde ein 100 bp-Längenstandard hinzugefügt.

Als erster Schritt der PCR-RFLP-Methode wurde zur DNA-Amplifizierung folgender Mastermix auf Eis pipettiert:

Tabelle 8: Mastermix zur Genotypisierung des S49G-Polymorphismus.

Mastermix	Volumen/Reaktion [μ l]
ddH ₂ O	6,26
PCR Buffer (10x)	1,1
Q-solution (5x)	2,2
dNTP (10 mM)	0,22
Primer ADRB1_S49G_f (100 μ M)	0,11
Primer ADRB1_S49G_r (100 μ M)	0,11
<i>Taq</i> -DNA Polymerase (5 U/ μ l)	0,06
Endvolumen	10,06

Es wurden je 10,06 μ l Mastermix pro Well in einer 96-Well-Platte verteilt und jeweils 1 μ l unverdünnte DNA hinzugegeben. Nach Abdeckung der Wells mit 8er-Deckelketten wurde die Amplifikation in der PCR gestartet. Im *ThermoCycler* wurde die PCR unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Tabelle 9: PCR-Arbeitsschritte zur Genotypisierung des S49G-Polymorphismus.

PCR-Arbeitsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	94 °C	3 min	} 35
Denaturierung	94 °C	30 sec	
Anlagerung	65 °C	30 sec	
Verlängerung	72 °C	45 sec	
finale Verlängerung	72 °C	10 min	
Lagerung	8 °C	bis Verwendung	

Nach erfolgreicher Amplifizierung in der PCR erfolgte der Verdau mit dem Restriktionsenzym *Sau96I*. Hierzu wurden destilliertes Wasser, Puffer und Enzym nach Tabelle 10 gemischt und den Proben hinzugegeben:

Tabelle 10: Komponenten für den Restriktionsverdau.

Komponente	Volumen/Reaktion [μ l]
ddH ₂ O	12,35
10x Buffer 4	2
Sau96I	0,5
Endvolumen	15

Der Restriktionsverdau erfolgte über Nacht im Inkubator bei 37 °C. Nachfolgend wurden die Restriktionsprodukte im 2%igen Agarosegel analysiert.

2.2.2.2.1.1 Genotypisierung des R389G Polymorphismus im adrenergen β_1 - Rezeptor

Als erster Schritt wurde zur DNA-Amplifizierung folgender Mastermix auf Eis pipettiert:

Tabelle 11: Mastermix für PCR.

Mastermix (10 μ l/Reagenz)	Volumen/Reaktion [μ l]
ddH ₂ O	6,26
PCR Buffer	1,1
Q-solution	2,2
dNTPs	0,22
Primer ADRB1_R389G (100 μ M)	0,11
Primer ADRB1_R389G (100 μ M)	0,11
<i>Taq</i> -DNA Polymerase	0,06
Endvolumen	10,06

Es wurden je 10,06 μ l Mastermix pro Well in einer 96-Well-Platte verteilt und jeweils 1 μ l unverdünnte DNA hinzugegeben. Nach Abdeckung der Wells mit 8er-Kettendeckel wurde die

Amplifikation in der PCR gestartet. Im *ThermoCycler* wurde die PCR unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Tabelle 12: PCR-Bedingungen.

PCR-Arbeitsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	98 °C	5 min	
Denaturierung	98 °C	30 sek	} 35
Anlagerung	60 °C	30 sek	
Verlängerung	72 °C	45 sek	
finale Verlängerung	72 °C	10 min	
Lagerung	8 °C	bis Verwendung	

Nach erfolgreicher Amplifizierung in der PCR erfolgte der Verdau mit dem Restriktionsenzym *BsmFI*. Hierzu wurden bidestilliertes Wasser, Puffer und Enzym entsprechend Tabelle 13 gemischt und den Proben hinzugegeben.

Tabelle 13: Komponenten für den Restriktionsverdau.

Komponente	Volumen [µl]/Reaktion
ddH ₂ O	12,55
100x BSA (10 µg/µl)	0,2
10x Buffer	2
BsmFI (2 U/µl)	0,25
Endvolumen	14,45

2.2.2.2.2 SNP-Genotypisierung mit TaqMan

Bei der TaqMan®-Methode handelt es sich um ein Echtzeit-PCR-Verfahren zur Genotypisierung von *single nucleotide polymorphisms*.

Für dieses Verfahren werden zwei Arten von Oligonukleotidsonden benutzt, die jeweils am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzmarker, dem Reporter, bestückt sind. Am 3'-Ende befindet sich der nicht-fluoreszierende *Quencher*, der eine Phosphatgruppe trägt, die verhindert, dass am 3'-Ende eine Verlängerung stattfindet. Am *Quencher* befindet sich ein *minor groove binder*, der an die kleine Furche der DNA bindet und eine stabilere Bindung der Sonde an die DNA ermöglicht, wodurch kürzere Sonden verwendet werden können. Die beiden Sonden unterscheiden sich durch den Reporter. Eine besitzt den VIC-, und eine den FAM-Fluoreszenzmarker, die bei jeweils unterschiedlichen Wellenlängen zur Emittierung von Photonen angeregt werden und dadurch später die Diskriminierung der beiden Sonden ermöglichen.

Bindet die Sonde in der *annealing*-Phase an eine komplementäre Basensequenz, so findet keine Emission vom Fluoreszenzmarker statt, weil dessen Signal vom *Quencher* unterdrückt wird. Das Enzym, das zur real time PCR verwendet wird, Taq Polymerase, besitzt eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität, die in der Elongationsphase der Replikation die Sonde spaltet. Dabei kommt es zu einer räumlichen Trennung zwischen *Quencher* und Reporter, die die Unterdrückung des Fluoreszenzsignals aufhebt und die Emission von Photonen auf der für den jeweiligen Marker spezifischen Wellenlänge erlaubt. Die gemessene Emission ist proportional zur Anzahl der PCR-Produkte und der Menge an Fluoreszenzmarkern.

Bleibt eine spezifische, vollständige Bindung der Sonde an die Zielsequenz aus, etwa weil die Allelvariante nicht komplementär ist, so kommt es auch nicht zur Spaltung der Sonde durch die TaqPolymerase und das Fluoreszenzsignal des Reporters bleibt durch den *Quencher* unterdrückt (vgl. Abbildung 7). Das Verhältnis der beiden gemessenen wellenlängenspezifischen Fluoreszenzsignale, bzw. VIC und FAM, wird graphisch zur Auswertung dargestellt (vgl. Abbildung 8).

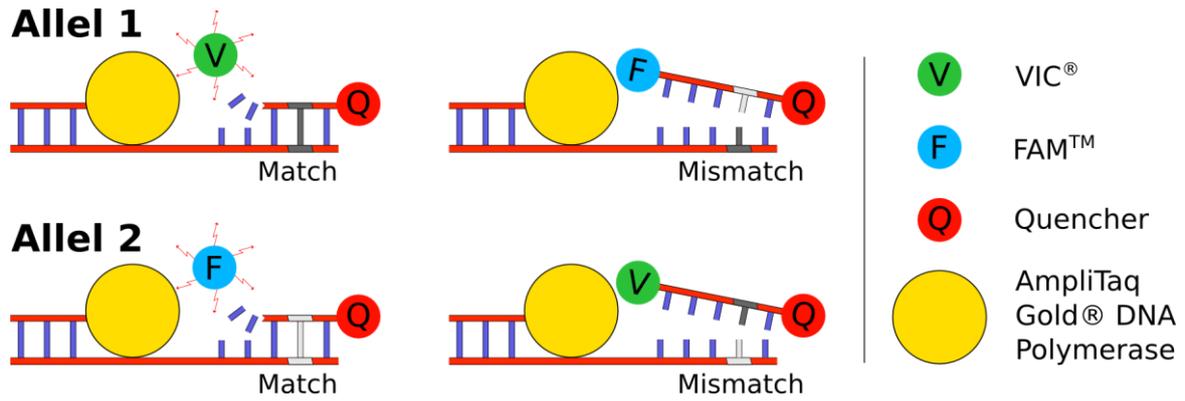


Abbildung 7: TaqMan-Prinzip (verändert nach Applied Biosystems).

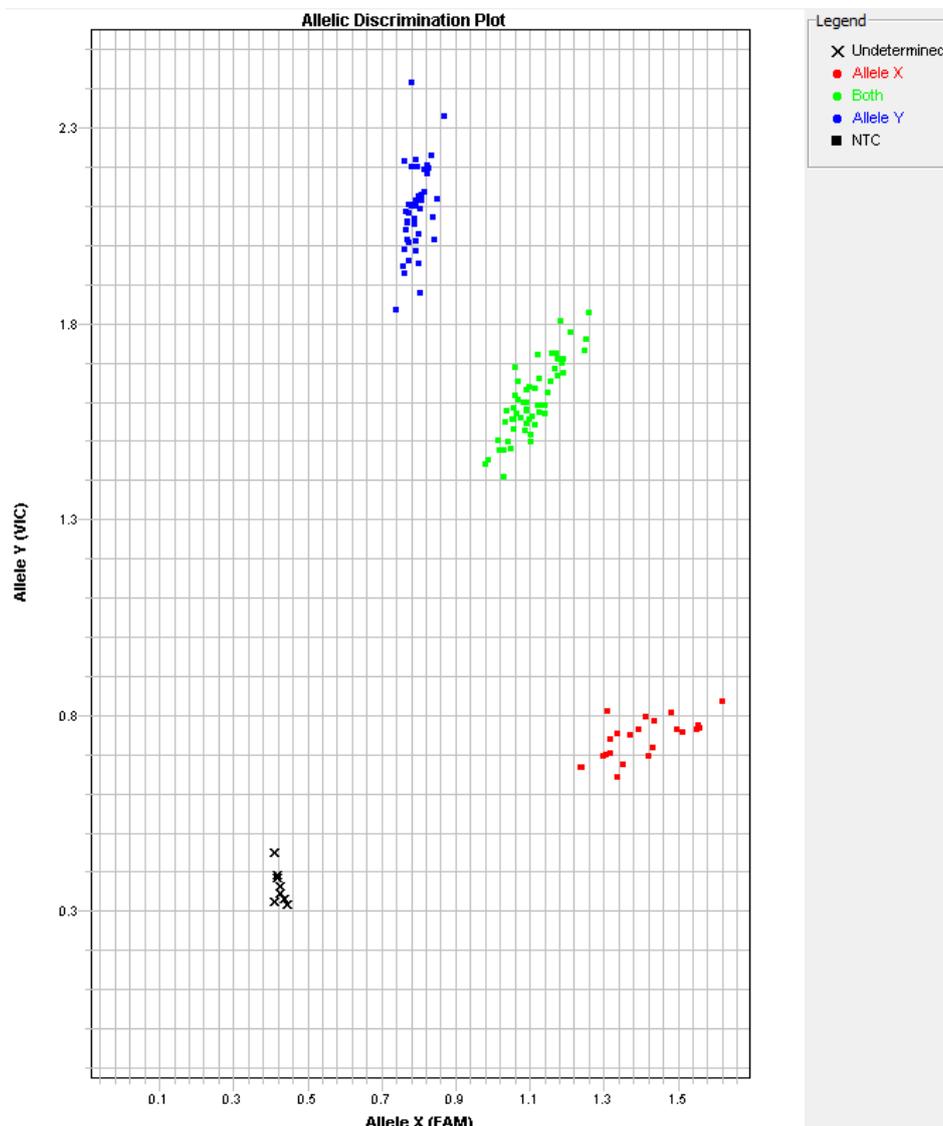


Abbildung 8: Graphische Darstellung der TaqMan-Ergebnisse.

2.2.2.2.1 Vorentwickelte Assays

In dieser Arbeit wurde für das TaqMan-Verfahren ein von Applied Biosystems entwickelter, vorgefertigter Assay mit Primer- und Sondenansätzen in 20facher Konzentration, angewandt. Die vorgefertigten Assays wurden vor der Verwendung lichtgeschützt unter Schütteln aufgetaut, zentrifugiert und anschließend unter Zugabe von bidestilliertem H₂O der MasterMix wie folgt pipettiert und danach vermischt und zentrifugiert:

Tabelle 14: Komponenten des Mastermix für das TaqMan-Verfahren.

Komponenten	Volumen [μ l]/Reaktion
2x TaqMan MasterMix	2,5
40x Sonden und Primer	0,13
DNA (10 ng/ μ l)	1
ddH ₂ O	1,4
Gesamtvolumen	5,03

Mit einer Multipipette wurden jeweils 4 μ l MasterMix pro Well in einer 384-Well-Platte verteilt und anschließend jeweils ein 1 μ l DNA dazugegeben, vermischt, zentrifugiert. Dann wurde die PCR-Plattenoberseite mit transparenter Folie abgeklebt und die PCR mithilfe des 7900 HAT *sequence detection system* in jeweils 50 Zyklen unter den folgenden Bedingungen durchgeführt:

Tabelle 15: Cycler-Bedingungen für das TaqMan-Verfahren.

Temperatur	Dauer
95°C	10 min
92°C	15 sek
60°C	1,5 min

Die Endpunktmessungen wurden 30 Minuten nach Ende der erfolgreichen PCR durchgeführt und deren Ergebnisse mithilfe eines Modus zur allelischen Diskriminierung der *SDS 2.0* Software analysiert. Jede Reaktionsplatte enthielt zudem DNA-freie Kontrollen (*non template control*, NTC) und, wenn möglich, Kontrollen mit bereits zuvor bestimmten Genotypen. Zur weiteren Ergebniskontrolle wurden mindestens 20% der Proben an einem anderen Tag erneut analysiert. Dabei stimmten alle Kontrollen mit den Ergebnissen der ersten Analyse überein.

2.2.2.2.3 SNaPshot-Methode

An der SNaPshot-Reaktion beteiligt sind die aufgereinigten PCR-Amplifikationsprodukte, spezifische Primer sowie der *SNaPshot multiplex ready mix* (vgl. Tabelle 4). Letzterer enthält die fluoreszenzmarkierten Abbruchnukleotide ddATP, ddUTP, ddGTP, ddCT und weiterhin *multiplex reaction buffer* (vgl. Tabelle 4) sowie die spezifischen Primer. Die Primer sind so gewählt, dass sie jeweils genau in Elongationsrichtung eine Base vor dem zu untersuchenden Polymorphismus an die DNA-Stränge binden. An den Primern kommt es nun zur Einzelbasenelongation mit einem passenden der vier Didesoxynukleotiden (ddNTPs). Diese sind bereits hydrolysiert, sodass keine nachfolgenden Basen mehr eingebaut werden können und es zum Abbruch der Elongation an der Stelle des Polymorphismus kommt. Die vier verwendeten ddNTPs sind unterschiedlich fluoreszenzmarkiert, sodass die Base, die am Ort des SNPs gebunden hat, später identifiziert werden kann. Da in einer SNaPshot-Reaktion mehrere Polymorphismen innerhalb einer Reaktion untersucht wurden, weisen die Primer zur Unterscheidung jeweils eine GCTA-Sequenz von spezifischer Länge am 5'-Ende auf, welche nicht am zu untersuchenden DNA-Abschnitt bindet. Auf diese Weise unterscheiden sich die Primer untereinander um eine Länge von mindestens 5 Basen, sodass es zu einem unterschiedlichen Laufverhalten in der Gelelektrophorese kommt und so eine Unterscheidung zwischen allen SNPs, die innerhalb eines Ansatzes untersucht werden, möglich wird. In der kapillarelektrophoretischen Auftrennung der SNaPshot-Elemente im *Sequencer* zeigten sich an den größendefinierten Positionen die fluoreszenzmarkierten Abbruchbasen an den Stellen der SNPs, welche vom Gerät detektiert werden.

Das SNaPshot-Verfahren erfordert im Vergleich zur RFLP-Methode weniger Zeit und ermöglicht die Untersuchung mehrerer SNPs eines PCR-Amplifikationsproduktes. Außerdem ist die Genotypisierung der Polymorphismen unabhängig von der Existenz eines passenden Restriktionsenzym möglich. Allerdings muss die SNaPshot-Methode vor der Verwendung zunächst etabliert werden und erfordert die höheren Kosten. Aus diesen Gründen wurden in dieser Arbeit Polymorphismen mit anderen Methoden als dem SNaPshot angewandt.

2.2.2.2.4 Genotypisierungen mit der SNaPshot-Methode

Im ersten Arbeitsschritt wurden pro Reaktion 10 μl *multiplex mastermix* (vgl. Tabelle 16) mit 1 μl DNA vermischt, zentrifugiert und in einer 96-Well-Platte verteilt.

Tabelle 16: Multiplex-Mastermix zur vor-PCR.

Reagenz	Menge [μl]
2x QIAGEN Mastermix	5,5
10x Primer Mix (je 2 μM)	1,1
Q-solution	1,1
H ₂ O (bidestilliert)	2,3
Gesamtvolumen	10

Nach Verschluss der 96-Well-Platte mit 8er-Deckelketten erfolgte die Amplifikation in der PCR unter den in Tabelle 17 aufgeführten Bedingungen. Zu beachten ist hierbei, dass primerspezifische Anlagerungstemperaturen verwendet wurden.

Tabelle 17: PCR für SNaPshot-Reaktion.

PCR-Arbeitsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	94°C	3 min	
Denaturierung	94°C	30 sek	} 35
Anlagerung	58-64,6°C	30 sek	
Verlängerung	72°C	45 sek	
Finale Verlängerung	72°C	10 min	
Lagerung	8°C		

Nach erfolgreicher PCR wurden die Amplifikationsprodukte aufgereinigt und im 2,5%igen Agarosegel analysiert. Die Aufreinigung erfolgte für jede Reaktion mit je 3 µl des nach in Tabelle 18 hergestellten Mix.

Tabelle 18: Reagenzien und Enzyme zur Aufreinigung.

Reagenzien und Enzyme	Menge [µl]
SAP (1 U/µl)	2,5
Exo I (10 U/µl)	0,3
10x SAP-Puffer	0,9
Gesamtvolumen	3

Die Aufreinigung fand eine Stunde lang bei 37 °C im Inkubator statt und wurde in 15 Minuten bei 80 °C im PCR-Gerät beendet. Anschließend wurden die Proben zur Lagerung auf 8 °C heruntergekühlt oder bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Um sich der erfolgreichen Vor-PCR zu vergewissern, wurden je 5 µl der aufgereinigten Produkte im 2,5 %igen Agarosegel analysiert (vgl. 2.2.2.1.4)

Im nächsten Arbeitsschritt wurden 3 µl SNaPshot-Mastermix (vgl. Tabelle 19) pro Reaktion zusammen vermischt.

Tabelle 19: Komponenten für den SNaPshot-Mastermix.

Reagenzien	Menge [μ l]
SNaPshot Reaktionsmix	1
Pooled Primermix	0,5
H ₂ O (bidestilliert)	1,5
Gesamtvolumen	3

Zusammen mit 2 μ l aufgereinigtem PCR-Produkt wurde der SNaPshot-Mastermix in eine 384-Well-Platte aufgetragen und der SNaPshot-Reaktion unterzogen. Diese fand unter den in Tabelle 20 folgenden Bedingungen im *ThermoCycler* statt:

Tabelle 20: Thermocyclerprogramm für die SNaPshot-Reaktion.

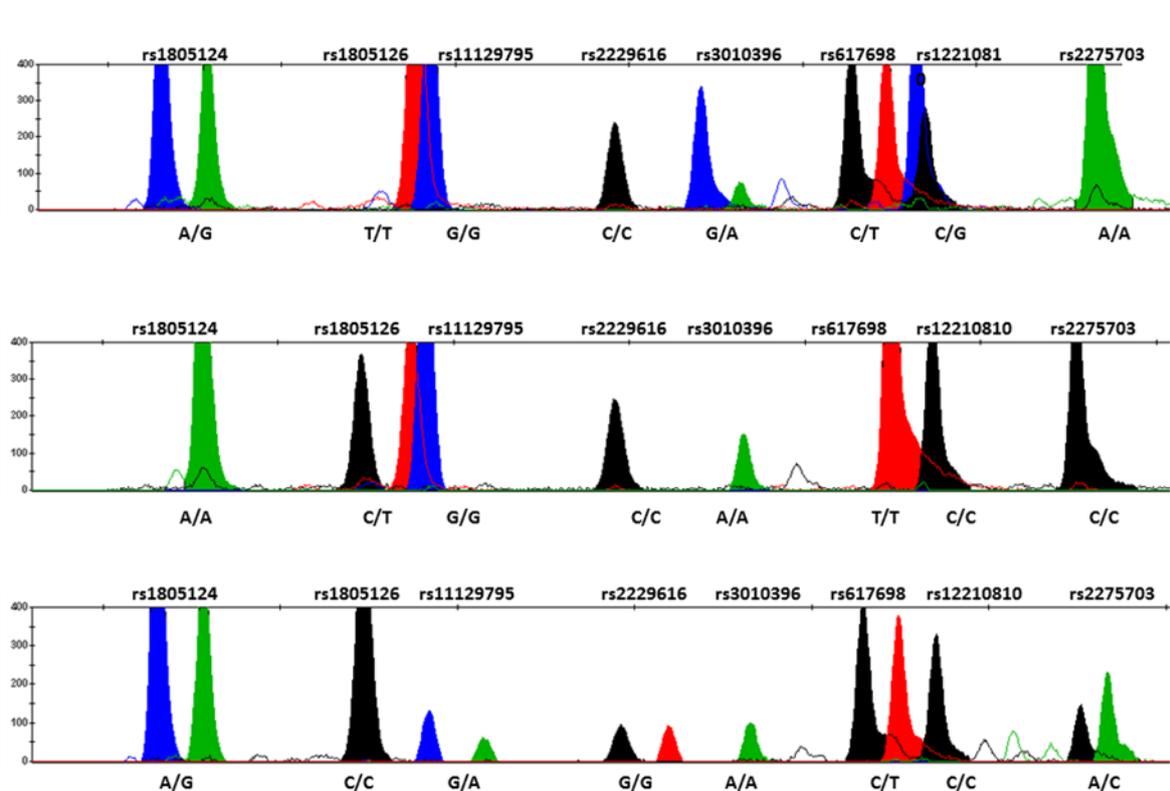
Temperatur	Dauer	Zyklen
96,0°C	2 min	} 25
96,0°C	10 sec	
50,0°C	5 sec	
60,0°C	30 sec	
8,0°C	bis zur Verwendung	

Als nächstes wurden zur Aufreinigung FastAP und FastAP-Puffer zu gleichen Anteilen vermischt und von diesem Mix 1 μ l pro Reaktion den Proben hinzugefügt. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der Produkte für eine Stunde bei 37 °C im Inkubator. Danach wurde die Reaktion bei 75 °C im *ThermoCycler* gestoppt. Die Proben wurden hiernach bei 4 °C gelagert oder direkt weiter für die Sequenzierung eingesetzt. Je 1 μ l der Proben wurden in eine Sequenzierungsplatte gegeben und 10,2 μ l Mastermix für die Sequenzierung hinzugegeben. Die Zusammensetzung dieses Mastermix für die Sequenzierung zeigt Tabelle 21:

Tabelle 21: Mastermix für die Sequenzierung.

Reagenzien	Menge [µl]
Formaldehyd	10
GeneScan-120 LIZ	0,2
Gesamtvolumen	10,2

Nach erfolgreicher Sequenzierung wurden die Ergebnisse mittels *GeneMapper Generic* ausgewertet. Abbildung 9 zeigt die Auswertung der Genotypisierungen von SNPs der Gene *CSQ1*, *CSQ2*, *PLN*, *SCN5A* und *MC4R*. *MC4R* wurde zwar mituntersucht, ist aber für diese Arbeit nicht weiter relevant. Abbildung 10: Auswertung der Genotypisierungen von SNPs der Gene *PLN*, *KCNH2* und *KCNQ1*. Abbildung 11: Auswertung der Genotypisierungen von SNPs der Gene *SCN5A*, *KCNQ1* und *PLN*.

Abbildung 9: Auswertung der Genotypisierungen von SNPs der Gene *CSQ1*, *CSQ2*, *PLN*, *SCN5A* und *MC4R*.

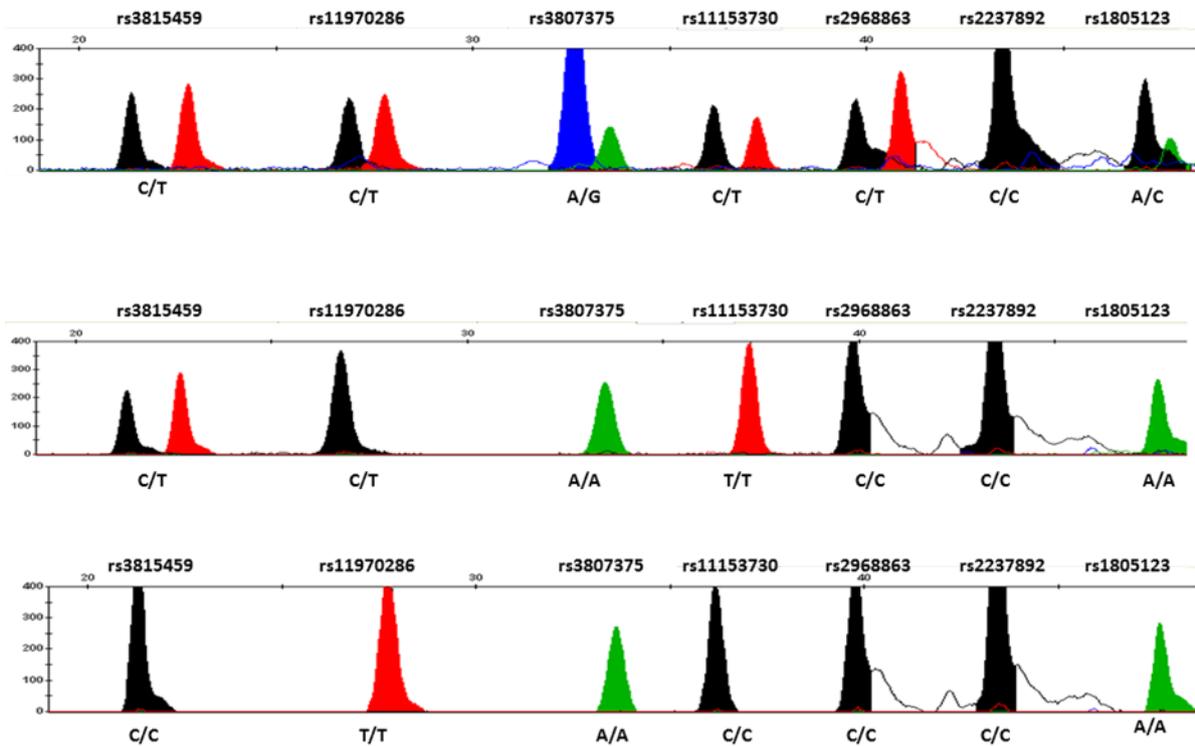


Abbildung 10: Auswertung der Genotypisierungen von SNPs der Gene *PLN*, *KCNH2* und *KCNQ1*.

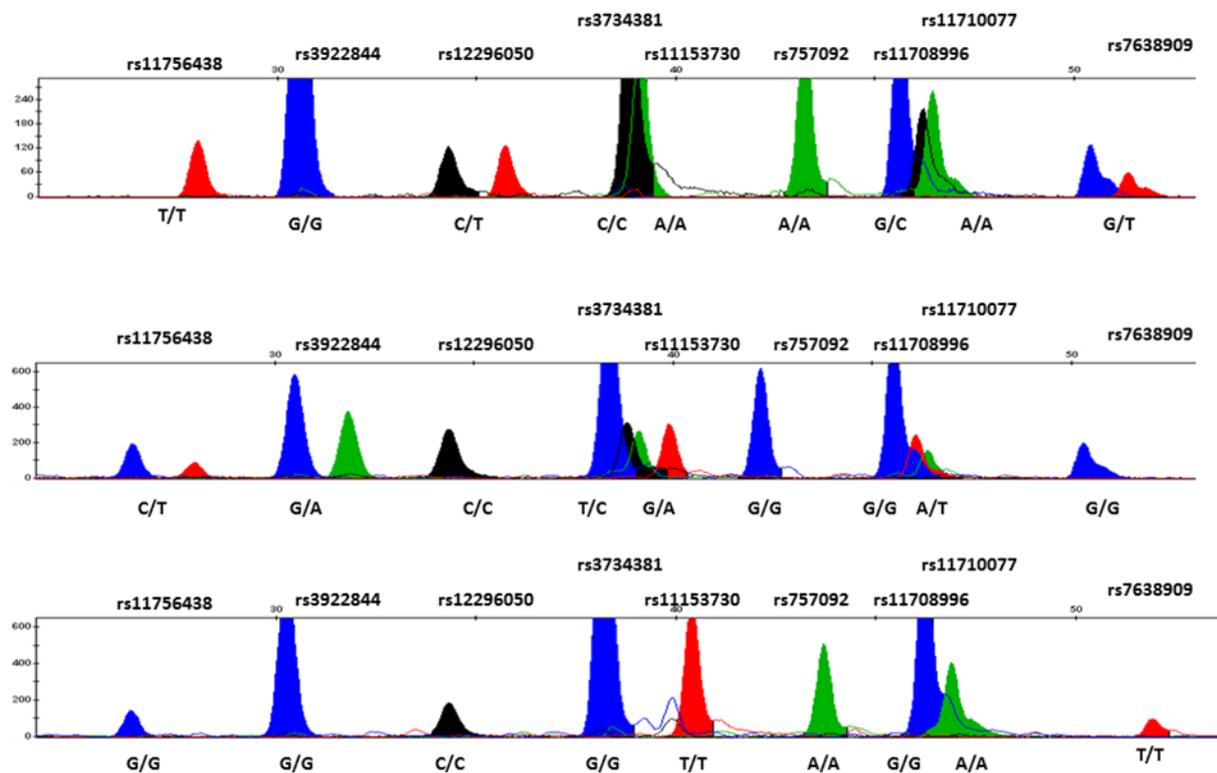


Abbildung 11: Auswertung der Genotypisierungen von SNPs der Gene *SCN5A*, *KCNQ1* und *PLN*.

2.2.3 Maßnahmen zur Kontaminationsvermeidung und Ergebniskontrolle

Um eine Kontamination der PCR-Masteransätze mit DNA zu vermeiden, wurden die Herstellung der Mastermischungen und das Hantieren mit DNA räumlich voneinander getrennt. Die zum Pipettieren der Mastermischungen verwendeten Pipetten wurden ausschließlich für DNA-freies Arbeiten verwendet. So musste zur Hinzugabe der DNA in den Mastermix in den Arbeitsbereich für das Arbeiten mit DNA gewechselt werden.

Die Pipettierschemata der verdünnten und der unverdünnten DNA waren auf 96-Well-Platten aufgetragen und entsprachen so den Pipettierschemata der PCR-Platten, sodass mit einer 8-Kanal-Pipette DNA direkt von der DNA-Platte in die Platte für die PCR pipettiert und so Pipettierfehler vermieden werden konnten. Weiterhin wurden von den DNA-Platten nur jene mit 8er-Deckelketten verschlossenen Probenreihen geöffnet, die verwendet werden sollten. Nach Verwendung wurde die jeweilige Probenreihe sofort wieder verschlossen, bevor der Deckel von der nächsten Probenreihe genommen wurde. Vor Benutzung einer 96-Well-Platte wurde diese zudem zentrifugiert. So konnte die Wahrscheinlichkeit verringert werden, dass beim langsamen und vorsichtigen Öffnen der Deckel DNA einer Probenreihe unbeabsichtigt in andere Probenreihen gelangen konnte und diese kontaminierten. Desweiteren konnte durch diese Arbeitsweise vermieden werden, dass die Deckelketten beim Wiederverschließen der Probenreihen untereinander vertauscht werden und etwaige an den Deckeln sitzende DNA einer Probenreihe in andere Probenreihen gelangt. In diesem Sinne wurden die 8er-Deckelketten beim Wiederverschließen in der gleichen Richtung angeordnet. Zur Orientierung sind die Deckelketten dazu an den Enden markiert.

Mindestens 20% der Proben wurden an verschiedenen Tagen mindestens doppelt genotypisiert und die Ergebnisse reproduziert. Zur Kontrolle liefen bei jedem Genotypisierungslauf Proben mit bekanntem Genotyp und auch Proben bei denen anstelle von DNA H₂O hinzugegeben wurde, mit.

Die Verteilung der Genotypen wurde mit Hardy-Weinberg-Kalkulationen und auch mit Werten aus der Literatur verglichen. So ließen sich im Falle von auffälligen Abweichungen in

den Genotypenhäufigkeiten sämtliche Proben erneut von einer anderen unabhängigen Person genotypisieren.

2.3 Statistische Analyse

In der Analyse wurden die Genotypen von 37 SNPs mit 21 klinischen und elektrophysiologischen Parametern sowie Laborparametern verglichen. In der statistischen Auswertung der Daten wurden die Verteilungen der metrischen Parameter mit Mittelwert und Standardabweichung sowie dem Median und dem maximalen und dem minimalen Wert angegeben. Die Angabe einer Standardabweichung im Rahmen einer parametrischen Statistik basiert auf der Annahme, dass eine Normalverteilung der Parameter vorliegt. Bei der Größe des hier untersuchten Kollektivs sind die Werte jedoch nicht normal verteilt, sodass die Testungen auf Signifikanz bei einer nicht-parametrischen Statistik angewandt wurden. Anhand der absoluten und relativen Frequenzen wurden die kategoriellen und ordinalen Parameter festgelegt.

Zu bemerken ist, dass die Assoziationen zwischen Genotyp und elektrophysiologischen Parametern hier sehr häufig kein lineares Verhalten zeigen. Wenn Einzelbasenaustausche zu einem Funktionsgewinn oder Funktionsverlust des Genprodukts führen, so ist allerdings ein Trend zu erwarten, sodass der Effekt beim Variante-Homozygoten am Stärksten und beim Wildtyp-Homozygoten am Schwächsten ausgeprägt ist. Aus diesem Grund wurden die metrischen und ordinalen Parameter anhand des Jonckheere-Terpstra-Trend-Test mit den Genotypen verglichen. Kategorielle Parameter hingegen wurden über den Cochran-Armitage-Test mit den Allelvarianten verglichen.

In dieser Arbeit wurde das Signifikanzniveau für jeden angewandten statistischen Test mit $\alpha=5\%$ gewählt. Neben der Bestimmung der p-Werte wurden dieselben für jeden einzelnen untersuchten SNP nach Bonferroni-Holm adjustiert (*adjusted p-level*). Alle Analysen wurden mit der freien Statistiksoftware R, Version 2.14.1, durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

In der EUTrigTreat-Studie wurden insgesamt 1000 Patienten rekrutiert. Tabelle 22 fasst die Einschluss- und Ausschlusskriterien für diese Probanden zusammen.

Tabelle 22: Einschluss- und Ausschlusskriterien.

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
<ul style="list-style-type: none"> • Klinische Indikation zur ICD-Implantation nach aktuellen Richtlinien (Zipes et al. 2006) • Alter \geq 18 Jahre • schriftliche Einverständniserklärung • negativer Schwangerschaftstest bei gebärfähigen Frauen • Keine Teilnahme an anderen klinischen Studien einen Monat bevor oder einen Monat nach Aufnahme in die Studie 	<ul style="list-style-type: none"> • Kardiale Instabilität/Dekompensation (z.B. NYHA IV, akutes Koronarsyndrom, symptomatische Arrhythmien) • vor \leq 3 Monaten stattgehabte perkutane Koronarintervention oder Koronararterienbypass-OP • In mehr als 20% der mit dem ICD gemessenen Zeit stattfindende Schrittmachertherapie bei Patienten mit <i>single</i> oder <i>dual-chamber</i> Gerät, die sich zur Auswechslung des ICD-Generators vorstellten • ICD, die keine ventrikuläre Stimulation durch einen <i>ICD-programmer</i> durchführen können • Geräte zur kardialen Resynchronisationstherapie, die bis zu 6 Monate zuvor implantiert wurden

Im Zeitraum von Januar 2010 bis Mai 2011 wurden die Blutproben von 253 der für die Studie rekrutierten Patienten gesammelt. Von 251 Patienten wurden klinische Parameter erhoben. In dieser Arbeit wurden jedoch lediglich die Blutproben von 250 Patienten verwendet, bei denen sowohl genetisches Material gesammelt als auch klinische Daten erhoben worden

sind. So wurden die Allelvarianten von 35 Polymorphismen bei 250 Patienten und für zwei weitere Polymorphismen bei 249 Patienten determiniert.

Von den 251 Patienten, für die klinische Daten erhoben worden waren, kamen 179 aus der Universitätsmedizin Göttingen, 3 aus der Universitätsmedizin Utrecht, Niederlande, 34 aus der Abteilung für klinische Kardiologie der Universität Leuven, Belgien, und 35 aus der Abteilung Kardiologie des Attikon Hospital der Universität von Athen, Griechenland. Alle Patienten waren entweder bereits Träger eines ICD, bekamen *de novo* einen ICD implantiert oder ein altes Gerät ausgetauscht. Die Indikation zur Implantation des ICD wurde dabei nach aktuellen Richtlinien gestellt (Zipes et al. 2006). Unter den Patienten bekamen 168 (67%) einen ICD zur Primärprävention und 81 (33%) einen ICD zur Sekundärprävention. Das Alter der untersuchten Probanden reichte von 21 bis 86 Jahren, die Geschlechterverteilung belief sich auf 57 Frauen und 193 Männer. Das Patientenkollektiv wurde so zusammengestellt, dass die Menge an Patienten mit koronarer Herzerkrankung und/oder stattgehabtem STEMI nicht mehr als 60% und die Menge an Patienten mit Vorhofflimmern nicht mehr als 20% betrug. Die Indikation zur ICD-Implantation wurde am Häufigsten aufgrund einer ischämischen oder einer dilatativen Kardiomyopathie gestellt.

3.2 Gemessene Parameter in der Stichprobe

Tabelle 23 fasst die unter den Probanden erhobenen Parameter mit Einheiten, Mittelwerten, Standardabweichungen und Wertebereichen zusammen.

Tabelle 23: Gemessene Parameter in der Stichprobe. Fehlende Werte sind mit „na“ deklariert, fehlende Eintragungen mit „NA“.

Parameter	Einheit	Mittelwert /Häufigkeiten	Standardab- weichung +/-	Median (Bereich)
Alter	Jahre	62	13	63,7 (21,6-86,8)
Geschlecht				
<i>weiblich</i>		57		
<i>männlich</i>		193		
BMI	kg/m ²	28,4	5,5	28 (16,8-51,6)
NYHA-Klasse				
<i>I</i>		73		
<i>I-II</i>		22		
<i>II</i>		74		
<i>II-III</i>		34		
<i>III</i>		47		
LVEF	%	42	12,5	42,8 (15-72)
Nt-proBNP	ng/l	1345	2542	526 (5-20270)
Ventrikuläre Extrasystolen 24h		3133,0	7503,1	455 (0-73350)
NSVT 24h		7,3	50,7	0 (0-720)
SDRR	ms	112,5	44,1	108 (3-259,8)
RMSSD	ms	35,2	40,5	24,4 (3-433,8)
HRT onset	%	-0,3	2,3	-0,1 (-11,4-9,3)
HRT slope	ms/RR	5,4	5,6	3,3 (-0,3-35,2)
HRT-Kategorie				
<i>TO+TS normal</i>		69		
<i>TO oder TS abnormal</i>		61		
<i>TO+TS abnormal</i>		51		
<i>na</i>		50		
<i>NA</i>		19		
AC	ms	-7,7	8,23	-6 (-68,5-6,4)
DC	ms	1,1	7,08	2,7 (-40,5-12,7)

Parameter	Einheit	Mittelwert /Häufigkeiten	Standardab- weichung +/-	Median (Bereich)
VT-Induzierbarkeit				
<i>Nein</i>		186		
<i>Ja</i>		41		
<i>na</i>		2		
<i>NA</i>		2		
Induzierte Tachykardien				
<i>Kammerflimmern</i>		3		
<i>Monomorphe VT</i>		33		
<i>Polymorphe VT</i>		5		
<i>na</i>		2		
<i>NA</i>		188		
TWA max. neg. HF	(Schläge pro Minute)	103,6	14,5	106 (55-139)
TWA onset HF	(Schläge pro Minute)	98,5	11,1	100 (77-120)
TWA-Klassifikation				
<i>negativ</i>		53		
<i>positiv</i>		40		
<i>unbestimmt</i>		19		
<i>na</i>		1		
<i>NA</i>		118		
TWA-Amplitude in VM	µV	3,24	2,49	1,5 (0,4-14,2)
TWA max. Amplitude	µV	6,19	5,21	4,5 (0,7-26,3)
cQT- Zeit		460,4	51,1	270-632*
Herzfrequenz in Ruhe	(Schläge pro Minute)	64,1	10,3	36-105*

*Median nicht vorliegend.

3.3 Häufigkeiten der Genvarianten

Nach abgeschlossener Genotypisierung wurde geprüft, inwiefern die Häufigkeiten mit denen die Allelvarianten auftraten, den Gesetzen des Hardy-Weinberg-Equilibriums folgen. Hierbei ergaben sich für drei Polymorphismen, rs1805126 und rs11129795 auf *SCN5A* sowie rs1805123 auf *KCNH2* Abweichungen. Genotypenverteilungen, die nicht im Hardy-Weinberg-Equilibrium liegen, könnten z.B. dadurch zustande kommen, dass die Stichprobe für die

Population nicht repräsentativ ist oder, dass Fehler bei der Genotypisierung aufgetreten sind. Tabelle 24 stellt die Häufigkeiten der Genvarianten dar.

Tabelle 24: Häufigkeiten der Genvarianten.

Gen	rs- Nummer*	Wt- Base/ AS	Vt- Base/ AS	Wildtyp- Homozygot	Hetero- zygot	Variante- Homozygot	p (Hardy- Weinberg- Equilibrium)
HRC	Ser96Ala	Ser	Ala	84	113	53	0,43
PLN	11756438	T	G	54	119	77	0,82
	11153768	G	A	84	114	52	0,52
	3734381	T	C	57	130	63	0,81
	11153730	C	T	63	112	75	0,27
	11970286	C	T	82	117	51	0,74
	12210810	C	G	228	22	0	0,77
CSQ1	2275703	C	A	73	123	54	0,99
	617698	T	C	95	115	40	0,87
CSQ2	3010396	G	A	75	117	58	0,64
	7536370	A	C	116	110	24	0,96
CACNA1C	1051375	G	A	128	96	26	0,46
	1558322	T	C	126	100	23	0,89
RYR2	3766871	C	T	234	16	0	0,87
	72549415	C	T	246	4	0	0,99
	6678625	G	A	171	75	4	0,42
ADRB1	Ser49Gly	Ser	Gly	190	53	6	0,62
	Arg389Gly	Arg	Gly	132	102	16	0,82
ADRB2	Gly16Arg	Gly	Arg	92	115	43	0,79
	Gln27Glu	Gln	Glu	88	120	42	0,99
SCN5A	11710077	A	T	153	80	17	0,36
	1805124	A	G	139	92	19	0,79
	11708996	G	C	189	58	3	0,82
	3922844	A	G	120	101	29	0,56
	7638909	T	G	154	81	15	0,62
	1805126	T	C	124	91	35	0,03
	11129795	G	A	160	90	0	0,002
KCNH2	3807375	G	A	101	110	39	0,62
	1805123	A	C	147	79	24	0,03
	2968863	C	T	146	82	22	0,12
	3815459	C	T	143	91	16	0,96

Gen	rs- Nummer*	Wt- Base/ AS	Vt- Base/ AS	Wildtyp- Homozygot	Hetero- zygot	Variante- Homozygot	p (Hardy- Weinberg- Equilibrium)
KCNQ1	2237892	C	T	233	16	1	0,47
	12296050	T	C	157	83	10	0,97
	757092	G	A	109	104	37	0,34
NOS1AP	10918859	G	A	157	85	8	0,69
	12084280	C	G	207	40	3	0,80
ANK2	2107026	A	T	167	77	6	0,71

*Dargestellt sind der Genname, die rs-Nummer, die Wildtyp- und Variante-Base sowie der p-Wert des Hardy-Weinberg-Equilibriums. Soweit der Polymorphismus zu einem Aminosäureaustausch führte, sind an Stelle der Basen Wildtyp-Aminosäure und Variante-Aminosäure genannt.

3.4 Genetische Assoziationen

Die p-Werte der einzelnen Signifikanztests sind im Nachhinein zu adjustieren, um das multiple Testen zu berücksichtigen. Die Adjustierung wurde nach der Bonferroni-Holm-Methode vorgenommen. Hiernach fanden sich in der Untersuchung keine signifikanten Beziehungen zu den gemessenen Genvarianten, wenn man die p-Werte auf das multiple Testen adjustiert. Es fanden sich zwei Parameter welche mit adjustierten p-Werten von $\leq 0,11$ dieser berechneten Signifikanzniveau am nächsten sind. Hierbei handelte es sich zum einen um die Assoziation zwischen der Dezelerationskapazität im Langzeit-EKG und dem Genotyp in rs11708996 auf *SCN5A* bei einem nicht-adjustierten p-Wert von 0,003 und einem adjustierten p-Wert von 0,11. Zum anderen handelte es sich um die Assoziation zwischen der Dezelerationskapazität im Langzeit-EKG und dem Genotyp im Gln27Glu-Polymorphismus auf *ADRB2*. Der nicht-adjustierte p-Wert beträgt hier 0,003 und der adjustierte 0,09. Verzichtete man auf Adjustierung und nahm, wie in dieser Arbeit geschehen, ein Signifikanzniveau von 0,03 an, so fanden sich einige interessante Assoziationen. Diese eventuell in zukünftigen Untersuchungen weiter zu analysierenden Befunde sind im Folgenden dargestellt, hier beginnend mit den Assoziationen für Gene, die mit der Kalziumregulation zusammenhängen.

3.4.1 Assoziationen mit Polymorphismen aus den Genen der Kalziumhomöostase

Wie oben dargestellt, wurden insgesamt 37 Polymorphismen aus sechs Genen dieser Gruppe untersucht. In der statistischen Auswertung waren davon zehn Polymorphismen signifikant, jedoch kein Polymorphismus in *CSQ1/CASQ1* und *HRC*. Tabelle 25 fasst die Assoziationen dieser Polymorphismen mit der untersuchten phänotypischen Ausprägung zusammen.

Tabelle 25: Assoziationen mit Polymorphismen aus den Genen der Kalziumhomöostase. Die metrischen Parameter sind zunächst angegeben mit dem Mittelwert und der Standardabweichung (+/-), darauffolgend dem Median und letztlich dem Mindest- und Höchstwert. Weiterhin sind der p-Wert und in Klammern dahinter der nach Bonferroni-Holm adjustierte p-Wert angegeben. Fehlende Werte sind mit „na“ deklariert, fehlende Eintragungen mit „NA“.

Gen	rs-Nummer	Klinischer Parameter	Wildtyp-Homozygot	Heterozygot	Variante-Homozygot	p (adjustiert)	
PLN	rs11153768	NYHA-Klasse				0,02	
		I	24 (28,57%)	29 (25,44%)	20 (38,46%)	(0,73)	
		I-II	4 (4,76%)	14 (12,28%)	4 (7,69%)		
		II	32 (38,1%)	32 (28,07%)	10 (19,23%)		
		II-III	6 (7,14%)	17 (14,91%)	11 (21,15%)		
		III	18 (21,43%)	22 (19,3%)	7 (13,46%)		
		HRT-Kategorie				0,03	
		<i>TO+TS normal</i>	19 (34,55%)	40 (45,98%)	10 (25,64%)	(0,85)	
		<i>TO oder TS abnormal</i>	16 (29,09%)	23 (26,44%)	22 (56,41%)		
		<i>TO+TS abnormal</i>	20 (36,36%)	24 (27,59%)	7 (17,95%)		
		rs3734381	NYHA-Klasse				0,02
	I		17 (29,82%)	32 (24,62%)	24 (38,1%)	(0,66)	
	I-II		2 (3,51%)	15 (11,54%)	5 (7,94%)		
II	27 (47,37%)		34 (26,15%)	13 (20,63%)			
II-III	3 (5,26%)		20 (15,38%)	11 (17,46%)			
	III	8 (14,04%)	29 (22,31%)	10 (15,87%)			
	rs12210810	TWA-Amplitude VM (μV)	3,3+/-1,51 3 (0,5; 6,5)	4,75+/-2,69 3,95 (2,5; 8,6)	NA+/-NA NA (NA; NA)	0,03 (0,93)	
	rs11153730	SDRR (ms)	104,17+/-40,77 97 (18; 219)	111,2+/-42,25 108 (3; 259,75)	121,7+/-48,54 116 (23; 223)	0,03 (0,96)	

Gen	rs-Nummer	Klinischer Parameter	Wildtyp-Homozygot	Heterozygot	Variante-Homozygot	p (adjustiert)	
PLN	rs11756438	NYHA-Klasse				0,02 (0,67)	
		I	21 (38,89%)	32 (26,89%)	20 (25,97%)		
		I-II	2 (3,7%)	16 (13,45%)	4 (5,19%)		
		II	11 (20,37%)	32 (26,89%)	31 (40,26%)		
		II-III	11 (20,37%)	18 (15,13%)	5 (6,49%)		
		III	9 (16,67%)	21 (17,65%)	17 (22,08%)		
CSQ2	rs3010396	HRT-Kategorie				0,01 (0,29)	
		<i>TO+TS normal</i>	26 (48,15%)	34 (40,96%)	9 (20,45%)		
		<i>TO oder TS abnormal</i>	12 (22,22%)	28 (33,73%)	21 (47,73%)		
		<i>TO+TS abnormal</i>	16 (29,63%)	21 (25,3%)	14 (31,82%)		
		VT-Induzierbarkeit				0,03 (0,97)	
		<i>Nein</i>	47 (72,31%)	93 (85,32%)	46 (86,79%)		
		<i>Ja</i>	18 (27,69%)	16 (14,68%)	7 (13,21%)		
		TWA-Amplitude VM (µV)	3,01 +/-1,32 2,7 (1,5; 5,5)	3,69 +/-3,12 3 (0,4; 14,2)	2,61 +/-1,68 2 (0,5; 6,2)	0,03 (0,74)	
		TWA max. Amplitude (µV)	6,02 +/-2,44 6 (3; 9)	6,67 +/-5,25 4,6 (0,7; 19,4)	5,54 +/-6,36 3,8 (1; 26,3)	0,01 (0,39)	
		CACNA1C	rs1051375	induzierte Tachykardien			
<i>VF monomorph</i>	0 (0%) 1 (25%)			1 (4,76%) 19 (90,48%)	2 (12,5%) 13 (81,25%)		
<i>polymorph</i>	3 (75%)			1 (4,76%)	1 (6,25%)		
	rs1558322		LVEF (%)	37 +/-13,42 40 (15; 55)	41 +/-12,4 42 (15; 72)	43,88 +/-11,93 45 (17; 70)	0,03 (0,81)

Gen	rs-Nummer	Klinischer Parameter	Wildtyp-Homozygot	Heterozygot	Variante-Homozygot	p (adjustiert)
RYR2	rs72549415	TWA onset HF (bmp)	99,15 +/-10,88 100 (77; 120)	85,5 +/-7,78 85,5 (80; 91)	NA +/- NA NA (NA; NA)	0,01 (0,41)
		Herzfrequenz in Ruhe	64,31 +/-10,17 63 (42; 105)	52,75 +/-11,3 57,5 (36; 60)	NA +/-NA NA (NA; NA)	0,01 (0,19)
	rs6678625	Turbulence slope (ms/RR)	5.88 +/- 5.58 3.6 (-0.3, 28.35)	4.62 +/- 5.55 2.5 (-0.31, 35.2)	1.13 +/- 0.59 1.13 (0.72, 1.55)	0,01 (0,25)

3.4.1.1 Phospholamban (PLN)

Im Gen *PLN* fanden sich für 5 SNPs Assoziationen zwischen Genotyp und den Befunden der klinischen bzw. elektrophysiologischen Untersuchung. Zunächst wurde in rs11756438 eine Assoziation mit der NYHA-Klasse verzeichnet (vgl. Abbildung 12). Hierbei unterschritt der p-Wert mit 0,02 das Signifikanzniveau. Im selben Polymorphismus fand sich weiterhin eine Assoziation mit der HRT-Kategorie im Langzeit-EKG. Hier betrug der p-Wert 0,03. Für einen anderen SNP in *PLN*, rs3734381, fand sich eine Assoziation des Genotyps mit der NYHA-Klasse bei einem p-Wert von 0,02. Auch in rs12210810 bestand bei einem p-Wert von 0,03 eine Assoziation zwischen der TWA-Amplitude in der Ableitung VM und dem Genotyp. Weiterhin fand sich eine Assoziation zwischen dem Genotyp in rs11153730 und SDRR im Langzeit-EKG. Hierbei betrug der p-Wert 0,03. Zuletzt ist noch eine Assoziation zwischen der NYHA-Klasse und dem Genotyp in rs11756438 bei einem p-Wert von 0,02 zu beachten.

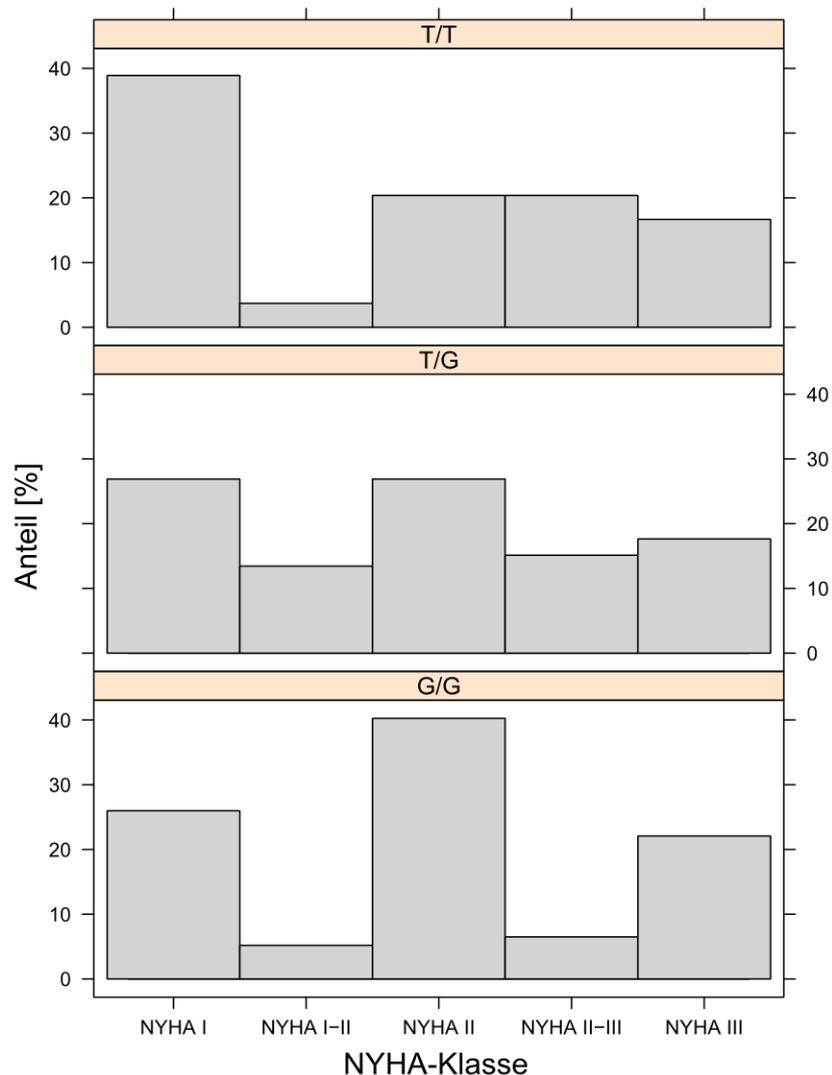


Abbildung 12: Assoziation zwischen dem Genotyp in rs11756438 auf *PLN* und der NYHA-Klasse. Die Säulen auf der x-Achse sind jeweils einer NYHA-Klasse zugeordnet sowie einem Genotyp zugeordnet. Auf der y-Achse ist der Anteil an Probanden mit den jeweiligen NYHA-Klassen prozentual aufgetragen. Der Genotyp T/T stellt hierbei den Wildtyp-Homozygoten, T/G den Heterozygoten und G/G den Variante-Homozygoten dar.

3.4.1.2 Calsequestrin 2 (*CASQ2/CSQ2*)

Im für Calsequestrin 2 kodierenden Gen *CSQ2* fanden sich für SNP rs3010396 vier Assoziationen zwischen elektrophysiologischen Parametern und dem Genotyp.

Zunächst betraf dies die Kategorie der Herzfrequenz-turbulenz bei einem p-Wert von 0,01.

Diese Assoziation wird in Abbildung 13 dargestellt. Weiterhin fanden sich Assoziationen zwischen Genotyp und sowohl der TWA-Amplitude in der Ableitung VM als auch der Induzierbarkeit von ventrikulären Tachykardien mit jeweils einem p-Wert von 0,03. Eine andere Assoziation fand sich zwischen dem Genotyp und der Kategorie der

Herzfrequenz-turbulenz. Hierbei betrug der p-Wert 0,01. Zuletzt sei beim selben SNP noch eine Assoziation zwischen Genotyp und der maximalen TWA-Amplitude in einer beliebigen anderen Ableitung als VM bei einem p-Wert von 0,01 bemerkt.

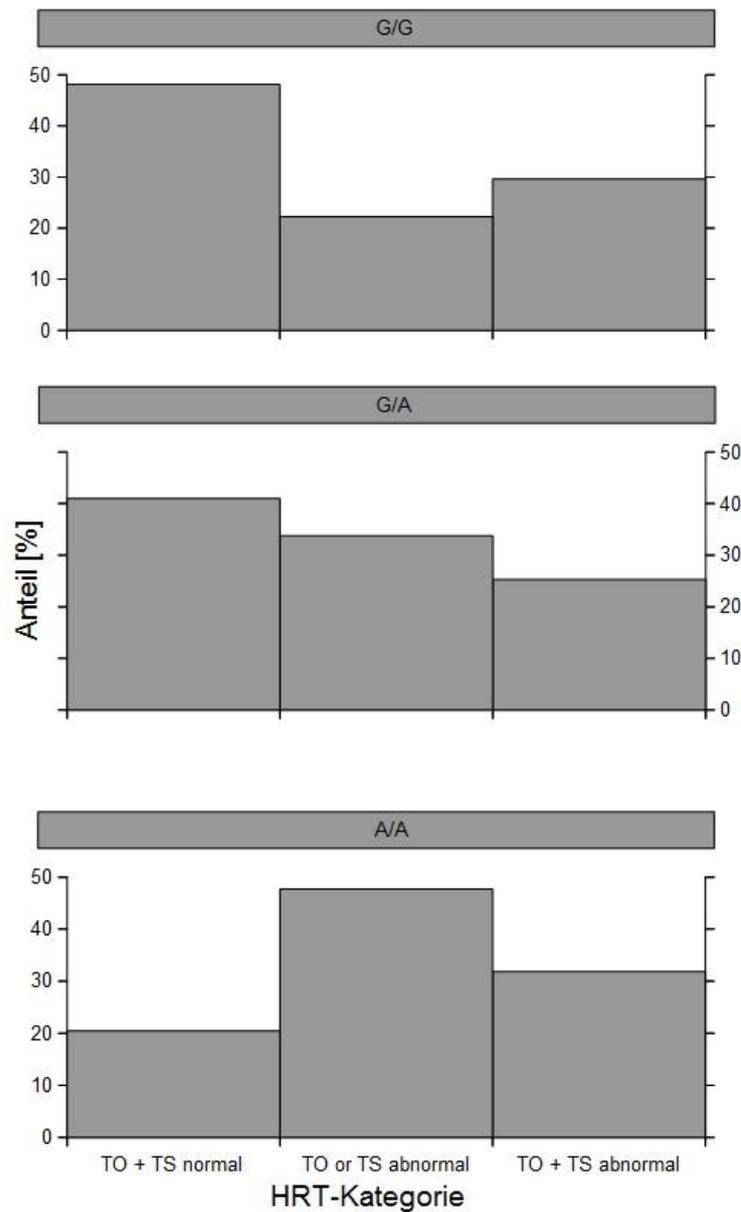


Abbildung 13: Assoziation zwischen dem Genotyp in rs3010396 in CSQ2 und der Kategorie der Herzfrequenz-turbulenz (HRT). Die Säulen auf der x-Achse sind jeweils einer Kategorie der Herzfrequenz-turbulenz zugeordnet sowie einem Genotyp zugeordnet. Beim Genotyp G/G handelt es sich dabei um den Wildtyp-Homozygot, bei G/A um den Heterozygoten und bei A/A um den Variante-Homozygot. Auf der y-Achse ist der Anteil an Probanden mit den jeweiligen Kategorien prozentual aufgetragen.

3.4.1.3 CACNA1C

Im Gen *CACNA1C* zeigten sich bei der Analyse zwei Assoziationen zwischen Genotyp und Phänotyp bei 2 SNPs. Die erste Assoziation fand sich für rs1051375. Hier ist eine Assoziation zwischen der Art induzierter Tachykardie und dem Genotyp darzustellen, bei einem p-Wert von 0,03. Die zweite Assoziation fand sich zwischen dem Genotyp in rs1558322 und der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) der Probanden bei einem p-Wert von 0,03.

3.4.1.4 Ryanodin2-Rezeptor (RYR2)

Für 2 Polymorphismen im Gen des Ryanodin2-Rezeptor fanden sich Assoziationen mit den in dieser Arbeit erhobenen klinischen beziehungsweise elektrophysiologischen Parametern. Hierbei war der Genotyp in rs72549415 sowohl mit der Herzfrequenz, bei der ein TWA-onset auftritt, als auch mit der Herzfrequenz in Ruhe bei einem p-Wert von jeweils 0,01 assoziiert. Für diesen Polymorphismus fand sich kein Variante-Homozygot unter den Probanden. Weiterhin war der Genotyp in rs6678625 mit dem *turbulence slope* bei einem p-Wert von 0,01 signifikant.

3.4.2 Assoziationen mit Polymorphismen aus Genen der β -adrenergen Stimulation am Herzen

In der Gruppe aus Genen der β -adrenergen Stimulation des Herzens wurden je 2 Polymorphismen aus *ADRB1* und *ADRB2* analysiert, wobei sich für insgesamt drei Polymorphismen signifikante Assoziationen fanden. Tabelle 26 fasst die Assoziationen dieser Polymorphismen mit der untersuchten phänotypischen Ausprägung zusammen.

Tabelle 26: Assoziationen mit Polymorphismen aus den Genen der β -adrenergen Stimulation am Herzen. Die metrischen Parameter sind zunächst angegeben mit dem Mittelwert und der Standardabweichung (+/-), darauffolgend dem Median und letztlich dem Mindest- und Höchstwert. Weiterhin sind der p-Wert und in Klammern dahinter der nach Bonferroni-Holm adjustierte p-Wert angegeben. Fehlende Werte sind mit „na“ deklariert, fehlende Eintragungen mit „NA“.

Gen	AS-Austausch	Klinischer Parameter	Wildtyp-Homozygot	Heterozygot	Variante-Homozygot	P (adjustiert)
ADRB1	Arg389Gly	TWA onset HF (bmp)	104,59 +/-12,7 107 (80; 139)	101,15 +/-16,51 100,5 (55,120)	105,57 +/-20,54 120 (68; 120)	0,02 (0,57)
ADRB2	Gly16Arg	Holter HRT Kategorie <i>TO+TS normal</i>	11 (25,58%)	38 (33,04%)	20 (21,74%)	0,02 (0,51)
		<i>TO oder TS abnormal</i>	9 (20,93%)	21 (18,26%)	31 (33,7%)	
		<i>TO+TS abnormal</i>	13 (30,23%)	26 (22,61%)	12 (13,02%)	
		<i>na</i>	7 (16,28%)	21 (18,26%)	22 (23,91%)	
		<i>NA</i>	3 (6,98%)	9 (7,83%)	7 (7,61%)	
	Gln27Glu	Holter AC (ms)	-6,25 +/-3,74 -5,57 (-18,74; 1,45)	-8,54 +/-10,64 -5,99 (-68,45; 3,67)	-8,06 +/-6,22 -7,08 (-28,47; 6,37)	0,01 (0,34)
		Holter DC (ms)	2,71 +/-4,04 3 (-11,47; 8,94)	0,48 +/-8,77 2,57 (-40,53; 12,71)	0 +/-5,8 2,13 (-13,13; 8,05)	0,003 (0,09)

3.4.2.1 β_1 -adrenerger Rezeptor (*ADRB1*)

Für *ADRB1* fand sich einzigst eine signifikante Assoziation zwischen dem Arg389Gly-Polymorphismus und der Onset-Herzfrequenz, bei der ein Daueralternans auftritt. Das Signifikanzniveau betrug hierbei 0,02. Für einen anderen Polymorphismus auf diesem Gen, Ser49Gly, fanden sich keinerlei signifikante Assoziationen mit den hier verwendeten klinischen Parametern.

3.4.2.2 β_2 -adrenerger Rezeptor (*ADRB2*)

Unter den beiden untersuchten Polymorphismen im Gen *ADRB2* fanden sich insgesamt 3 Assoziationen mit den erhobenen elektrophysiologischen Parametern.

Zunächst ließ sich bei einem p-Wert von 0,02 eine Assoziation zwischen dem Genotyp im Gly16Arg-Polymorphismus und der Kategorie der Herzfrequenz-turbulenz feststellen.

Für den Gln27Glu-Polymorphismus fanden sich 2 signifikante Assoziationen. So war hier der Genotyp mit der Akzelerationskapazität im Langzeit-EKG bei einem p-Wert von 0,01 assoziiert. Weiterhin war die Assoziation zwischen dem Genotyp im selben Polymorphismus und der Dezelerationskapazität im Langzeit-EKG bei einem p-Wert von 0,003 signifikant. Hier betrug der adjustierte p-Wert 0,09. Abbildung 14 zeigt die Verteilung der Werte für die Dezelerationskapazität unter den Genotypen.

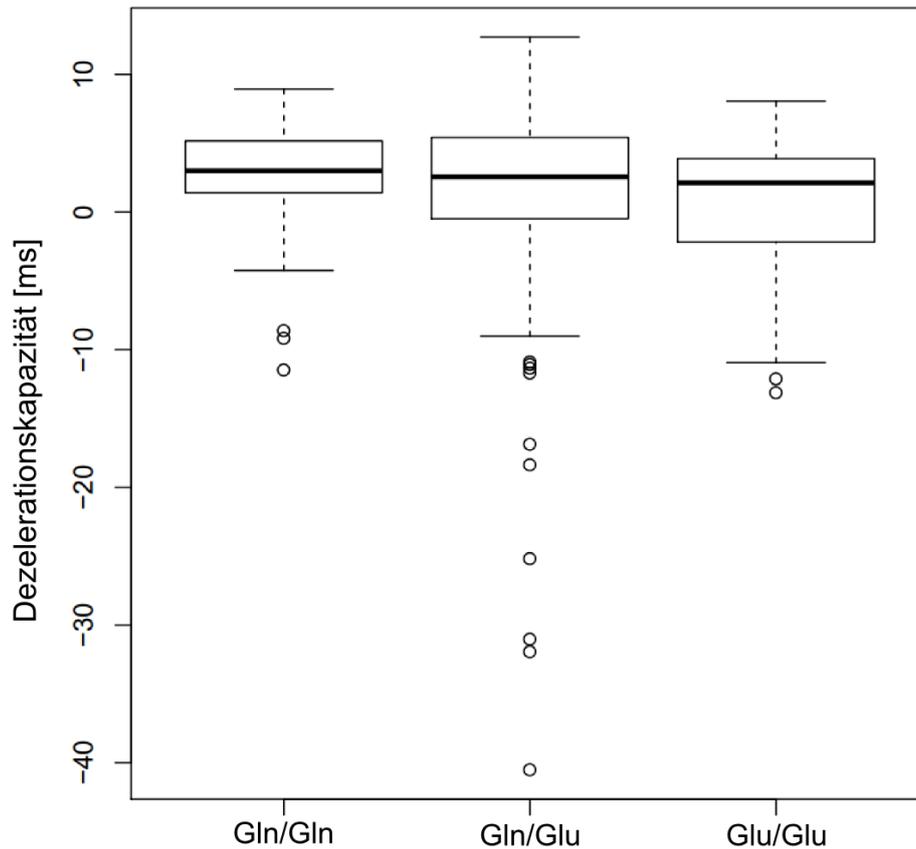


Abbildung 14: Assoziation zwischen der Dezelerationskapazität im Langzeit-EKG und dem Genotyp im Gln27Glu-Polymorphismus. Auf der y-Achse findet sich die Dezelerationskapazität in Millisekunden aufgetragen. Auf der x-Achse sind die Genotypen in der Reihenfolge Wildtyp-Homozygot, Heterozygot und Variante-Homozygot aufgetragen.

3.4.3 Assoziationen mit Polymorphismen in Genen der kardialen elektrischen Erregung

In dieser Arbeit wurden insgesamt 14 Polymorphismen in 3 Genen analysiert, deren Expression eine Rolle in der kardialen elektrischen Erregung spielen. Hierbei fanden sich insgesamt 12 Assoziationen bei Polymorphismen auf *SCN5A* und *KCNQ1*. Tabelle 27 fasst die Assoziationen dieser Polymorphismen mit den untersuchten phänotypischen Ausprägungen zusammen.

Tabelle 27: Assoziationen mit Polymorphismen in Genen der kardialen elektrischen Erregung. Die metrischen Parameter sind zunächst angegeben mit dem Mittelwert und der Standardabweichung (+/-), darauffolgend dem Median und letztlich dem Mindest- und Höchstwert. Weiterhin sind der p-Wert und in Klammern dahinter der nach Bonferroni-Holm adjustierte p-Wert angegeben.

Gen	rs-Nummer	Klinischer Parameter	Wildtyp-Homozygot	Heterozygot	Variante-Homozygot	p (adjustiert)	
SCN5A	rs3922844	Holter SDRR (ms)	136,44 +/- 38,9 136 (65; 211)	110,71 +/- 43,62 106 (3; 215)	108,66 +/- 44,39 105 (18; 259,75)	0,02 (0,61)	
		Holter RMSSD (ms)	53,85 +/- 37,66 48 (11; 167,48)	34,25 +/- 50,56 23 (3; 433,8)	31,62 +/- 29,64 24 (3; 227,52)	0,03 (1)	
		NoninvEP induzierte Tachykardie				0,01 (0,32)	
			<i>VF</i>	2 (66,67%)	1 (4,76%)	0 (0%)	
			<i>monomorph</i>	1 (33,33%)	18 (85,71%)	14 (82,35%)	
			<i>polymorph</i>	0 (0%)	2 (9,52%)	3 (17,65%)	
		rs11708996	TWA max. Amplitude (µV)	6,63 +/- 3,82 6,5 (1,5; 21)	5,49 +/- 2,9 5,5 (1,5; 12,5)	6,75 +/- 3,18 6,75 (4,5; 9)	0,03 (0,91)
			Holter HRT Kategorie				0,03 (0,89)
			<i>TO+TS normal</i>	52 (38,81%)	17 (37,78%)	0 (0%)	
			<i>TO oder TS abnormal</i>	50 (37,31%)	11 (24,44%)	0 (0%)	
		<i>TO+TS abnormal</i>	32 (23,88%)	17 (37,78%)	2 (100%)		
		Holter DC (ms)	1,75 +/- 6,3 3,07 (-40,53; 12,71)	-0,17 +/- 8,12 1,56 (-31,95; 8,57)	-11,61 +/- 19,2 -11,61 (25,19; 1,97)	0,003 (0,11)	
	rs1805126	Holter DC (ms)	0,57 +/- 7,08 2,29 (-40,53; 12,71)	1,37 +/- 6,98 2,92 (-31,95; 9,09)	2,66 +/- 7,38 4,42 (-25,19; 8,57)	0,01 (0,21)	
	rs1805124	Holter PVC 24h	1875,16 +/- 4194,08 341 (1; 30077)	4271,58 +/- 7716,26 949 (0; 38205)	7133,88 +/- 17998,26 1685 (4; 73347)	0,03 (0,86)	

Gen	rs- Nummer	Klinischer Parameter	Wildtyp- Homozygot	Heterozygot	Variante- Homozygot	p (adjustiert)
SCN5A	rs11710077	Holter NSVT 24h	7,11+/-58,87 0 (0; 720)	6,59+/-33,92 0 (0; 291)	12,71+/- 36,57 0 (0; 150)	0,03 (0,81)
	rs7638909	Nt-proBNP (ng/l)	1313,53+/- 2834,04 433 (5; 20273)	1500,98+/- 1990,95 956 (12; 9752)	707,25+/- 1167,42 151 (35; 3432)	0,03 (0,96)
KCNQ1	rs2237892	NoninvEP induzierte Tachykardie				0,03 (0,85)
		VF	3 (7,5%)	0 (0%)	0 (NA)	
		monomorph	33 (82,5%)	0 (0%)	0 (NA)	
		polymorph	4 (10%)	1 (100%)	0 (NA)	

3.4.3.1 SCN5A

Im Gen *SCN5A* fanden sich für 11 Polymorphismen signifikante Assoziationen mit den erhobenen klinischen Parametern. Zunächst sei eine bei einem p-Wert von 0,02 signifikante Assoziation zwischen dem Genotyp in rs3922844 und einem Parameter der Herzfrequenzvariabilität, der SDRR, beschrieben. Für den selben Polymorphismus fand sich weiterhin eine signifikante Assoziation mit einem weiteren Parameter der Herzfrequenzvariabilität, nämlich der RMSSD. Hier betrug der p-Wert 0,03. Eine dritte signifikante Assoziation fand sich zwischen diesem Polymorphismus und der Art von induzierter Tachykardie. Der p-Wert hierfür betrug 0,01.

Weiterhin wurde eine Assoziation zwischen dem Polymorphismus rs11708996 und der maximalen Amplitude in einer beliebigen Brustwandableitung außer VM bei positivem Alternans gefunden. Für diese Assoziation war der p-Wert bei 0,03 innerhalb des festgelegten Signifikanzniveaus. Für den selben Polymorphismus zeigte sich weiterhin eine bei p=0,03 signifikante Assoziation mit der Herzfrequenz-turbulenz-Kategorie im Langzeit-EKG und eine bei 0,003 signifikante Assoziation mit der Dezelerationskapazität im Langzeit-EKG. Bei Letzterer betrug der adjustierte p-Wert 0,11. Abbildung 15 stellt diese Assoziation dar.

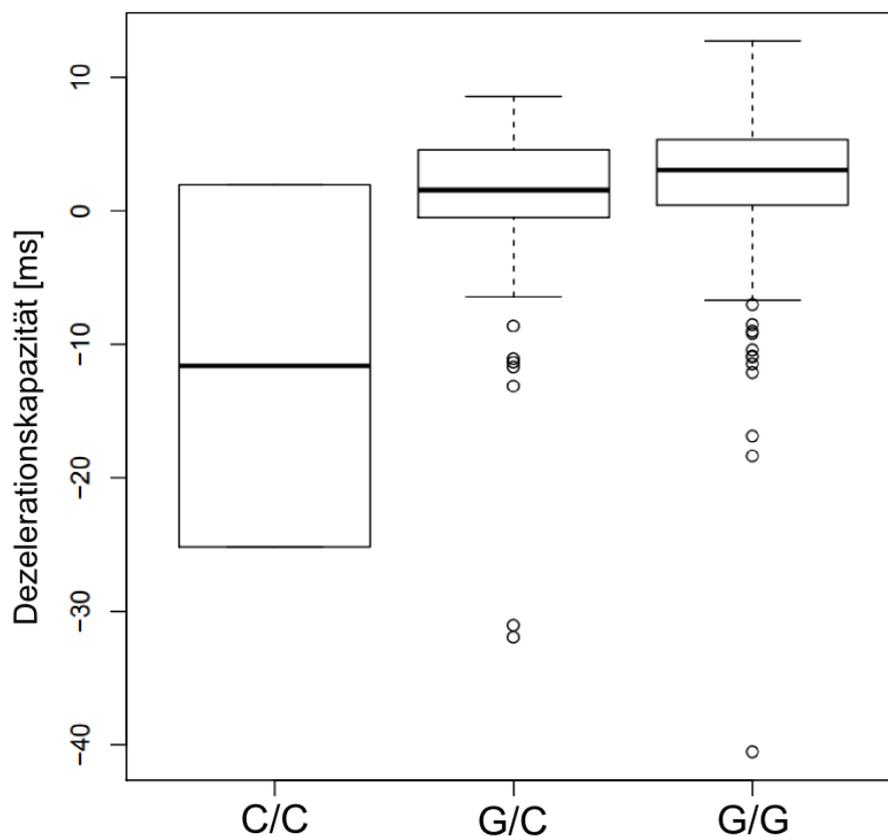


Abbildung 15: Assoziation zwischen der Dezelerationskapazität im Langzeit-EKG und dem Genotyp in rs11708996. Auf der y-Achse findet sich die Dezelerationskapazität in Millisekunden aufgetragen. Auf der x-Achse sind die Genotypen in der Reihenfolge Variante-Homozygot, Heterozygot und Wildtyp-Homozygot aufgetragen.

Eine weitere Assoziation fand sich zwischen dem Polymorphismus rs1805126 und der Dezelerationskapazität im Langzeit-EKG bei einem p-Wert von 0,01. Abbildung 16 stellt die Daten dar, die die Assoziation aufzeigen.

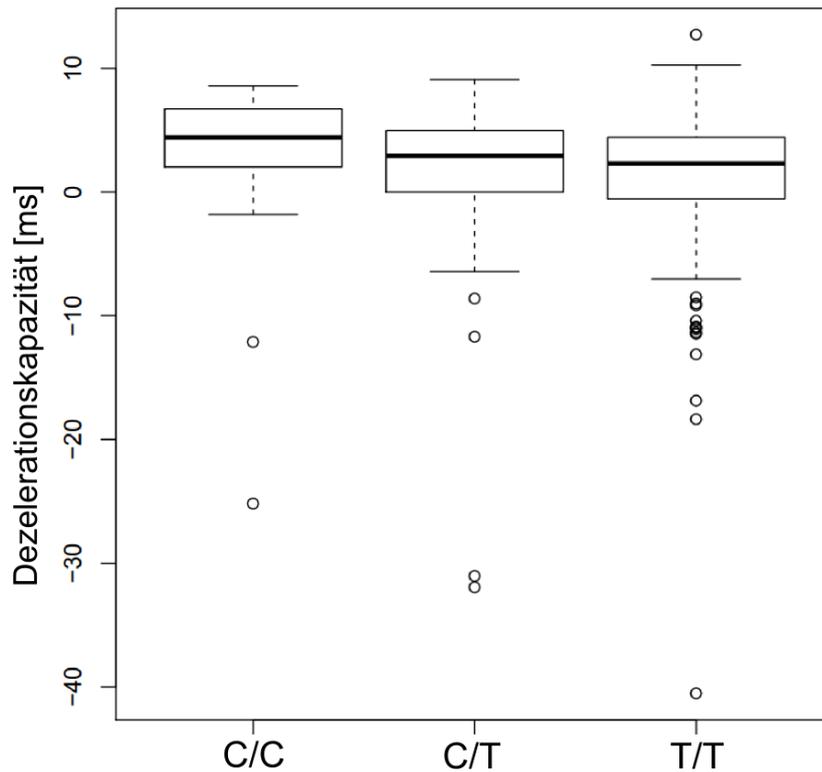


Abbildung 16: Assoziation zwischen der Dezelerationskapazität im Langzeit-EKG und dem Genotyp in rs1805126. Auf der y-Achse findet sich die Dezelerationskapazität in Millisekunden aufgetragen. Auf der x-Achse sind die Genotypen in der Reihenfolge Variante-Homozygot, Heterozygot und Wildtyp-Homozygot aufgetragen.

Des weiteren zeigte sich eine bei einem p-Wert von 0,03 signifikante Assoziation zwischen dem Polymorphismus rs1805124 und der Anzahl ventrikulärer Extrasystolen im Langzeit-EKG. Zwischen dem Polymorphismus rs11710077 und der Zahl nicht-anhaltender ventrikulärer Tachykardien im Langzeit-EKG fand sich außerdem eine signifikante Assoziation mit dem Nt-proBNP-Wert. Hierfür betrug der p-Wert 0,03.

3.4.3.2 *KCNQ1*

In dieser Arbeit wurden drei Polymorphismen in *KCNQ1* hinsichtlich Assoziationen mit den gemessenen Parametern analysiert. Lediglich bei einem Polymorphismus, rs2237892, wurde eine Assoziation verzeichnet. Bei einem p-Wert von 0,03 war hier die Art einer induzierten Tachykardie mit dem Genotyp in diesem Polymorphismus assoziiert.

3.4.4 Assoziationen mit Polymorphismen in *nitric oxidase synthase-1 adaptorprotein (NOS1AP)*

In dieser Arbeit wurden zwei SNPs in *NOS1AP* analysiert, von denen zu einem eine Assoziation mit einem elektrophysiologischen Parameter ausgemacht werden konnte. Tabelle 28 zeigt diese Assoziation.

Tabelle 28: Assoziation mit einem Polymorphismus in *NOS1AP*. Die metrischen Parameter sind zunächst angegeben mit dem Mittelwert und der Standardabweichung (+/-), darauffolgend dem Median und letztlich dem Mindest- und Höchstwert. Weiterhin sind der p-Wert und in Klammern dahinter der nach Bonferroni-Holm adjustierte p-Wert angegeben.

Gen	rs-Nummer	Klinischer Parameter	Wildtyp-Homozygot	Heterozygot	Variante-Homozygot	p (adjustiert)
NOS1AP	rs12084280	Holter SDRR (ms)	108,5+/-42,21 105 (3; 219)	133,31+/-50,24 126 (58; 259,75)	123,33+/-28,02 132 (92, 146)	0,01 (0,24)

3.4.4.1 NO-Synthetase-1-Adapterprotein (*NOS1AP*)

Für den Polymorphismus rs12084280 in *NOS1AP* fand sich eine signifikante Assoziation bei einem p-Wert von 0,01. Diese konnte zwischen dem Genotyp und der Standardabweichung aller RR-Intervalle im Langzeit-EKG ausgemacht werden. In Abbildung 17 stellt die Daten dar, die diese Assoziation aufzeigen.

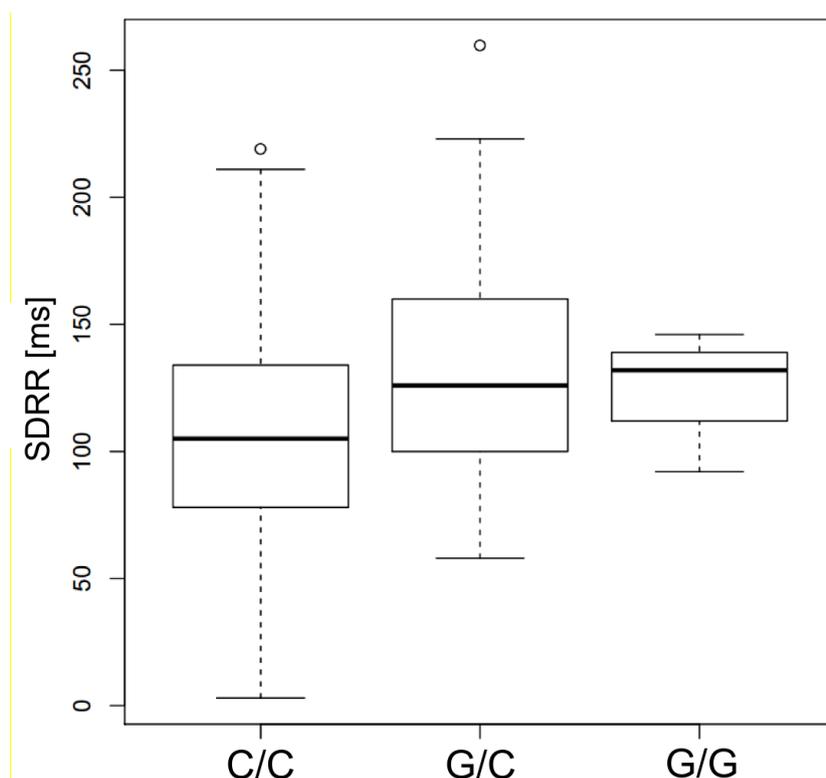


Abbildung 17: Assoziation zwischen der Standardabweichung aller RR-Intervalle im Langzeit-EKG und dem Genotyp in rs12084280. Auf der y-Achse findet sich die Dezelerationskapazität in Millisekunden aufgetragen. Auf der x-Achse sind die Genotypen in der Reihenfolge Wildtyp-Homozygot, Heterozygot und Variante-Homozygot aufgetragen.

3.4.5 Assoziationen mit Polymorphismen in Genen des kardiomyozytären Zytoskeletts

Von Genen des kardiomyozytären Zytoskeletts wurde lediglich ein Gen, *ANK2* und darin ein Polymorphismus analysiert. Hierbei zeigte sich eine Assoziation auf signifikantem Niveau.

3.4.5.1 Ankyrin2 (*ANK2*)

Im Gen *ANK2* wurde rs2107026 analysiert. Dabei zeigte sich eine Assoziation zwischen dem Genotyp und der maximalen Amplitude in der Ableitung VM bei positivem T-Wellen-Alternans. Hierfür betrug der p-Wert 0,03.

Eine zweite Assoziation findet sich bei einem p-Wert von 0,03 zwischen demselben Polymorphismus und der Standardabweichung aller RR-Intervalle im Langzeit-EKG. Tabelle 29 zeigt die Assoziationen dieses Polymorphismus mit den elektrophysiologischen Parametern.

Tabelle 29: Assoziationen mit Polymorphismen in *ANK2*. Die metrischen Parameter sind zunächst angegeben mit dem Mittelwert und der Standardabweichung (+/-), darauffolgend dem Median und letztlich dem Mindest- und Höchstwert. Weiterhin sind der p-Wert und in Klammern dahinter der nach Bonferroni-Holm adjustierte p-Wert angegeben.

Gen	rs-Nummer	Klinischer Parameter	Wildtyp-Homozygot	Heterozygot	Variante-Homozygot	p (adjustiert)
ANK2	rs2107026	TWA Amplitude VM (μV)	3,24+/-1,5 3 (0,5; 6,5)	3,63+/-1,86 3,2 (1,2; 8,6)	4,25+/-0,35 4,25 (4; 4,5)	0,03 (1)
		Holter SDRR (ms)	116,29+/-46,06 114 (3; 259,75)	106,9+/-40,11 107 (24; 223)	79,6+/-11,01 79 (65; 96)	0,03 (1)

4 Diskussion

4.1 Übersicht über die Ergebnisse

Nach Adjustierung der p-Werte bezüglich multiplen Testens zeigten sich keine statistisch signifikanten Assoziationen zwischen dem Genotyp und den klinischen bzw. elektrophysiologischen Parametern. Nachdem die elektrophysiologischen Parameter als Risikofaktoren für den plötzlichen Herztod ausgewählt wurden kann man den Schluss ziehen, dass die in dieser Arbeit untersuchten Allelvarianten keinen Einfluss auf das Auftreten des plötzlichen Herztods ausüben, oder zumindest keinen erheblichen, der an 250 Patienten zu erkennen wäre. Möglich ist aber auch, dass die angewandten klinischen bzw. elektrophysiologischen Parameter einen nur relativ geringen prädiktiven Wert für das Risiko des plötzlichen Herztods haben.

Allerdings fanden sich, wenn man auf eine Adjustierung der p-Werte verzichtet, mehrere Assoziationen bei einem angenommenen Signifikanzniveau von 0,03. Dies betraf insgesamt 35 SNPs in den Genen *PLN*, *CACNA1C*, *RYR2*, *ADRB1*, *ADRB2*, *SCN5A*, *KCNQ1*, *CSQ2*, *NOS1AP* und *ANK2*. Weder bei Adjustierung, noch bei Nicht-Adjustierung der p-Werte fanden sich jedoch in Polymorphismen von *CSQ1*, *KCNH2* und *HRC* signifikante Assoziationen.

Besonders interessant waren zwei Assoziationen, bei denen die adjustierten p-Werte nahe dem hierfür angenommenen Signifikanzniveau von 0,05 sind. Dies betraf zum einen eine Assoziation zwischen dem Genotyp im Gln27Glu-Polymorphismus auf *ADRB2* und der Dezelerationskapazität im Langzeit-EKG. Diese Assoziation war bei einem nicht-adjustierten p-Wert von 0,003 signifikant. Der adjustierte p-Wert war mit 0,09 dem angenommenen Signifikanzniveau nahe.

Bei der zweiten interessanten Assoziation handelte es sich um eine solche zwischen dem Polymorphismus rs11708996 auf *SCN5A* und der Dezelerationskapazität im Langzeit-EKG.

Diese war bei einem nicht-adjustierten p-Wert von 0,003 signifikant. Der adjustierte p-Wert war bei 0,11 nahe des angenommenen Signifikanzniveaus.

4.2 Genotypenhäufigkeiten: Eigene Daten und Literaturdaten im Vergleich

Die meisten Minor-Allelfrequenzen (MAF), die in der Literatur angegeben wurden, lagen nahe an den in dieser Arbeit gefundenen Werten. Für manche SNPs fanden sich in der Literatur keine Angaben zur Minor-Allelfrequenz, es wurde dann mit den Daten der HapMap Datenbank für Probanden europäischer Abstammung verglichen. Es wurde untersucht, ob die Genotypenverteilung den Regeln des Hardy-Weinberg-Equilibriums folgte. Unter den 37 untersuchten SNPs erfüllten die Genotypenhäufigkeiten von 3 SNPs in der einzelnen Betrachtung nicht die Bedingungen für das Hardy-Weinberg-Equilibrium. Dies betraf die SNPs rs1805126 und rs11129795 auf *SCN5A* sowie rs1805123 auf *KCNH2*. Die Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Equilibrium sind für alle SNPs betrachtet nicht signifikant, da auch hier das Prinzip des multiplen Testens beachtet werden muss. Es liegt kein p-Wert unterhalb des nach einfachem Bonferroni-Verfahrens ermittelten Signifikanzniveaus von 0,00135. Genotypenverteilungen, die nicht im Hardy-Weinberg-Equilibrium liegen, könnten z.B. dadurch zustande kommen, dass die Stichprobe für die Population nicht repräsentativ ist, oder dass Fehler bei der Genotypisierung aufgetreten sind. Tabelle 30 zeigt die ermittelten und in der Literatur beschriebenen Häufigkeiten der Genotypen im Vergleich.

Tabelle 30: Eigene Daten und Literaturdaten über Genotypenhäufigkeit im Vergleich.

Gen	SNP	Literaturangabe	MAF (Literatur)	Ermittelte MAF
Gene der Kalziumhomöostase				
HRC	Ser96Ala	Arvanitis et al. 2008		0,44
PLN	rs11756438	Newton-Cheh 2009	0,47	0,54
	rs11153768	Vasan et al. 2009	0,47	0,44
	rs3734381		0,43*	0,51
	rs11153730	Sotoodehnia et al. 2010	0,49	0,52
	rs11970286	Pfeufer et al. 2010	0,49	0,44
	rs12210810	Pfeufer et al. 2010	0,07	0,04
CSQ1	rs2275703	Fu et al. 2004	0,5	0,46
	rs617698	Fu et al. 2004	0,35	0,39
CSQ2	rs7536370	Westaway et al. 2011	0,34	0,32
	rs3010396	Westaway et al. 2011	0,46	0,46
CACNA1C	rs1051375	Beitelshees et al. 2009	1*	0,29
	rs1558322	Westaway et al. 2011	0,28	0,29
RYR2	rs3766871	Arvanitis et al. 2010	0,04*	0,03
	rs72549415		**	0,01
	rs6678625	Westaway et al. 2011	0,15	0,17
Gene der kardialen β-adrenergen Stimulation				
ADRB1	Ser49Gly	Nicoulina et al. 2010	**	0,13
	Arg389Gly	Leineweber und Heusch 2009	0,31*	0,27
ADRB2	Gly16Arg	Leineweber und Heusch 2009	**	0,4
	Gln27Glu	Leineweber und Heusch 2009	0,47	0,4
Gene der elektrischen Herzerregung				
SCN5A	rs11710077	Sotoodehnia et al. 2010	0,2	0,23
	rs1805124	Gouas et al. 2005	0,18	0,26

Gen	SNP	Literaturangabe	MAF (Literatur)	Ermittelte MAF
	rs11708996	Sotoodehnia et al. 2010	0,2	0,13
SCN5A	rs3922844	Smith et al. 2011	0,27*	0,32
	rs7638909	Smith et al. 2009	0,4*	0,22
	rs1805126	Gouas et al. 2005	0,32	0,32
	rs11129795	Pfeufer et al. 2010	0,25	0,18
KCNH2	rs3807375	Newton-Cheh et al. 2007	0,38	0,38
	rs1805123	Newton-Cheh et al. 2007	0,24	0,25
	rs2968863	Pfeufer et al. 2010	0,23	0,25
	rs3815459	Pfeufer et al. 2010	0,5	0,25
KCNQ1	rs2237892	Westaway et al. 2011	0,38	0,04
	rs12296050	Pfeufer et al. 2010	0,19	0,21
	rs757092	Pfeufer et al. 2010	0,18	0,36
Gene kardialer Strukturpoteine				
ANK2	rs2107026	Westaway et al. 2011	0,16	0,18
Sonstige Gene				
NOS1AP	rs10918859	Westaway et al. 2011	0,19	0,2
	rs12084280	Westaway et al. 2011	0,11	0,1

*Vergleich mit HapMap-Datenbank für Probanden europäischer Abstammung

** kein Vergleich mit der HapMap-Datenbank verfügbar

4.3 Assoziationen mit Genvarianten der Kalziumhomöostase

4.3.1 Histidine-rich calcium binding protein (HRC)

In dieser Arbeit fanden sich keine signifikanten Assoziationen zwischen Polymorphismen in *HRC* und den klinischen, bzw. elektrophysiologischen, Parametern. Arvanitis et al. fanden allerdings eine statistisch signifikante Assoziation zwischen der Ala-Variante im Ser96Ala-Polymorphismus und lebensbedrohlichen ventrikulären Arrhythmien und plötzlichem

Herztod bei Patienten mit idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie (Arvanitis et al. 2008). Diese Arbeit konnte keine derartige Assoziation oder einen Hinweis auf mögliche Zusammenhänge liefern.

4.3.2 Phospholamban (*PLN*)

Die Assoziationen, die bei SNPs in *PLN* gefunden wurden, betrafen die NYHA-Klasse, die Kategorie der Herzfrequenz-turbulenz im Langzeit-EKG sowie die Standardabweichung aller RR-Intervalle im Langzeit-EKG und der TWA-Amplitude in der Ableitung VM.

In der Literatur wird hier eine Assoziation zwischen einer Variante des SNP rs11756438 in der Nähe von *PLN* und längerer QT-Intervalllänge beschrieben (Newton-Cheh 2009). Weiterhin ist eine Mutation in *PLN* beschrieben, die zur erblichen dilatativen Kardiomyopathie führt (Schmitt et al. 2003). Sowohl die vergrößerte QT-Intervalllänge als auch die dilatative Kardiomyopathie begünstigen das Auftreten kardialer Arrhythmien. Jedoch wurde in dieser Arbeit keine Assoziation zwischen Genotypen in *PLN* und der frequenzadaptierten QT-Zeit gefunden. Auch fand sich keine relevante Publikation, die Allelvarianten in *PLN* mit genau den in dieser Arbeit angewandten elektrophysiologischen Parametern, zur Risikostratifizierung des plötzlichen Herztods nutzen und sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit vergleichen ließen.

4.3.3 Calsequestrin 1 (*CSQ1/CASQ1*)

Die Analysen der Polymorphismen in *CSQ1* ergaben keinerlei signifikante Assoziationen mit den hier gemessenen Parametern, weder bei adjustierten noch bei nicht-adjustierten p-Werten.

In mehreren Publikationen wurden bei Allelvarianten von SNPs in diesem Gen Assoziationen mit Typ-2-Diabetes gefunden, welche sich gut mit der funktionellen Rolle des Proteins bei der Glucoseaufnahme in die Muskelzelle vereinbaren lässt (Das et al. 2004; Fu et al. 2004). Eine Assoziation mit Merkmalen, die mit dem Typ-2-Diabetes korrelieren, wie etwa dem BMI, wäre zu erwarten gewesen. Jedoch wurde in dieser Arbeit keine solche Assoziation ausgemacht.

4.3.4 Calsequestrin 2 (CSQ2/CASQ2)

Lediglich ein Polymorphismus in CSQ2, rs3010396, weist Assoziationen mit elektrophysiologischen Parametern auf. Zum einen gibt es eine Assoziation mit der Kategorie der Herzfrequenz-turbulenz und zum anderen eine Assoziation mit der Induzierbarkeit ventrikulärer Tachykardien. Auffällig ist, dass zwei Assoziationen mit Parametern des T-Wellen-Alternans ausgemacht werden konnten, nämlich mit der TWA-Amplitude in Ableitung VM und der maximalen Amplitude in einer beliebigen anderen Ableitung, wenn der TWA-Test positiv ausgefallen war.

Dies ist insofern interessant, als ein pathologischer T-Wellen-Alternans über eine gestörte Kalziumhomöostase am Myozyten Ausdruck einer gestörten Repolarisation am Kardiomyozyten sein kann (Arvanitis et al. 2010). Hierzu ist in der Literatur weiterhin beschrieben, dass das Auftreten eines TWA bei geringeren Ryanodinkonzentrationen eher unterdrückt wird. Da Calsequestrin 2 zusammen mit dem Ryanodin2-Rezeptor, Triadin und dem *histidine-rich calcium binding protein* einen quaternären Wirkkomplex bildet, sind Auswirkungen von Polymorphismen in CSQ2 auf Parameter des T-Wellenalternans denkbar. Weiterhin ist in der Literatur eine signifikante Assoziation zwischen Allelvarianten in diesem SNP und dem plötzlichen Herztod beschrieben (Westaway et al. 2011).

4.3.5 CACNA1C

In der Literatur sind Assoziationen zwischen SNPs auf CACNA1C, welches für eine α -Untereinheit des L-Typ-Kalziumkanals kodiert, und syndromalen QT-Verlängerungen beschrieben (vgl. 1.4.11). Im SNP rs1051375 fand sich in dieser Arbeit eine Assoziation zwischen der Allelvariante und der Art von induzierten Tachykardien. Hier ist ein funktioneller Zusammenhang zwischen Genotyp und Phänotyp gut denkbar, da syndromale QT-Verlängerungen das Risiko für kardiale Rhythmusstörungen erhöhen. Es ist beschrieben, dass *missense*-Mutationen in diesem Gen zum Long-QT-Syndrom vom Typ 8 führten (Camm et al. 2006). Weiterhin handelt es sich um das einzige Gen welches für das Timothy-Syndrom verantwortlich zu sein scheint (Gillis et al. 2011).

Des Weiteren fand sich in dieser Arbeit eine Assoziation zwischen einem weiteren Polymorphismus dieses Gens, rs1558322, und der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF).

Da hier die adjustierten p-Werte aller gefundenen Assoziationen nicht unterhalb des angenommenen Signifikanzniveaus waren, ist es denkbar, dass diese Polymorphismen eventuell nur geringen Einfluss auf das Risiko des plötzlichen Herztodes ausüben. Dennoch könnte sich in einer größeren Stichprobe hier ein signifikanter Zusammenhang offenbaren.

4.3.6 Ryanodin2-Rezeptor (RYR2)

Für einen Polymorphismus in *RYR2*, rs72549415, wurde eine Assoziation mit der Onset-Herzfrequenz, bei der ein Daueralternans auftritt, gefunden. Bei dem selben Polymorphismus fand sich weiterhin eine Assoziation mit der Herzfrequenz in Ruhe. Hierbei gilt jedoch zu bedenken, dass in der Stichprobe keine Variante-Homozygoten ausgemacht wurden. Es ist denkbar, dass die hier gefundenen Assoziationen bei einer größeren Stichprobe bedeutsam schwächer ausfallen würden.

In der Literatur sind Assoziationen zwischen Genotypen in *RyR2* und der Auftrittswahrscheinlichkeit ventrikulärer Arrhythmien sowie plötzlichem Herztod beschrieben (Ran et al. 2010).

Bei adjustierten p-Werten über dem angenommenen Signifikanzniveau ist es insgesamt denkbar, dass Einflüsse auf die gemessenen Parameter durch die in dieser Arbeit analysierten Polymorphismen in *RyR2* eine wenig bedeutsame Rolle spielen.

4.4 Assoziationen mit Genvarianten aus dem adrenergen System

4.4.1 β_1 -adrenerger Rezeptor (*ADRB1*)

In dieser Arbeit fand sich eine Assoziation zwischen dem Genotyp im Arg389Gly-Polymorphismus und der maximal negativen Frequenz im T-Wellen-Alternans-Test. Jedoch ist hier der nicht-adjustierte p-Wert mit 0,57 oberhalb des angenommenen Signifikanzniveaus, sodass hier ein Zufallsbefund gut denkbar ist.

In der Literatur sind Unterschiede in der linksventrikulären Ejektionsfraktion zwischen Genotypen in *ADRB1* und *ADRB2* Postmyokardinfarktpatienten unter β -Blockertherapie (McLean et al. 2011) beschrieben. Dabei waren relativ hohe linksventrikuläre Ejektionsfraktionen mit der Arg389-Variante in *ADRB1* assoziiert. Eine signifikante Assoziation zwischen linksventrikulärer Ejektionsfraktion und den Genotypen in *ADRB1* und *ADRB2* konnte in dem hier untersuchten Patientenkollektiv nicht ausgemacht werden.

4.4.2 β_2 -adrenerger Rezeptor (*ADRB2*)

In der Gengruppe des adrenergen Systems wurde weiterhin auf *ADRB2* im SNP Gly16Arg, eine Assoziation zwischen den Allelvarianten und der Kategorie der Herzfrequenz-turbulenz gefunden. Für den Gln27Glu-Polymorphismus fanden sich Assoziationen mit der Akkzelerations- und Dezelerationskapazität im Langzeit-EKG. Die Assoziation zwischen dem Genotyp in diesem Polymorphismus und der Dezelerationskapazität ist bei Betrachtung der p-Werte besonders interessant, da hier der adjustierte p-Wert von 0,09 dem angenommenen Signifikanzniveau nahe kommt. Es ist daher gut denkbar, dass es sich hierbei um einen echten Zusammenhang handelt.

In der Literatur findet sich zu diesem Polymorphismus eine Assoziation mit reduzierter linksventrikulärer Ejektionsfraktion bei Postmyokardinfarktpatienten unter β -Blockertherapie als Marker für Remodeling (McLean et al. 2011). Für den Gly16Arg-Polymorphismus hingegen wurde in derselben Arbeit keine Assoziation mit der

linksventrikulären Ejektionsfraktion ausgemacht. Dieses Ergebnis stimmt mit den in dieser Arbeit erhobenen Befunden überein.

4.5 Assoziationen mit Genvarianten in der kardialen elektrischen Erregung

4.5.1 *SCN5A*

In 7 Polymorphismen in *SCN5A* wurden insgesamt 11 Assoziationen gefunden. Zunächst sei die Assoziation zwischen dem Genotyp in rs3922844 und zwei Parametern der Herzfrequenzvariabilität dargestellt, nämlich der RMSSD im Langzeit-EKG. Hier fanden sich jeweils in der Gruppe der Wildtyp-Homozygoten die größten und in der Gruppe der Variante-Homozygoten die kleinsten Werte, sodass ein Trend zu erkennen war. Im Rahmen der Literaturrecherche konnten hier keinerlei Beschreibungen von Assoziationen zwischen *SCN5A*-Varianten und der Herzfrequenzvariabilität gefunden werden, die dieses Ergebnis bestätigen würden. Auch zeigten die großen adjustierten p-Werte von größer 0,6, dass es sich hier allenfalls um schwache Assoziationen handelt.

Eine weitere Assoziation fand sich zwischen dem Genotyp in diesem SNP und der Art von induzierter Tachykardie. In der Gruppe der Homozygoten und der Variante-Heterozygoten konnten hier am Häufigsten monomorphe ventrikuläre Tachykardien induziert werden, in der Gruppe der Wildtyp-Homozygoten jedoch am Häufigsten ein Kammerflimmern. Hier könnte eine weitere Untersuchung in einem größeren Patientenkollektiv interessant sein.

Für den SNP rs11708996 fand sich in dieser Arbeit eine Assoziation mit der maximalen Amplitude in einer beliebigen anderen Ableitung außer VM, wenn der TWA-Test positiv ausgefallen war. Hier zeigte sich in der Gruppe der Heterozygoten der kleinste Mittelwert, sodass ein Trendverhalten, wie es den genetischen Prinzipien der Merkmalsausprägung entspricht, nicht vorhanden ist. Die Standardabweichungen in dieser Stichprobe sind weiterhin im Vergleich zu den Differenzen der Mittelwerte für alle Genotypen groß. Zusammen mit dem adjustierten p-Wert von 0,91% legt die verhältnismäßig große Streuung einen Zufallsbefund nahe.

Des Weiteren wurde eine Assoziation zwischen der Variante in diesem Polymorphismus und der Kategorie der Herzfrequenz-turbulenz ausgemacht. Dabei fanden sich in der Gruppe der Variante-Homozygoten lediglich zwei Probanden mit abnormalem TO und TS, und keine Probanden mit anderen Kategorien der Herzfrequenz-turbulenz. In der Gruppe der Wildtyp-Homozygoten fanden sich die meisten Probanden in allen drei Kategorien, sodass sich ein Trend abzeichnete. Zwar genügt die Genotypenverteilung den Kriterien des Hardy-Weinberg-Equilibriums, jedoch ist angesichts der lediglich 3 Variante-Homozygoten gegenüber 183 Wildtyp-Homozygoten und 58 Heterozygoten in der Stichprobe, die Analyse einer größeren Stichprobe sinnvoll. In der Zusammenschau der Argumente und bei Beachtung des adjustierten p-Werts von 0,89 ist eine bedeutsame Assoziation hier eher unwahrscheinlich.

Darüber hinaus fanden sich Assoziationen zwischen der Dezelerationskapazität im Langzeit-EKG und dem Genotyp in rs1805126. Hier zeichnete sich ein Trend ab mit der kleinsten medianen Dezelerationskapazität in der Gruppe der Wildtyp-Homozygoten und den größten Werten in der Gruppe der Variante-Homozygoten. Jedoch waren die Standardabweichungen in dieser Stichprobe im Vergleich zu den Differenzen der Mittelwerte für alle Genotypen groß. Zusammen mit dem adjustierten p-Wert von 0,21% legt die verhältnismäßig große Streuung einen Zufallsbefund nahe.

Eine andere Assoziation fand sich zwischen dem Genotyp in rs1805124 und der Zahl der ventrikulären Extrasystolen im Langzeit-EKG. Hier zeichnete sich ein Trend ab mit dem kleinsten Median in der Gruppe der Wildtyp-Homozygoten und dem größten Median in der Gruppe der Variante-Homozygoten. Allerdings waren in dieser Stichprobe die Standardabweichungen im Vergleich zu den Differenzen der Mittelwerte für alle Genotypen groß. Diese vergleichsweise große Streuung legt, zusammen mit dem adjustierten p-Wert von 0,86 einen Zufallsbefund nahe.

Weiterhin war der Genotyp in rs11710077 signifikant mit der Zahl der nicht-anhaltenden ventrikulären Tachykardien im Langzeit-EKG assoziiert. Aus verschiedenen Gründen ist jedoch hier ein Zufallsbefund wahrscheinlich: Die Standardabweichungen in dieser

Stichprobe waren im Vergleich zu den Differenzen der Mittelwerte für alle Genotypen groß, der adjustierte p-Wert betrug 0,81 und ein Trend ließ sich nicht verzeichnen.

Eine andere Assoziation fand sich zwischen dem Genotyp in rs7638909 und dem Nt-proBNP-Wert. Jedoch ist hier allenfalls von einem Zufallsbefund auszugehen, da der adjustierte p-Wert mit 0,96 nahe 1 war, ein Trend sich nicht abzeichnete und die Standardabweichungen in dieser Stichprobe im Vergleich zu den Differenzen der Mittelwerte für alle Genotypen groß waren.

Die Assoziation zwischen der Dezelerationskapazität im Langzeit-EKG und dem Genotyp in rs11708996 ist besonders interessant. Beachtlich ist hier, dass die Assoziation bei Betrachtung des nicht-adjustierten p-Werts von 0,003 stark zu sein scheint. Auch bei Betrachtung des adjustierten p-Werts, zeigt sich, dass dieser sich bei 0,11 nah am angenommenen Signifikanzniveau befindet. Hier könnte die Analyse einer größeren Kohorte eine stärkere Assoziation offenbaren und einen Hinweis auf einen bedeutsamen Zusammenhang liefern. Für alle anderen vorbeschriebenen Assoziationen mit Genvarianten von *SCN5A* sind die adjustierten p-Werte fern des angenommenen Signifikanzniveaus, sodass hier Zufallsbefunde gut denkbar sind.

SCN5A kodiert für die α -Untereinheit des $\text{Na}_v 1.5$, einem Na^+ -Kanal, der maßgeblich die depolarisierenden Ströme des Aktionspotential ermöglicht. Mutationen in *SCN5A* können zu vielen verschiedenen Erkrankungen führen, wie Vorhofflimmern, Long-QT-Syndrom vom Typ 3, idiopathischem Kammerflimmern, dem Brugada- oder Sick-Sinus-Syndrom (Camm et al. 2006). Weiterhin sind Assoziationen mit *SCN5A*-Varianten und *Progressive Cardiac Conduction Disease* (PCCD), einer unter anderem zu Bradykardie führenden Herzerkrankung beschrieben (Martin et al. 2011).

4.5.2 *KCNQ1*

KCNQ1 kodiert für das Protein KvLQT1/minK, einem spannungsabhängigen Kaliumkanal, der in der Repolarisationsphase des Aktionspotential hyperpolarisierend aktiv ist. In dieser Arbeit fanden sich Assoziationen zwischen den Allelvarianten eines SNPs in *KCNQ1* und der

Art von induzierter Tachykardie. In der Gruppe der Wildtyp-Homozygoten konnten dabei am Häufigsten monomorphe Tachykardien induziert werden. Weiterhin fanden sich in dieser Gruppe mit Abstand die meisten Individuen mit sowohl induziertem Kammerflimmern, als auch polymorphen ventrikulären Tachykardien. Jedoch gilt hier zu beachten, dass innerhalb des Probandenkollektivs 233 Wildtyp-Homozygoten gegenüber 16 Heterozygoten und lediglich einem Variante-Homozygoten determiniert wurden. Insofern wäre ein größeres Probandenkollektiv zur Beurteilung einer Assoziation zwischen Genotyp und Phänotyp notwendig.

In der Literatur sind für dieses Gen Mutationen beschrieben, die zum Long-QT-Syndrom vom Typ 1 (LQT1) sowie zum Short-QT-Syndrom führen (Beckmann 2011). Allerdings fand sich in dieser Arbeit keine Assoziation mit der frequenzkorrigierten QT-Zeit, sodass unsere Ergebnisse nicht mit der Literatur übereinstimmen.

4.5.3 *KCNH2*

Für Genvarianten von *KCNH2*, dessen Genprodukt für einen K^+ -Ionenkanal kodiert, der eine wichtige Rolle in der Repolarisierung des kardiomyozytären Aktionspotentials spielt, fanden sich in dieser Arbeit keinerlei Assoziationen mit den erhobenen klinischen und elektrophysiologischen Parametern.

Gouas et al. konnten zeigen, dass bei rs1805123 (K897T) Minor-Allelträgern signifikant gehäuft kürzere QT-Intervalle auftraten als bei Probanden anderer Allelgruppen (Gouas et al. 2005). Dieses Ergebnis konnte in dieser Arbeit nicht repliziert werden. Porthan et al. fanden weiterhin, dass Allelvarianten in rs3807375 keinen Einfluss auf die Parameter der T-Wellenmorphologie nehmen (Porthan et al. 2010). Auch Koskela et al. fanden keinen statistisch signifikanten Effekt von diesem Polymorphismus auf die T-Wellen-Amplitude (Koskela et al. 2008). Die Ergebnisse dieser beiden Arbeiten sind mit den hier gemachten Beobachtungen vereinbar.

4.6 Assoziationen mit Genvarianten aus dem Bereich des kardiomyozytären Kontraktionsapparates

4.6.1 *ANK2*

Für Varianten von rs 2107026 auf *ANK2* fanden sich zwei Assoziationen mit elektrophysiologischen Parametern. Zum einen handelte es sich dabei um eine Assoziation zwischen dem Genotyp und der TWA-Amplitude in der Ableitung VM. Zum anderen zeigte sich eine Assoziation mit der Standardabweichung aller RR-Intervalle im Langzeit-EKG. Jedoch fällt hier bei näherer Betrachtung der Einzelwerte auf, dass die Standardabweichungen im Vergleich zu den Differenzen der Mittelwerte für alle Genotypen groß sind. Zusammen mit dem adjustierten p-Wert von 1 legt diese verhältnismäßig große Streuung einen Zufallsbefund nahe.

Es wurde erwartet eine Assoziation zwischen SNP-Varianten und der Herzfrequenz in Ruhe zu finden. Hierzu ist in der Literatur beschrieben, dass Dysfunktionen des Genprodukts von *ANK2*, Ankyrin-B, zu einer Sinusknotendysfunktion führen (Wolf et al. 2013). Dieses Ergebnis aus der Literatur konnte in dieser Arbeit nicht reproduziert werden.

4.7 Assoziationen mit Polymorphismen im Gen für das Nitric oxidase synthase-1 Adaptorprotein (*NOS1AP*)

Es wurde in *NOS1AP* eine Assoziation zwischen den Allelvarianten von rs12084280 und einem Parameter der Herzfrequenzvariabilität, der Standardabweichung aller RR-Intervalle im Langzeit-EKG, gefunden. Jedoch fanden sich hier die höchsten Werte in der Gruppe der Heterozygoten, sodass ein Trend-Verhalten, wie es nach den genetischen Prinzipien der Merkmalsausprägung zu erwarten ist, fehlte. Daher ist ein Zufallsbefund wahrscheinlich, zumal der adjustierte p-Wert 0,24 beträgt.

Bei *NOS1AP* handelt es sich um ein Gen, dessen Rolle beim Auftreten von Herzrhythmusstörungen noch nicht geklärt ist (Westaway et al. 2011). In der Literatur sind jedoch innerhalb von Assoziationsstudien Assoziationen zwischen häufigen SNP-Varianten

im Gen und dem plötzlichen Herztod sowie einem verlängerten QT-Intervall beschrieben. Eine derartige Assoziation konnte in dieser Arbeit nicht reproduziert werden.

4.8 Ausblick und kritische Diskussion von Stärken und Schwächen

Nach der Analyse der ausgewählten Polymorphismen konnten keine Allelvarianten identifiziert werden, welche eindeutig eine Prädisposition für lebensbedrohliche Herzrhythmusstörungen und dem plötzlichen Herztod sein könnten. Die hier ermittelten Assoziationen waren unter dem Aspekt des multiplen Testens nicht signifikant. Dafür, dass nur eher schwache Assoziationen gefunden wurden, kommen mehrere Gründe infrage. Im Rahmen der EUTrigTreat-Studie wurden 1000 Patienten rekrutiert, von denen in dieser Arbeit nur die Genotypen und klinischen Parameter von 250 Patienten determiniert und analysiert wurden. Es könnte sein, dass sich bei einer größeren Kohorte einige Assoziationen als eindeutig stärker oder schwächer erweisen würden und sich so Annahmen deutlich bestätigen oder widerlegen lassen würden. Davon unberührt bleibt die Möglichkeit, dass manche oder gar alle Polymorphismen keinen bedeutsamen Einfluss auf das Auftreten des plötzlichen Herztods ausüben und die Assoziationen zufällig aufgetreten sind.

Die Ergebnisse könnten auch in Ermangelung ausreichender Heterogenität der Stichprobe nicht repräsentativ für die hier untersuchte kaukasische Population sein. Jedoch waren die hier gefundenen Minor-Allelfrequenzen stets nahe an den in der Literatur beschriebenen Werten. Auch sind Fehler in den Messungen und der Auswertung der Messergebnisse möglich, die trotz strengen Qualitätsmanagements und mehrfacher Überprüfung zu falschen genotypischen Determinierungen geführt haben könnten. Allerdings hätte dies bei einer gewissen Schwere auffallen können, z.B. durch insuffiziente Erfüllung des Hardy-Weinberg-Equilibriums oder bei auffälliger Abweichung der Minor-Allelfrequenzen dieser Kohorte mit denen aus der Literatur.

Die spezifischen elektrophysiologischen Parameter waren vielversprechend für die Risikostratifizierung des plötzlichen Herztods. Im *follow up* der EUTrigTreat-Studie wird es möglich sein, Signifikanztests zwischen dem Auftreten von lebensbedrohlichen

Herzrhythmusstörungen und dem Genotyp durchzuführen. Es ist möglich, dass diese Ergebnisse eine höhere statistische Verlässlichkeit aufweisen werden als die Ergebnisse die sich in dieser Arbeit fanden. Nach Ablauf der *follow-up*-Periode wird es möglich sein die Prädiktionsfähigkeit dieser Parameter genauer zu ermitteln.

In den Messungen der elektrophysiologischen Parameter zeigt sich, dass sich die Werte unter den Allelvariantenträger nicht eindeutig voneinander unterscheiden. Obwohl diese Kohorte Patienten umfasste, die alle ein hohes Risiko für lebensbedrohliche Herzrhythmusstörungen aufwiesen, hatten wir erwartet, dass die elektrophysiologischen Marker eindeutig unterschiedliche Risikoprofile unter den Patienten aufzeigen würden.

In Zukunft wird es sicher noch weitergehende genomweite Resequenzierungen und Assoziationsstudien geben, die SNPs auf den von uns erwählten Genen identifizieren, welche starke Assoziationen aufzeigen. Auch die Identifizierung von assoziationsstarken SNPs auf anderen Genen, die bei unserer auf Kandidatengene fixierten Herangehensweise nicht berücksichtigt wurden, wird es sicherlich geben. Nach Feststellung von solchen reproduzierbar starken Assoziationen könnte dann eine Überprüfung der prädiktiven Fähigkeiten erfolgen, beispielsweise in Langzeitstudien. Die Identifizierung eines für den plötzlichen Herztod prädisponierenden Genotyps könnte die gängige Risikostratifizierung ergänzen und verbessern. In der Folge könnten mehr Patienten, die einen ICD benötigen, einen solchen bekommen, und weniger Patienten, die niemals von der Therapie profitieren würden, keinen ICD implantiert bekommen. Die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse tragen dazu bei einen Biomarker zur Risikostratifizierung des plötzlichen Herztods in Zukunft finden zu können. Auf diese Weise würde in Zukunft eine adäquate Indikation zur ICD-Therapie besser gestellt werden können.

5 Zusammenfassung

Der plötzliche Herztod ist eine häufige Komplikation bei Herzkranken, die in etwa 75% der Fälle auf eine lebensbedrohliche Herzrhythmusstörung zurückgeht. Bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung gehen etwa 50% der Todesfälle auf den plötzlichen Herztod zurück. Daher bekommen Risikopatienten zunehmend ein ICD implantiert. Die Risikostratifizierung des plötzlichen Herztods ist dabei verbesserungswürdig, da sehr viele Patienten, denen ein ICD implantiert wurden, niemals klinisch davon profitieren. Diese Patienten können wir heute allerdings noch nicht im Voraus identifizieren.

Diese Arbeit ist Teil der klinischen EUTrigTreat-Studie, die unter anderem eine Verbesserung der Risikostratifizierung des plötzlichen Herztods zum Ziel hat. In dieser Arbeit wurden 250 Patienten mit ICD nach Genotypen untersucht, die mit dem Auftreten von lebensbedrohlichen Herzrhythmusstörungen assoziiert sind. Hierfür wurden 37 Einzelnukleotidpolymorphismen aus 12 Kandidatengenomen genotypisiert und der Zusammenhang zwischen den Allelvarianten und kardiologisch-elektrophysiologischen Parametern untersucht. Unter Letzteren waren zum Beispiel die Herzfrequenzvariabilität, die Herzfrequenz-turbulenz und der T-Wellen-Alternans. Bei den Kandidatengenomen handelte es sich um solche, die für Proteine der kardialen Kalziumhomöostase, der kardiomyozytären Ionenregulation, der β -adrenergen kardialen Stimulation, für kardiale Strukturproteine sowie für ein NO-Synthetase Adapterprotein kodieren.

Unter strenger Adjustierung auf multiples Testen fand sich lediglich eine signifikante Assoziation zwischen dem Genotyp in einem Polymorphismus im *ANK2* und der schwarzafrikanischen Ethnie. Es ist jedoch angesichts der Größe der Stichprobe, die lediglich einen einzigen Probanden nicht-kaukasischer Ethnie einschließt, von keinem echten Zusammenhang auszugehen, sodass diese Assoziation hier keine weitere Berücksichtigung fand. Ohne Berücksichtigung des multiplen Testens in einer explorativen Analyse zeigen sich jedoch einige weitere Assoziationen wenn man, wie hier geschehen, ein Signifikanzniveau von 0,03 annimmt.

In zwei Polymorphismen von *CSQ2* fanden sich Assoziationen mit der Kategorie der Herzfrequenz-turbulenz und der Induzierbarkeit ventrikulärer Tachykardien. Auffällig war, dass hier zwei weitere Assoziationen mit Parametern des T-Wellen-Alternans ausgemacht

werden konnten. Dies ist insofern interessant, als ein pathologischer T-Wellen-Alternans über eine gestörte Kalziumhomöostase am Myozyten Ausdruck einer gestörten Repolarisation am Kardiomyozyten sein kann (Arvanitis et al. 2010). Hierzu ist in der Literatur weiterhin beschrieben, dass das Auftreten eines TWA bei geringeren Ryanodinkonzentrationen eher unterdrückt wird. Da Calsequestrin 2 zusammen mit dem Ryanodin2-Rezeptor, Triadin und dem *histidine-rich calcium binding protein* einen quaternären Wirkkomplex bildet, sind Auswirkungen von Polymorphismen in *CSQ2* auf Parameter des T-Wellenalternans denkbar.

In der Literatur ist beschrieben worden, dass bei Minor-Allelträgern des K897T-Polymorphismus in *KCNH2* signifikant kürzere QT-Intervalle auftreten. Dieser Befund konnte in dieser Arbeit nicht repliziert werden. Das Ergebnis unserer Analysen ist jedoch mit einer anderen in der Literatur beschriebenen Beobachtung vereinbar. So fanden auch wir keinerlei Einfluss von Allelvarianten SNP rs3807375 im Gen *KCNH2* auf Parameter der T-Wellenmorphologie.

Diese Arbeit sollte die Frage klären, ob es Häufungen bestimmter Genvarianten bei Patienten mit Herzrhythmusstörungen gibt und ob es Polymorphismen gibt, die sich als Biomarker zur Prädiktion des plötzlichen Herztods eignen können.

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben nur schwachen Anhalt dafür, dass die hier untersuchten Polymorphismen bei Arrhythmiepatienten gehäuft vorkommen oder ein erhöhtes Risiko einen plötzlichen Herztod zu erleiden, mit sich bringen. Es ist möglich, dass tatsächlich keine der untersuchten Genvarianten in relevanter kausaler Beziehung zum Auftreten lebensbedrohlicher Herzrhythmusstörungen steht. Allerdings bleibt zu prüfen, ob unter den Allelvariantenträgern signifikant unterschiedlich oft lebensbedrohliche Herzrhythmusstörungen auftreten werden, welche durch unsere und elektrophysiologischen Parameter ungenügend vorhergesagt werden konnten.

Diese Arbeit hat zur Suche neuer Marker zur Risikostratifizierung des plötzlichen Herztods beigetragen. Es ist absehbar, dass in Zukunft z.B. in Assoziationsstudien noch weitere Polymorphismen in denselben oder anderen Genen identifiziert werden, in denen nach

starken Assoziationen zwischen Genotyp und dem Risiko des plötzlichen Herztodes gesucht wird. Es ist denkbar, dass auf diese Weise noch Biomarker gefunden werden, die die derzeitigen Mittel der positiven Prädiktion ergänzen.

6 Literaturverzeichnis

- Aarnoudse AJ, Newton-Cheh C, de Bakker PI, Straus SM, Kors JA, Hofman A, Uitterlinden AG, Witteman JC, Stricker BH (2007): Common NOS1AP variants are associated with a prolonged QTc interval in the Rotterdam Study. *Circulation* **116**, 10-16
- Adeniran I, McPate MJ, Witchel HJ, Hancox JC, Zhang H (2011): Increased vulnerability of human ventricle to re-entrant excitation in hERG-linked variant 1 short QT syndrome. *PLoS Comput Biol* **7**, e1002313
- Aktorics K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 10. Auflage; Urban und Fischer, München 2009
- Arastéh K, Baenkler HW, Bieber C, Brandt R, Chatterjee T, Dill T, Ditting T, Eich W, Ernst S, Fritze D, Fießel HS, Goeckenjan G, Hahn JM: Innere Medizin. 2. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2009
- Arking DE, Pfeufer A, Post W, Kao WH, Newton-Cheh C, Ikeda M, West K, Kashuk C, Akyol M, Perz S (2006): A common genetic variant in the NOS1 regulator NOS1AP modulates cardiac repolarization. *Nat Genet* **38**, 644-651
- Arvanitis DA, Sanoudou D, Kolokathis F, Vafiadaki E, Papalouka V, Kontrogianni-Konstantopoulos A, Theodorakis GN, Paraskevaïdis IA, Adamopoulos S, Dorn GW (2008): The Ser96Ala variant in histidine-rich calcium-binding protein is associated with life-threatening ventricular arrhythmias in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* **29**, 2514-2525
- Arvanitis DA, Vafiadaki E, Sanoudou D, Kranias EG (2010): Histidine-rich calcium binding protein: the new regulator of sarcoplasmic reticulum calcium cycling. *J Mol Cell Cardiol* **50**, 43-49
- Bao M, Zhang J, Huang C, Jiang H, Liu J, Zhao D (2007): Abnormal intracellular calcium handling underlying T-wave alternans and its hysteresis. *Cardiology* **108**, 147-156
- Bardy GH, Lee KL, Mark DB, Poole JE, Packer DL, Boineau R, Domanski M, Troutman C, Anderson J, Johnson G (2005): Amiodarone or an Implantable Cardioverter-Defibrillator for Congestive Heart Failure. *N Engl J Med* **352**, 225-237
- Barthel P, Schneider R, Bauer A, Ulm K, Schmitt C, Schöming A, Schmidt G (2003): Risk stratification after acute myocardial infarction by heart rate turbulence. *Circulation* **108(10)**, 1221-1226
- Bauer A, Kantelhardt JW, Barthel P, Schneider R, Makikallio T, Ulm K, Hnatkova K, Schomig A, Huikuri H, Bunde A (2006): Deceleration capacity of heart rate as a predictor of mortality after myocardial infarction: cohort study. *Lancet* **367**, 1674-1681
- Beckmann BM, Pfeufer A, Kääb S (2011): Inherited cardiac arrhythmias: diagnosis, treatment and prevention. *Dtsch Arztebl Int* **2011** **37**, 623-34
- Beitelshees AL, Navare H, Wang D, Gong Y, Wessel J, Moss JJ, Langae TY, Cooper-DeHoff RM, Sadee W, Pepine CJ (2009): CACNA1C gene polymorphisms, cardiovascular disease outcomes, and treatment response. *Circ Cardiovasc Genet* **2**, 362-370
- Bernstein D, Fajardo G, Zhao M (2011): The Role of Beta-Adrenergic Receptors in Heart Failure: Differential Regulation of Cardiotoxicity and Cardioprotection. *Prog Pediatr Cardiol* **31**, 35-38
- Bers DM (2008): Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol* **70**, 23-49

- Betzenhauser MJ, Marks AR (2010): Ryanodine receptor channelopathies. *Pflugers Arch* 460, 467-480
- Bloomfield DM, Hohnloser SH, Cohen RJ (2002): Interpretation and classification of microvolt T wave alternans tests. *J Cardiovasc Electrophysiol* 13, 502-512
- Borjesson M, Magnusson Y, Hjalmarson A, Andersson B (2000): A novel polymorphism in the gene coding for the beta(1)-adrenergic receptor associated with survival in patients with heart failure. *Eur Heart J* 21, 1853-1858
- Brockmoller J, Tzvetkov MV (2008): Pharmacogenetics: data, concepts and tools to improve drug discovery and drug treatment. *Eur J Clin Pharmacol* 64, 133-157
- Cairns JA, Connolly SJ, Roberts R, Gent M (1997): Randomised trial of outcome after myocardial infarction in patients with frequent or repetitive ventricular premature depolarisations: CAMIAT. Canadian Amiodarone Myocardial Infarction Arrhythmia Trial Investigators. *Lancet* 349, 675-682
- Camm J, Lüscher TF, Serruys PW: *The ESC Textbook of CardioVascular Medicine*. 2. Auflage; Oxford University Press, Blackwell, Oxford, U.K. 2009, 197-200
- Chen L, Zhang W, Fang C, Jiang S, Shu C, Cheng H, Li F, Li H (2011): Polymorphism H558R in the human cardiac sodium channel SCN5A gene is associated with atrial fibrillation. *J Int Med Res* 39, 1908-1916
- Chiha M, Njeim M, Chedrawy EG (2012): Diabetes and coronary heart disease: a risk factor for the global epidemic. *Int J Hypertens* 2012, 697240
- Chow T, Kereiakes DJ, Bartone C, Booth T, Schloss EJ, Waller T, Chung E, Menon S, Nallamothu BK, Chan PS (2007): Microvolt T-wave alternans identifies patients with ischemic cardiomyopathy who benefit from implantable cardioverter-defibrillator therapy. *J Am Coll Cardiol* 49, 50-58
- Cresci S (2012): ADRB1 variants in atrial fibrillation: small steps and giant leaps toward personalized therapy in cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 59, 57-59
- Crotti L, Monti MC, Insolia R, Peljto A, Goosen A, Brink PA, Greenberg DA, Schwartz PJ, George AL, Jr. (2009): NOS1AP is a genetic modifier of the long-QT syndrome. *Circulation* 120, 1657-1663
- Cunha SR, Hund TJ, Hashemi S, Voigt N, Li N, Wright P, Koval O, Li J, Gudmundsson H, Gumina RJ (2011): Defects in ankyrin-based membrane protein targeting pathways underlie atrial fibrillation. *Circulation* 124, 1212-1222
- Dainese M, Quarta M, Lyfenko AD, Paolini C, Canato M, Reggiani C, Dirksen RT, Protasi F (2009): Anesthetic- and heat-induced sudden death in caldesmon-1-knockout mice. *Faseb J* 23, 1710-1720
- Darbar D, Kannankeril PJ, Donahue BS, Kucera G, Stubblefield T, Haines JL, George AL, Jr., Roden DM (2008): Cardiac sodium channel (SCN5A) variants associated with atrial fibrillation. *Circulation* 117, 1927-1935
- Das SK, Chu W, Zhang Z, Hasstedt SJ, Elbein SC (2004): Calsquestrin 1 (CASQ1) gene polymorphisms under chromosome 1q21 linkage peak are associated with type 2 diabetes in Northern European Caucasians. *Diabetes* 53, 3300-3306
- Engelhardt S, Boknik P, Keller U, Neumann J, Lohse MJ, Hein L (2001): Early impairment of calcium handling and altered expression of junctin in hearts of mice overexpressing the beta1-adrenergic receptor. *Faseb J* 15, 2718-2720
- Frank E (1956): An accurate, clinically practical system for spatial vectorcardiography. *Circulation* 13, 737-749

- Friedlbinder J: Verhalten der Herzfrequenz-turbulenz in Abhängigkeit vom Reperfusionsergebnis nach direkter Koronarangioplastie bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt. Med. Diss. Lübeck 2008
- Fu M, Damcott CM, Sabra M, Pollin TI, Ott SH, Wang J, Garant MJ, O'Connell JR, Mitchell BD, Shuldiner AR (2004): Polymorphism in the calsequestrin 1 (CASQ1) gene on chromosome 1q21 is associated with type 2 diabetes in the old order Amish. *Diabetes* 53, 3292-3299
- Gillis J, Burashnikov E, Antzelevitch C, Blaser S, Gross G, Turner L, Babul-Hirji R, Chitayat D (2012): Long QT, syndactyly, joint contractures, stroke and novel CACNA1C mutation: Expanding the spectrum of Timothy syndrome. *Am J Med Genet A* 158A(1), 182-187
- Goldenberg I, Moss AJ, Hall WJ, McNitt S, Zareba W, Andrews ML, Cannom DS (2006): Causes and consequences of heart failure after prophylactic implantation of a defibrillator in the multicenter automatic defibrillator implantation trial II. *Circulation* 113, 2810-2817
- Gouas L, Nicaud V, Berthet M, Forhan A, Tiret L, Balkau B, Guicheney P (2005): Association of KCNQ1, KCNE1, KCNH2 and SCN5A polymorphisms with QTc interval length in a healthy population. *Eur J Hum Genet* 13, 1213-1222
- Gyorke S, Terentyev D (2008): Modulation of ryanodine receptor by luminal calcium and accessory proteins in health and cardiac disease. *Cardiovasc Res* 77, 245-255
- Han P, Cai W, Wang Y, Lam CK, Arvanitis DA, Singh VP, Chen S, Zhang H, Zhang R, Cheng H (2011): Catecholaminergic-induced arrhythmias in failing cardiomyocytes associated with human HRCS96A variant overexpression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301, H1588-1595
- Hoppe UC, Böhm M, Dietz R, Hanrath P, Kroemer HK, Osterspey A, Schmaltz A, Erdmann E (2005): Leitlinien zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz. *Zeitschrift für Kardiologie* 95, 488-509
- Hurst TM, Hinrichs M, Breidenbach C, Katz N, Waldecker B (1999): Detection of myocardial injury during transvenous implantation of automatic cardioverter-defibrillators. *J Am Coll Cardiol* 34, 402-408
- Ikeda Y, Hoshijima M, Chien KR (2008): Toward biologically targeted therapy of calcium cycling defects in heart failure. *Physiology (Bethesda)* 23, 6-16
- Ilkhanoff L, Arking DE, Lemaitre RN, Alonso A, Chen LY, Durda P, Hesselton SE, Kerr KF, Magnani JW, Marcus GM (2014): A Common SCN5A Variant is Associated with PR Interval and Atrial Fibrillation among African Americans. *J Cardiovasc Electrophysiol* 10.1111/jce.12483
- Iwai C, Akita H, Shiga N, Takai E, Miyamoto Y, Shimizu M, Kawai H, Takarada A, Kajiya T, Yokoyama M (2002): Suppressive effect of the Gly389 allele of the beta1-adrenergic receptor gene on the occurrence of ventricular tachycardia in dilated cardiomyopathy. *Circ J* 66, 723-728
- Jamshidi Y, Nolte IM, Dalageorgou C, Zheng D, Johnson T, Bastiaenen R, Ruddy S, Talbott D, Norris KJ, Snieder H (2012): Common variation in the NOS1AP gene is associated with drug-induced QT prolongation and ventricular arrhythmia. *J Am Coll Cardiol* 60, 841-850
- Julian DG, Camm AJ, Frangin G, Janse MJ, Munoz A, Schwartz PJ, Simon P (1997): Randomised trial of effect of amiodarone on mortality in patients with left-ventricular dysfunction after recent myocardial infarction: EMIAT. *European Myocardial Infarct Amiodarone Trial Investigators. Lancet* 349, 667-674

- Jung W, Lüderitz B (1997): Antiarrhythmische Therapie bei Postinfarktpatienten. Dt Ärztebl 1997 20, 1345-1353
- Jung W, Andresen D, Block M, Böcker D, Hohnloser SH, Kuck KH, Sperzel J Ed. (2006): Leitlinie zur Implantation von Defibrillatoren. Clin Res Cardiol 95, 696-708
- Katritsis DG, Camm AJ (2004): Nonsustained ventricular tachycardia: where do we stand? Eur Heart J 25(13), 1093-1099
- Katritsis DG, Josephson ME (2012): Sudden cardiac death and implantable cardioverter defibrillators: two modern epidemics? Europace 14(6): 787-794
- Katritsis DG, Zarebra W, Camm AJ (2012): Nonsustained ventricular tachycardia. J Am Coll Cardiol 60(20), 1993-2004
- Kleiger RE, Miller JP, Bigger JT, Jr., Moss AJ (1987): Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after acute myocardial infarction. Am J Cardiol 59, 256-262
- Koskela J, Laiho J, KaHonen M, Rontu R, Lehtinen R, Viik J, Niemi M, Niemela K, Koobi T, Turjanmaa V (2008): Potassium channel KCNH2 K897T polymorphism and cardiac repolarization during exercise test: The Finnish Cardiovascular Study. Scand J Clin Lab Invest 68, 31-38
- La Rovere MT, Bigger JT Jr, Marcus FI, Mortara A, Schwartz PJ (1998): Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. ATRAMI (Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction) Investigators. Lancet 351, 478-484
- Laszlo R, Busch MC, Schreieck J (2011): Genetic Polymorphisms as Risk Stratification Tool in Primary Preventive ICD Therapy. ISRN Cardiol 2011, 457247
- Lee KW, Maeng JS, Choi JY, Lee YR, Hwang CY, Park SS, Park HK, Chung BH, Lee SG, Kim YS (2012): Role of Junctin Protein Interactions in Cellular Dynamics of Calsequestrin Polymer upon Calcium Perturbation. J Biol Chem 287, 1679-1687
- Leineweber K, Heusch G (2009): Beta 1- and beta 2-adrenoceptor polymorphisms and cardiovascular diseases. Br J Pharmacol 158, 61-69
- Lohse MJ, Engelhardt S, Eschenhagen T (2003): What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? Circ Res 93, 896-906
- Löllgen H (1999): Neue Methoden in der kardialen Funktionsdiagnostik-Herzfrequenzvariabilität. Dt Ärztebl 96: A 2029-2032
- Lombardi F, Stein PK (2011): Origin of heart rate variability and turbulence: an appraisal of autonomic modulation of cardiovascular function. Front Physiol 2, 95
- Luchner A, Holmer S, Schunkert H, Riegger G (2003): Bedeutung der Herzinsuffizienzmarker BNP und NT-proBNP für die Klinik. Dt Ärztebl 100, A 3314-3321
- Martin CA, Matthews GD, Huang CL (2011): Sudden cardiac death and inherited channelopathy: the basic electrophysiology of the myocyte and myocardium in ion channel disease. Heart 98, 536-543
- McLean RC, Hirsch GA, Becker LC, Kasch-Semenza L, Gerstenblith G, Schulman SP (2011): Polymorphisms of the beta adrenergic receptor predict left ventricular remodeling following acute myocardial infarction. Cardiovasc Drugs Ther 25, 251-258
- Medeiros-Domingo A, Bhuiyan ZA, Tester DJ, Hofman N, Bikker H, van Tintelen JP, Mannens MM, Wilde AA, Ackerman MJ (2009): The RYR2-encoded ryanodine receptor/calcium release channel in patients diagnosed previously with either catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia or genotype negative, exercise-induced long QT syndrome: a comprehensive open reading frame mutational analysis. J Am Coll Cardiol 54, 2065-2074

- Monteforte N, Napolitano C, Priori SG (2012): Genetics and arrhythmias: diagnostic and prognostic applications. *Rev Esp Cardiol* 65, 278-286
- Muthumala A, Drenos F, Elliott PM, Humphries SE (2008): Role of beta adrenergic receptor polymorphisms in heart failure: systematic review and meta-analysis. *Eur J Heart Fail* 10, 3-13
- Nascimento BC, Pereira SB, Ribeiro GS, Mesquita ET (2012): Beta1-adrenergic receptor polymorphisms associated with atrial fibrillation in systolic heart failure. *Arg Bras Cardiol* 98(5), 384-389
- Newton-Cheh C, Guo CY, Larson MG, Musone SL, Surti A, Camargo AL, Drake JA, Benjamin EJ, Levy D, O'Donnell CJ (2007): Common genetic variation in KCNH2 is associated with QT interval duration: the Framingham Heart Study. *Circulation* 116, 1128-1136
- Newton-Cheh C, Eijgelsheim M, Rice KM, de Bakker PI, Yin X, Estrada K, Bis JC, Marciante K, Rivadeneira F, Noseworthy PA, Sotoodehnia N (2009): Common variants at ten loci influence QT interval duration in the QTGEN Study. *Nat Genet* 41, 399-406
- Nicolouina S, Shulman V, Shesternya P, Chernova A, Salmina A, Issachenko O, Maksimov V, Voevoda M (2010): Association of ADRB1 gene polymorphism with atrial fibrillation. *Genet Test Mol Biomarkers* 14, 249-253
- Pfeufer A, van Noord C, Marciante KD, Arking DE, Larson MG, Smith AV, Tarasov KV, Muller M, Sotoodehnia N, Sinner MF (2010): Genome-wide association study of PR interval. *Nat Genet* 42, 153-159
- Poole JE, Johnson GW, Hellkamp AS, Anderson J, Callans DJ, Raitt MH, Reddy RK, Marchlinski FE, Yee R, Guarnieri T, Talajic M (2008): Prognostic importance of defibrillator shocks in patients with heart failure. *New England Journal of Medicine* 359, 1009-1017
- Porthan K, Marjamaa A, Viitasalo M, Vaananen H, Jula A, Toivonen L, Nieminen MS, Newton-Cheh C, Salomaa V, Kontula K, Oikarinen L (2010): Relationship of common candidate gene variants to electrocardiographic T-wave peak to T-wave end interval and T-wave morphology parameters. *Heart Rhythm* 7, 898-903
- Priori SG, Napolitano C (2005): Cardiac and skeletal muscle disorders caused by mutations in the intracellular Ca²⁺ release channels. *J Clin Invest* 115, 2033-2038
- Prosser BL, Ward CW, Lederer WJ (2010): Subcellular Ca²⁺ signaling in the heart: the role of ryanodine receptor sensitivity. *J Gen Physiol* 136, 135-142
- Ran Y, Chen J, Li N, Zhang W, Feng L, Wang R, Hui R, Zhang S, Pu J (2010): Common RyR2 variants associate with ventricular arrhythmias and sudden cardiac death in chronic heart failure. *Clin Sci (Lond)* 119, 215-223
- Saha P, Goldberger JJ (2011): Risk stratification for prevention of sudden cardiac death. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 14, 81-90
- Schmidt G, Malik M, Barthel P, Schneider R, Ulm K, Rolnitzky L, Camm AJ, Bigger JT Jr, Schöming A. (1999): Heart-rate turbulence after ventricular premature beats as a predictor of mortality after acute myocardial infarction. *Lancet* 353(9162), 1390-1396
- Schmidt RF, Lang F, Heckmann M: *Physiologie des Menschen*. 30. Auflage; Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2007, 567-570
- Schmitt JP, Kamisago M, Asahi M, Li GH, Ahmad F, Mende U, Kranias EG, MacLennan DH, Seidman JG, Seidman CE (2003): Dilated cardiomyopathy and heart failure caused by a mutation in phospholamban. *Science* 299(5611), 1410-1413
- Schwab J, Yang A, Lewalter T, Lüderitz B (2003): Nichtinvasive Risikostratifizierung bei koronarer Herzerkrankung. *Dt Arztebl* 100, 2878-2882

- Sedlacek K, Stark K, Cunha SR, Pfeufer A, Weber S, Berger I, Perz S, Kaab S, Wichmann HE, Mohler PJ (2008): Common genetic variants in ANK2 modulate QT interval: results from the KORA study. *Circ Cardiovasc Genet* 1, 93-99
- Seegers J, Vos MA, Flevari P, Willems R, Sohns C, Vollmann D, Luthje L, Kremastinos DT, Flore V, Meine M (2012): Rationale, objectives, and design of the EUTrigTreat clinical study: a prospective observational study for arrhythmia risk stratification and assessment of interrelationships among repolarization markers and genotype. *Europace* 14(3), 416-22
- Smith JG, Lowe JK, Kovvali S, Maller JB, Salit J, Daly MJ, Stoffel MS, Altshuler DM, Friedman JM, Breslow JL (2009): Genome-wide association study of electrocardiographic conduction measures in an isolated founder population: Kosrae. *Heart Rhythm* 5, 634-41
- Smith JG, Magnani JW, Palmer C, Meng YA, Soliman EZ, Musani SK, Kerr KF, Schnabel RB, Lubitz SA, Sotoodehnia N (2011): Genome-wide association studies of the PR interval in African Americans. *PLoS Genet* 7, e1001304
- Sotoodehnia N, Siscovick DS, Vatta M, Psaty BM, Tracy RP, Towbin JA, Lemaitre RN, Rea TD, Durda JP, Chang JM (2006): Beta2-adrenergic receptor genetic variants and risk of sudden cardiac death. *Circulation* 113, 1842-1848
- Sotoodehnia N, Isaacs A, de Bakker PI, Dorr M, Newton-Cheh C, Nolte IM, van der Harst P, Muller M, Eijgelsheim M, Alonso A (2010): Common variants in 22 loci are associated with QRS duration and cardiac ventricular conduction. *Nat Genet* 42, 1068-1076
- Strachan T, Read AP: *Human Molecular Genetics*. 3. Auflage; Garland Science, Abingdon 2004
- Strümpell J: Zusammenhang zwischen Stressempfindung, Stressverarbeitung und Herzfrequenzvariabilität bei Beschäftigten in der industriellen Produktion. Med. Diss. München 2007
- Vasan RS, Glazer NL, Felix JF, Lieb W, Wild PS, Felix SB, Watzinger N, Larson MG, Smith NL, Dehghan A (2009): Genetic variants associated with cardiac structure and function: a meta-analysis and replication of genome-wide association data. *Jama* 302, 168-178
- Wang HS, Arvanitis DA, Dong M, Niklewski PJ, Zhao W, Lam CK, Kranias EG, Sanoudou D (2011): SERCA2a superinhibition by human phospholamban triggers electrical and structural remodeling in mouse hearts. *Physiol Genomics* 43, 357-364
- Westaway SK, Reinier K, Huertas-Vazquez A, Evanado A, Teodorescu C, Navarro J, Sinner MF, Gunson K, Jui J, Spooner P (2011): Common variants in CASQ2, GPD1L, and NOS1AP are significantly associated with risk of sudden death in patients with coronary artery disease. *Circ Cardiovasc Genet* 4, 397-402
- Wolf RM, Glynn P, Hashemi S, Zarei K, Mitchell CC, Anderson ME, Mohler PH, Hund TJ (2013): Atrial fibrillation and sinus node dysfunction in human ankyrin-B syndrome: a computational analysis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 304(9), H 1253-1266
- Yi G, Gallagher MM, Yap YG, Guo XH, Harrison R, McDonald JT, Camm AJ, Malik M (2000): Consistency of multicenter measurements of heart rate variability in survivors of acute myocardial infarction. *Pacing Clin Electrophysiol* 23, 157-164
- Zehender M (1999): T-Wellen-Alternans. *Dt Arztebl* 96, A 2227-2232
- Zipes DP, Camm AJ, Borggrefe M, Buxton AE, Chaitman B, Fromer M, Gregoratos G, Klein G, Moss AJ, Myerburg RJ (2006): ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death-executive summary. *Eur Heart J* 27(17), 2099-2140

Zuern CS, Barthel P, Bauer A (2011): Heart rate turbulence as risk-predictor after myocardial infarction. *Front Physiol* 2, 99