

**I. MEDIZINISCHE KLINIK UND POLIKLINIK DER TECHNISCHEN
UNIVERSITÄT MÜNCHEN
KLINIKUM RECHTS DER ISAR**

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Albert Schömig)

*C825T G-Protein beta3-Untereinheit Polymorphismus und AV-Knoten-
Reentrytachykardie: Verminderte Häufigkeit des 825 TT Genotyps bei Patienten mit AV-
Knoten-Reentrytachykardie*

Michèle Schmitt

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

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

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. C. Schmitt
2. Univ.-Prof. Dr. R. Oberhoffer

Die Dissertation wurde am 14.08.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 18.07.2007 angenommen.

Gliederung

<u>1. Einleitung</u>	1
1.1. G-Proteine.....	2
1.2. Der C825T GNB3 Polymorphismus.....	4
1.3. Klinische Korrelate des T-Allel.....	6
1.4. Weltweite Verteilung des T-Allels.....	7
1.5. Rolle von Gβ bei der Signaltransduktion im Atrium.....	8
1.6. Die AV-Knoten-Reentrytachykardie.....	9
<u>2. Fragestellung</u>	12
<u>3. Methodik</u>	13
3.1. Studienkonzept und Populationsplanung.....	13
3.1.1. <i>Patientenkollektive</i>	13
3.1.2. <i>Ein- und Ausschlußkriterien</i>	13
3.2. Datenerhebung.....	14
3.2.1. <i>Rhythmusevaluation</i>	14
3.2.2. <i>Definitionen</i>	14
3.3. Experimente - Bestimmung des GNB3 C825T Genotyps.....	16
3.3.1. <i>Probenentnahme</i>	16
3.3.2. <i>DNA-Isolierung und Reinigung</i>	16
3.3.3. <i>PCR-Reaktion</i>	17
3.3.4. <i>Restriktionsverdau</i>	19
3.3.5. <i>Gelelektrophorese</i>	20
3.3.6. <i>Auswertung</i>	21
3.4. Statistik und Datenverarbeitung.....	21
<u>4. Ergebnisse</u>	22
4.1. Patientencharakteristika.....	22
4.2. GNB3 Genotyp Verteilung und AVNRT.....	24
4.3. T- und C-Allel Verteilung und kardiovaskuläre Risikofaktoren.....	26
4.3.1. <i>T- und C-Allel Verteilung und Arterielle Hypertonie</i>	26
4.3.2. <i>T- und C-Allel Verteilung und Adipositas</i>	27
4.3.3. <i>T- und C-Allel Verteilung und Diabetes mellitus</i>	27
<u>5. Diskussion</u>	28
5.1. Assoziation zwischen dem GNB3 Genotyp und AVNRT.....	28
5.2. Assoziation zwischen dem T-Allel und kardiovaskulären Risikofaktoren.....	30

5.2.1. Assoziation zwischen dem T-Allel und Arterieller Hypertonie.....	31
5.2.2. Assoziation zwischen dem T-Allel und Adipositas.....	31
5.2.3. Assoziation zwischen dem T-Allel und Diabetes.....	32
5.3. Limitationen und Kritikpunkte der Arbeit.....	32
5.3.1. Studiendesign.....	32
5.3.2. Patientenselektion.....	33
5.3.3. Kein Kausalitätsbeweis.....	33
5.4. Ausblick.....	34
<u>6. Zusammenfassung.....</u>	<u>35</u>
<u>7. Abkürzungsverzeichnis.....</u>	<u>37</u>
<u>8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....</u>	<u>39</u>
<u>9. Literaturverzeichnis.....</u>	<u>40</u>

1. Einleitung

Unter Polymorphismus versteht man das gleichzeitige Vorkommen von unterschiedlichen Phänotypen in einer Population. Beim genetischen Polymorphismus gibt es für ein Gen mehrere Zustandsformen (Allele) mit den entsprechenden phänotypischen Ausprägungen. Bei Allelen handelt es sich um alternative Formen von Genen, die denselben Lokus im Chromosom einnehmen. Die verschiedenen Allele unterscheiden sich voneinander durch eine oder mehrere mutative Veränderungen, die im Verlauf der Evolution in der DNA entstanden sind. Von Mutation spricht man bei einer bleibenden Veränderung des genetischen Materials, die auf Tochterzellen vererbt wird. Generell unterscheidbar sind Punktmutationen durch Austausch, Verlust oder Insertion von Basenpaaren innerhalb eines Gens oder Chromosomenmutation mit Veränderung der Chromosomenstruktur. Ohne die Fähigkeit zur spontanen Mutation der Gene wäre keine evolutionäre Weiterentwicklung denkbar.

Beim Menschen sind bereits mehr als zwei Millionen genetische Polymorphismen bekannt. Es handelt sich vorwiegend um Einzelbasensubstitutionen sowohl in kodierenden als auch in nicht kodierenden Bereichen des Genoms (single nucleotide polymorphisms oder SNPs). Diese Polymorphismen spiegeln die genetische Grundlage für die Einzigartigkeit jedes Individuums wieder. Auch im Stoffwechsel existieren individuelle genetische Unterschiede in der Effizienz von chemischen Reaktionen. Dies kann in einer individuellen Neigung zu bestimmten Krankheiten oder einem relativen Schutz resultieren. Entscheidend für das tatsächliche Auftreten einer Krankheit sind andere, zusätzliche Faktoren wie Umwelteinflüsse. So können die meisten Krankheitsprozesse als Folge der Interaktion von Umwelteinflüssen mit individuellen genetischen Gegebenheiten des betreffenden Individuums aufgefasst werden. Eine Erkrankung ist genetisch bedingt, wenn sie vorwiegend oder ausschließlich durch Störungen im genetischen Programm von Zellen und Geweben verursacht wird. Mehr als 3000 definierte Erkrankungen sind bekannt, die monogen durch eine einzelne Mutation verursacht worden sind, von mehr als 1000 ist die genaue molekulargenetische Ursache bekannt. Monogen verursachte Krankheiten sind so verschieden wie die genetische Information in den entsprechenden Genen. Sie werden nach den Mendelschen Gesetzmäßigkeiten vererbt und gehen auf eine strukturelle Veränderung eines Gens zurück. Zwischen rein endogenen (genetischen) und umweltbedingten Ursachen von Krankheiten gibt es ein breites Spektrum von genetisch bedingter Prädisposition und auslösenden Faktoren (multifaktoriell bedingte Erkrankungen). Viele relativ häufige, chronisch verlaufende Erkrankungen wie arterielle Hypertonie, Atherosklerose, Hyperlipidämie, Diabetes mellitus, Gicht und psychiatrische Erkrankungen gehören zu dieser wichtigen Kategorie.

Klinische Bedeutung haben die Polymorphismen insofern, als mit DNA-Markern über Kopplungsanalysen präklinisch und pränatal bestimmte Erkrankungen nachgewiesen werden können. Außerdem spielen sie eine Rolle in der forensischen Medizin und Kriminalistik.

Genetische Polymorphismen eröffnen einerseits ein weites Feld diagnostischer Möglichkeiten, andererseits sind sie von großer Bedeutung sowohl für die weitere Aufklärung des menschlichen Genoms als auch der genetischen Herkunft des Menschen.

In dieser Arbeit wird ein möglicher Zusammenhang zwischen dem C825T G-Protein $\beta 3$ -Untereinheit Polymorphismus und der AV-Knoten-Reentrytachykardie untersucht.

1.1. G-Proteine

G-Proteine sind Schlüsselemente der transmembranären zellulären Signaltransduktion. Zunächst soll kurz auf die Biochemie der G-Proteine und auf den Mechanismus der Signaltransduktion durch G-Proteine eingegangen werden:

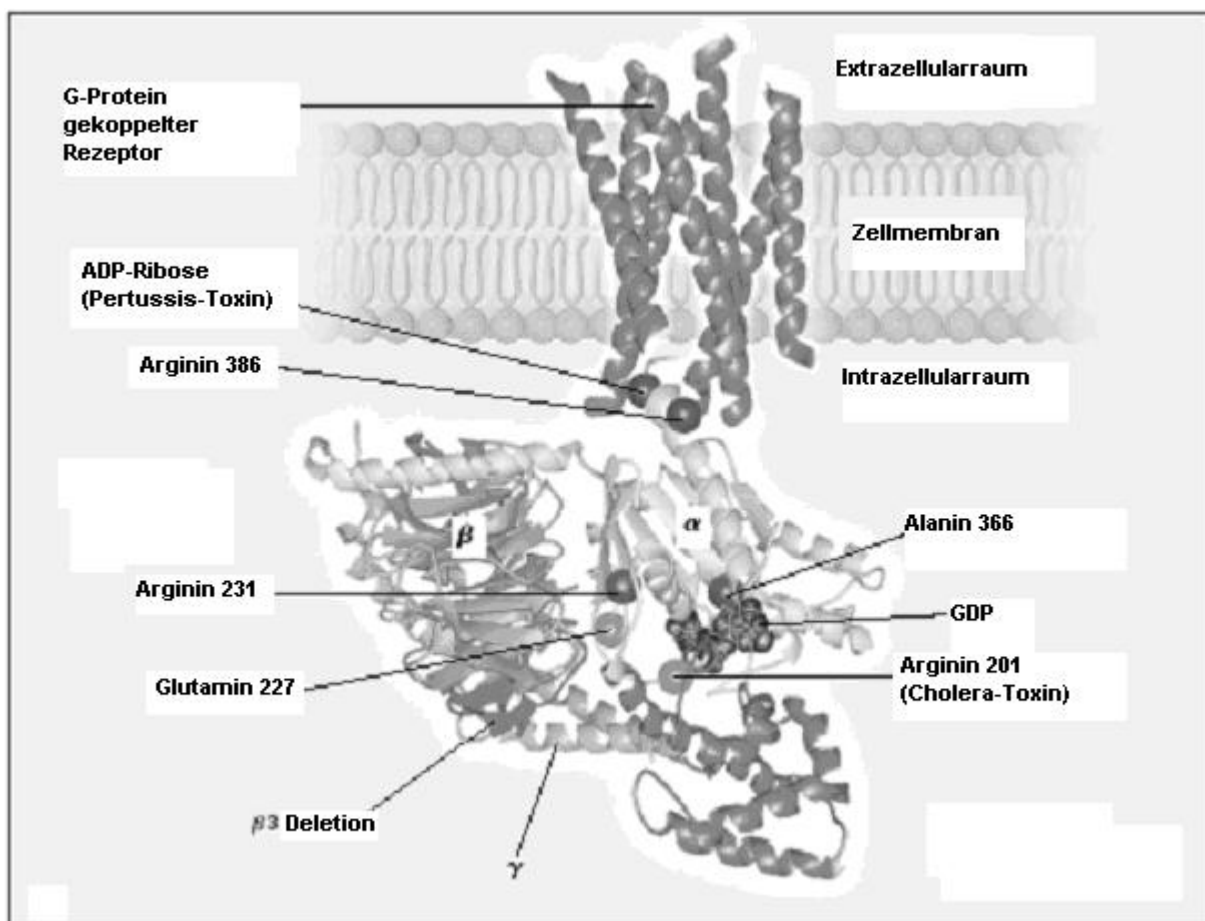


Abb. 1: G-Protein-Struktur: Die Abbildung zeigt die wahrscheinliche relative Orientierung des $\alpha\beta\gamma$ -Trimers zu einem G-Protein-gekoppelten Rezeptor und der Zellmembran. Die angegebenen Aminosäuren kennzeichnen die Lokalisation von pathogenen Punktmutationen. Pertussistoxin katalysiert die ADP-Ribosylierung eines Cystein-Moleküls im C terminalen Ende der α -Untereinheit und verhindert so die Aktivierung durch Rezeptoren. (modifiziert nach Farfel et al. ⁹)

Heterotrimere regulatorische Guaninnukleotid-bindende Proteine (G-Proteine) gehören zur Superfamilie der GTP-bindenden Proteine oder GTP-asen. G-Proteine kommen in normalen Zellen sowohl im Membranbereich als auch intrazellulär vor. Es wird angenommen, dass 50-60 % der klinisch relevanten Drogen ihre Wirkung über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermitteln.¹⁰ Abbildung 1 zeigt ein membranständiges G-Protein in Interaktion mit einem Rezeptor.

Die membranständigen G-Proteine übertragen Signale von 7-Helix-Rezeptoren auf Effektorproteine. Intrazelluläre G-Proteine sind an der Kontrolle von Proteinsynthese und Proteintransport beteiligt. G-Proteine bestehen aus den drei Komponenten α , β und γ .

Ihre α -Untereinheit ist in der Lage ein Guanin-Nukleotid zu binden (entweder GDP oder GTP). Das Protein zeigt eine schwache GTPase-Aktivität. Im Ruhezustand trägt das G-Protein ein GDP. Wenn der 7-Helix-Rezeptor seinen Signalstoff bindet, ändert sich die Rezeptorkonformation in der Art, dass ein GTP-Molekül anlagern kann.

Abbildung 2 stellt die folgenden Vorgänge bildlich dar. Die Wechselwirkung mit dem Rezeptor veranlasst das G-Protein, GDP gegen GTP auszutauschen. Dadurch wird das G-Protein aktiviert. Es trennt sich vom Rezeptor. Durch Änderung der Konformation der α -Untereinheit wird die Affinität zwischen $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ geschwächt und das Protein zerfällt in eine α - und eine $\beta\gamma$ -Einheit. Entgegen früherer Annahmen bindet nicht nur die GTP-tragende α -Einheit an ein Effektorprotein und ändert dessen Aktivität, sondern ebenso die $\beta\gamma$ -Einheit. Ionenkanäle werden geöffnet oder geschlossen, Enzyme werden aktiviert oder inaktiviert. Durch langsame enzymatische Hydrolyse des GTP zu GDP kehrt die α -Einheit in den inaktiven Zustand zurück und verbindet sich wieder mit der $\beta\gamma$ -Einheit. Damit ist der Ausgangszustand wiederhergestellt.

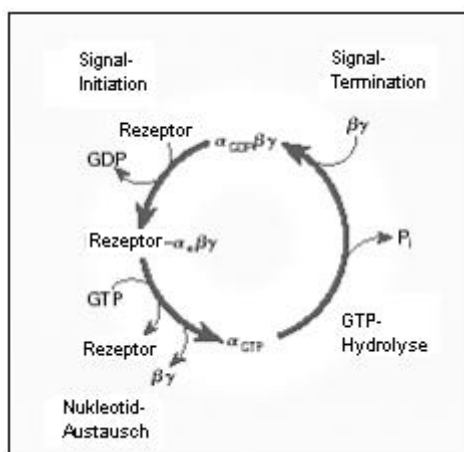


Abb. 2: GTP Bindungs- und Hydrolyse-Zyklus. Weitere Ausführungen im Text. (modifiziert nach Farfel et al. ⁹)

G-Proteine werden nach ihrer α -Untereinheit klassifiziert. Bisher sind über 20 bekannt, die in vier Unterfamilien (G_s , G_i , G_q , G_{12}) zusammengefasst werden. Außerdem wurden 6 β - und 12 γ -Untereinheiten identifiziert. Die β -Untereinheit besteht aus zwei strukturell unterschiedlichen Regionen, einem aminoterminalen Segment, einer α -Helix von

ungefähr 20 Aminosäuren, und dem Rest des Moleküls, einer propellerflügelartig angeordneten siebenfach wiederholten Sequenz. Von den 6 bekannten β -Untereinheiten sind 5 über ihre Länge von ~340 Aminosäuren zu 80% identisch, G β 5 deckt sich nur zu 53% mit den anderen β -Untereinheiten und hat 13 zusätzliche Aminosäuren. Die β 3-Untereinheit wurde erstmals 1990 von Levine et al. erwähnt.¹⁹ Sie kommt ubiquitär vor und spielt eine Rolle bei diversen durch Pertussistoxin-sensitiven G $_i$ - und G $_q$ -Proteinen mediierten Zellantworten.

Das Molekulargewicht aller bekannten β -Untereinheiten variiert zwischen 35 und 39 kDa. Die $\beta\gamma$ -Untereinheiten mit ihrer Propeller-ähnlichen Struktur wirken an einer Vielzahl von Effektoren, zum Beispiel Ionenkanälen, etwa dem einwärtsgerichtenden G-Protein-kontrollierten Kalium-Kanal oder Calcium-Kanälen. Des Weiteren verändern sie die Aktivität von Phospholipase A2 und C, von Adenylatcyclasen, Calcium-ATPase-Pumpen, Rezeptorkinasen und beeinflussen viele zusätzliche Zellvorgänge, wie vesikuläre Transportmechanismen und die Regulierung der MAP-Kinasen und somit des Zellzyklus.⁶

Die pharmakologische Modulation der G-Protein-vermittelten Signaltransduktions-Kaskade ist zur Zeit fast ausschließlich auf Rezeptorebene möglich. Allerdings nutzt man häufig Bakterien-Toxine, um die Funktion von G-Proteinen zu studieren. Von besonderer Wichtigkeit sind Cholera toxin und Pertussistoxin. Cholera toxin bewirkt eine anhaltende Aktivierung der α -Einheit der Unterfamilien G $_s$ und G $_i$. Pertussistoxin verhindert die Interaktion zwischen Rezeptor und G-Protein durch ADP-Ribosylierung an der α -Einheit der Unterfamilie G $_i$ und G $_q$.²⁵

1.2. Der C825T GNB3 Polymorphismus

Der C825T Polymorphismus wurde erstmals 1998 von Siffert et al. als ein Risiko für Hypertonie beschrieben.⁴⁰ Dieser Polymorphismus liegt im Gen für die β 3-Untereinheit, GNB3 auf Chromosom 12p13. Das menschliche GNB3 Gen wurde im Jahr 2000 von Roskopf et al. komplett aufgeklärt.²⁹ Es handelt sich um ein Gen von 7,5 kb, bestehend aus 11 Exons und 10 Introns. Beim 825T-Allel kommt es zur Substitution von Cytosin durch Thymin an Position 825 im Exon 10 des Gens. Dies führt nicht zu einer Änderung der Aminosäuresequenz, sondern zur Translation in zwei alternative Splicing-Varianten, G β 3s und G β 3s-2, die in Exon 9 beziehungsweise in Exon 10 trunkiert sind. Diese beiden Splicing-Varianten sind um 123 beziehungsweise 129 Basenpaare verkürzt. Der C825T Polymorphismus liegt mehr als 1700 Basenpaare entfernt von der alternativen Splicing-Stelle von G β 3s. Noch ist nicht ganz klar, wie ein genetischer Polymorphismus in Exon 10 ein alternatives Splicing in Exon 9 beeinflussen kann. Siffert et al. suchten daher nach weiteren

Polymorphismen und fanden den häufigen C1429T Polymorphismus. Das Vorhandensein des 1429T Allels steht in enger Verbindung mit dem des 825T Allels. Außerdem wurde ein neuer Polymorphismus A(-350)G in der Promoterregion identifiziert. Dennoch besteht bezüglich des komplexen alternativen Splicings von GNB3 noch Aufklärungsbedarf.

Das Gβ-Protein gehört zur "β-Propeller"-Familie, bei der die repetitiven Sequenzen, in diesem Fall sieben, wie Drehflügel eines Propellers um ein Zentrum angeordnet sind. Bei Gβ3s werden nur sechs Flügel ausgebildet, genauer gesagt fehlen die letzten vier Aminosäuren des dritten sowie ein großer Teil des vierten Flügels, wie in Abbildung 3 dargestellt.

Gβ3s-2 wurde 2003 von Roskopf et al. entdeckt.³¹ Auch hier führt die Verkürzung um diesmal 129 Basenpaare zum Verlust eines Propellerflügels und es resultiert eine Struktur, die der von Gβ3s sehr ähnlich ist.

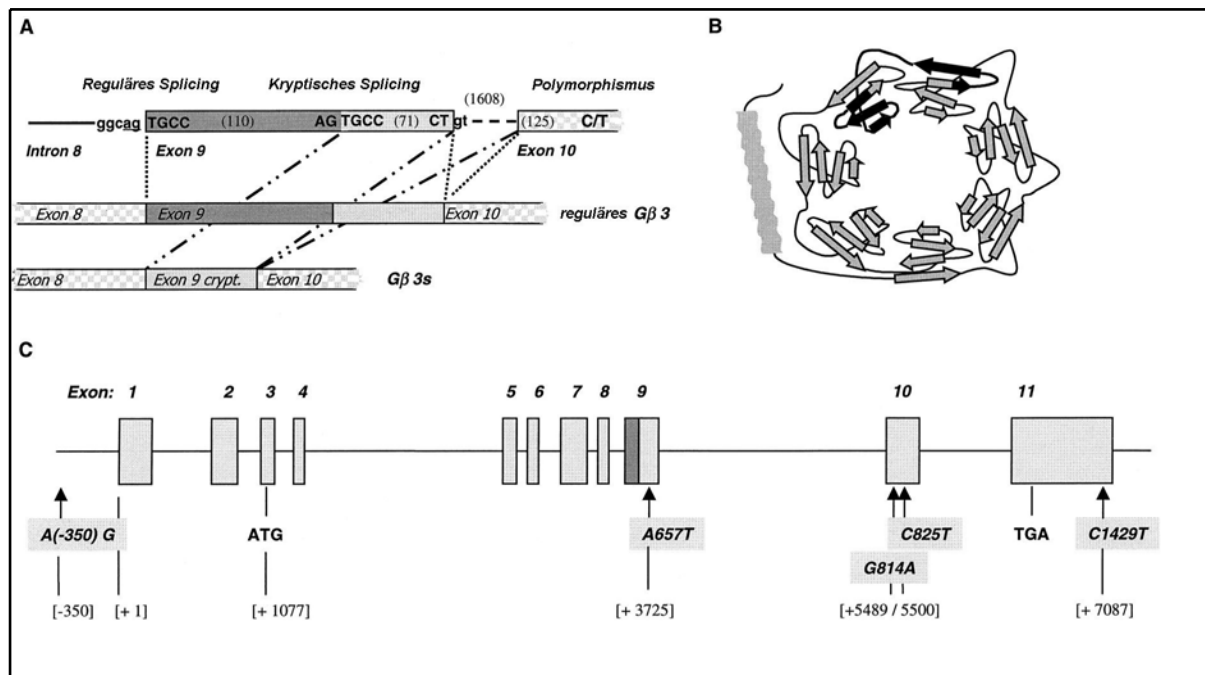


Abb. 3: Genstruktur und alternativer Splicingmechanismus von GNB3. A, Gezeigt sind die Exons 8, 9 und 10 und die intervenierenden Introns. Das alternative Splicing von Exon 9 führt zu einer Deletion in Gβ3-s (dunkelgrau). C/T zeigt den C825T Polymorphismus. B, Modell der Struktur von GNB3, einem Propellerprotein bestehend aus 7 repetitiven Sequenzen. Die bei Gβ3s gelöschten Bereiche sind schwarz dargestellt. C, Gen Struktur von GNB3. Die Boxen repräsentieren die Exons, ATG und TGA die Start- beziehungsweise Stop-Codons für die Translation. Die Pfeile zeigen die Lokalisation der verschiedenen Polymorphismen in GNB3. (modifiziert nach Roskopf et al.²⁹)

Homozygote 825C-Allel-Träger bilden nur das Wildtyp Genprodukt, während homo- und heterozygote 825T-Allel-Träger sowohl die Wildtyp Gβ3-, als auch die Gβ3-s- und Gβ3-s2-mRNA exprimieren.

Ruiz-Velasco und Ikeda veröffentlichten im Jahre 2003 eine Studie, in der Gβ3s keine biologische Aktivität aufwies, insbesondere wurde weder die Aktivität von N-Typ Calcium-Kanälen noch von einwärtsgerichteten, G-Protein-regulierten Kalium-Kanälen beeinflusst.³² Vor kurzem wurde von Rosskopf et al. eine neue Variante Gβ3v (Abb. 4) entdeckt.³⁰ Bei diesem Protein fehlen die Propeller-Flügel 5, 6 und 7. Das Gβ3v ist jedoch nicht mit einem Allel des GNB3 C825T Polymorphismus assoziiert.

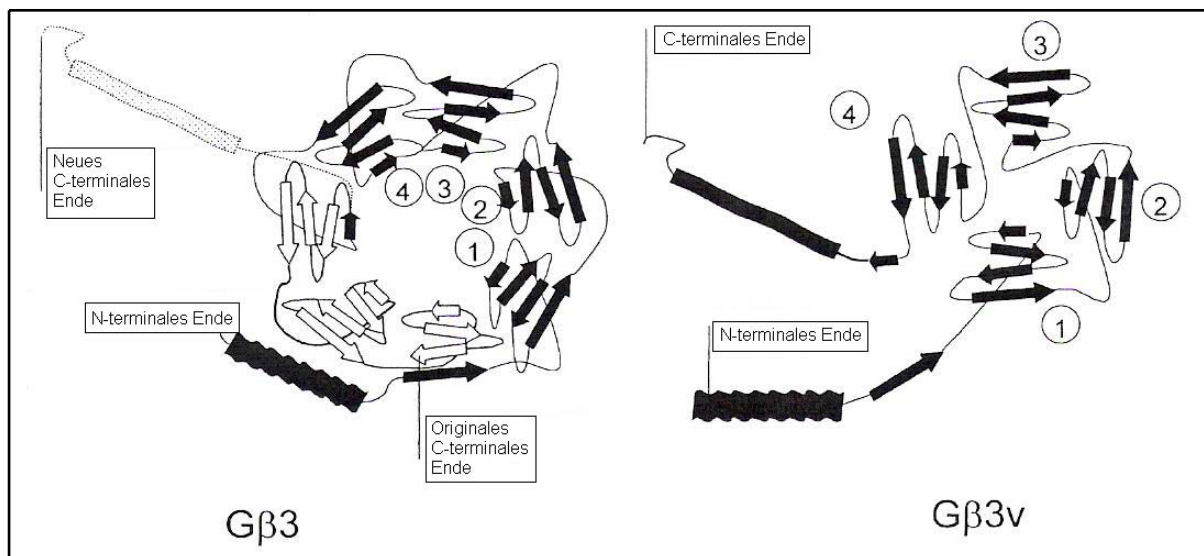


Abb. 4: Struktur von Gβ3 und Gβ3v. links: Gβ3 hat eine propellerartige Struktur mit sieben Flügeln und eine n-terminale coiled-coil Domäne. Die weißen Pfeile stehen für die bei Gβ3v fehlenden Anteile. rechts: hypothetische Vier-Propeller-Flügel-Struktur von Gβ3v (modifiziert nach Rosskopf et al.³⁰)

1.3. Klinische Korrelate des T-Allels

Seit der erstmaligen Beschreibung des C825T Polymorphismus im Jahr 1998 wurde in zahlreichen medizinischen Bereichen geforscht und versucht, Assoziationen mit einer Vielzahl von Krankheitsprozessen, mit der Signaltransduktion in menschlichen Zellen und Geweben sowie der pharmakologischen Antwort der Zellen nachzuweisen. Solche Assoziationen wären nicht allzu überraschend, da die G-Protein-Aktivierung ein Schlüsselereignis in der intrazellulären Signaltransduktion darstellt.

Das 825T-Allel stellte sich nicht nur als Risikofaktor für Hypertonie^{12,35} heraus, sondern zahlreiche Studien zeigten für die weiße Population Europas ein erhöhtes Risiko für Übergewicht^{11,38,39} und verschiedene kardiovaskuläre Erkrankungen, wie koronare Herzkrankheit^{24,45} und Schlaganfall^{23,46}, und außerdem für Depression^{3,49}. Im Gegensatz hierzu bleibt die Assoziation des 825T-Allels mit diesen Erkrankungen bei anderen, nicht-kaukasischen Ethnien kontrovers.^{16,18,20,43}

Des Weiteren dient das T-Allel als pharmakologischer Marker, um die Antwort auf viele Pharmaka vorauszusagen, wie Diuretika⁴⁴, Antidepressiva⁴⁹, Sildenafil⁴¹, Clonidin²², Angiotensin II⁴⁷, Endothelin-1³⁷, und die Antwort auf die Hepatitis B-Impfung²¹, um nur einige zu nennen.

Außerdem ist das T-Allel mit Diabetes mellitus, Linksherzhypertrophie, Salzretention, Thrombozytenaggregation und immunologischen Phänomenen assoziiert.³⁷

Kürzlich stellte sich der TT Genotyp als protektiver Faktor gegen Vorhofflimmern heraus.³⁴

1.4. Weltweite Verteilung des T-Allels

Interessant ist die Verteilung des 825T Allels unter den verschiedenen ethnischen Populationen.³⁷ Bei nicht-humanen Primaten unbekannt, rangiert das 825T-Allel mit einer sehr hohen Frequenz von 60-80% bei Buschmännern, Aboriginis, Schwarzafrikanern und Schwarzamerikanern weit vor den Ostasiaten mit 40-60% und den Kaukasiern mit 30%. Eine Übersicht gibt Abbildung 5.

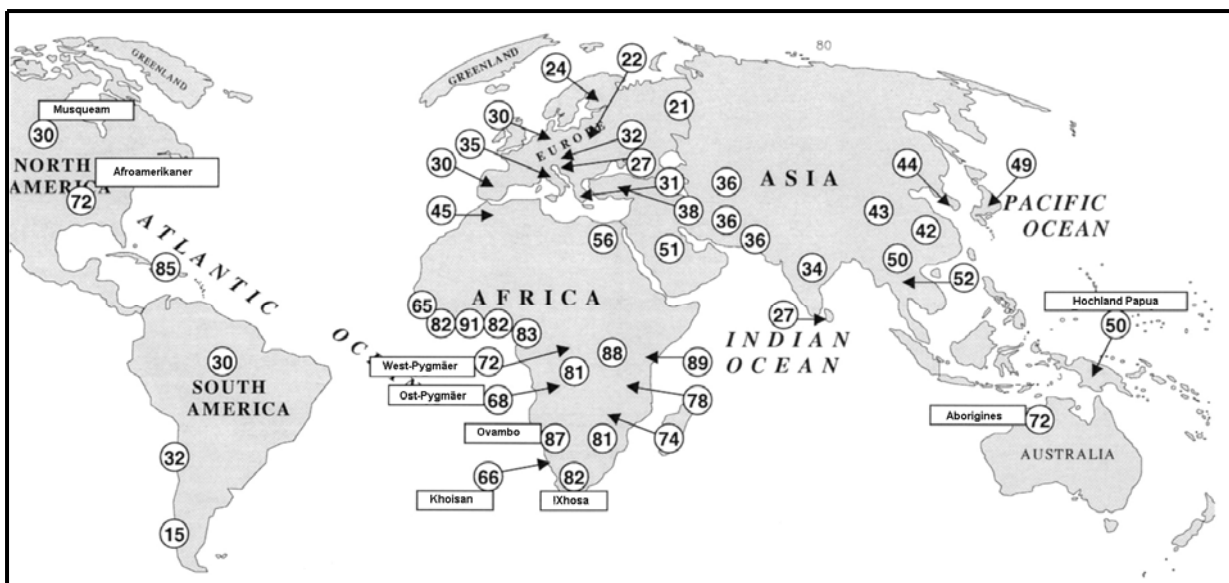


Abb. 5: Weltweite prozentuale Verteilung des GNB3 825T Allels (modifiziert nach Siffert et al.³⁸)

Zum einen wird hierdurch die Migration des Menschen aus der Wiege Ostafrika in den Rest der Welt deutlich, zum anderen fällt auf, dass gerade solche Ethnien eine hohe Frequenz des T-Allels aufweisen, welche unter westlichen Lebensbedingungen besonders anfällig für Zivilisationskrankheiten wie Übergewicht, Bluthochdruck und kardiovaskuläre Erkrankungen sind.

1.5. Rolle von G β bei der Signaltransduktion im Atrium

Bevor auf die Rolle von G β bei der Signaltransduktion im Vorhof eingegangen wird, sollen kurz die verschiedenen Kaliumkanal-Typen und ihre Funktion skizziert werden.⁷

Kardiale Kaliumkanäle sind Membranproteine, die die passive Bewegung von Kalium-Ionen durch die Zellmembran entlang ihres elektrochemischen Gradienten erlauben. Sie regulieren das Ruhepotential, die Frequenz der Schrittmacherzellen und die Form und Dauer des kardialen Aktionspotentials. Sie sind wichtige Zielstrukturen für die Aktion von Neurotransmittern, Hormonen, Medikamenten und Toxinen, die die Herzfunktion beeinflussen. Die Blockierung der meisten Kaliumkanäle verlängert die Dauer des Aktionspotentials und die Refraktätszeit.

Kardiale Kaliumströme können aufgrund ihrer funktionellen und pharmakologischen Eigenschaften unterschieden werden. Die Kaliumkanäle werden eingeteilt in spannungsabhängig und ligandenabhängig. Ein spannungsabhängiger Kaliumstrom ist beispielsweise I_{K1}. Zu der zweiten Kategorie zählt man unter anderem den durch Acetylcholin aktivierten Kaliumstrom I_{K, ACh}. Auf die weiteren Kaliumströme im Herzen soll hier nicht eingegangen werden.

Sowohl I_{K1} als auch I_{K, ACh} gehören zu den Einwärtsgleichrichterströmen. Beide Ströme spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials und bei der Repolarisation, insbesondere während der terminalen Repolarisationsphase des Aktionspotentials. Die Gleichrichtung dieser Ströme beinhaltet einen erleichterten Einwärtsstrom und einen erschwerten Auswärtsstrom.

In menschlichen Vorhofmyozyten sind Pertussistoxin-sensitive G_i-Proteine zur Signalübertragung von muskarinischen M₂-Rezeptoren auf Acetylcholin-aktivierte Kaliumkanäle notwendig. G_i-Proteine geben nach ihrer Aktivierung ihr $\beta\gamma$ -Dimer frei. Dieses bindet an den Acetylcholin-aktivierten Kaliumkanal und öffnet ihn durch direkte zytoplasmatische Interaktion. Die Aktivierung von I_{K, ACh} führt zu Hyperpolarisierung des Membranpotentials, verlangsamt die spontane Feuerrate der Schrittmacherzellen unter anderem im AV-Knoten und verzögert die atrioventrikuläre Konduktion. Er ist der Haupteffektor bei vagaler Stimulation in Vorhofmyozyten, die eine nicht einheitliche Verkürzung des Aktionspotentials und der Refraktätszeit nach sich zieht.

Braun et al.⁵ wiesen eine über Pertussistoxin-sensitive G-Proteine vermittelte Hemmung der einwärtsgleichrichtenden Kaliumströme I_{K1} und I_{K, ACh} durch α_1 -adrenerge Rezeptoren in Vorhofmyozyten von Kaninchen nach. Hieraus resultiert eine Verlängerung des

Aktionspotentials während der finalen Repolarisationsphase und eine Depolarisierung des Ruhemembranpotentials. Auch durch Proteinkinase C ließ sich eine Hemmung von I_{K1} nachweisen.¹⁵

Dobrev et al. gelang es, eine signifikante Assoziation zwischen dem 825T-Allel und der Größe von einwärtsgerichteten Kaliumströmen in menschlichen Vorhofmyozyten aufzuzeigen.⁸ Beim TT-Genotyp war die Strömungsdichte von I_{K1} signifikant größer als beim CC- oder CT-Genotyp. Für den $I_{K, ACh}$ gilt das Gegenteil, hier war die mittlere Amplitude bei den homozygoten T-Allel-Trägern vermindert. I_{K1} bestimmt das Ruhemembranpotential, daher könnte eine erhöhte Dichte von I_{K1} mit einem negativeren Membranpotential und einer beschleunigten Repolarisation einhergehen. Im Gegensatz hierzu ist $I_{K, ACh}$, der ebenfalls zum Ruhemembranpotential beiträgt, beim TT-Genotyp vermindert und es ließ sich in der Studie insgesamt kein verändertes Ruhemembranpotential nachweisen, was aber möglicherweise auf zu geringe Zellzahlen zurückzuführen sein könnte.

1.6. Die AV-Knoten-Reentrytachykardie

Die AV-Knoten-Reentrytachykardie ist eine der häufigsten Ursachen von regelmäßigen paroxysmalen supraventrikulären Tachykardien. Die Rhythmusstörung kann persistieren, tritt aber typischerweise paroxysmal auf.

Zur Erklärung AV-nodaler Echoschläge wurde 1956 das Konzept einer funktionellen Längsdissoziation des AV-Knotens aufgestellt. Moe et al. nahmen aufgrund experimenteller Untersuchungen die Existenz von 2 funktionell getrennten Leitungsbahnen α und β im AV-Knoten an, die sich hinsichtlich Refraktärzeit und Leitungsgeschwindigkeit unterscheiden. 1974 konnte Rosen die duale AV-Knotenphysiologie bei Patienten mit AV-Knoten-Reentrytachykardien nachweisen. Fällt ein vorzeitiger Impuls vom Vorhof ein, wird er in der β -Leitungsbahn blockiert. Die Erregung wird jedoch langsam entlang α fortgeleitet und kann nun den Leitungsweg β in retrograder Richtung aktivieren. Hieraus resultiert ein atriales "Echo" und bei fortlaufender Wiederholung der Kreiserregung eine AV-Knoten-Reentrytachykardie. Beim entsprechend veranlagten Patienten können diese Tachykardien reproduzierbar mittels programmierter Stimulation ausgelöst und unterbrochen werden.

Das Verständnis der Pathogenese der AV-Knoten-Reentrytachykardien wurde wesentlich durch die Entwicklung der Radiofrequenzkatheterablation verändert. Mit deren Hilfe gelang es, die verschiedenen Anteile des Reentry selektiv zu zerstören.

1992 wurde klar, dass es sich beim langsamen und schnellen Leitungsteil des AV-Reentry um anatomisch voneinander getrennte Strukturen - "Bahnen" - handelt, deren gemeinsame

Endstrecke der distale AV-Knoten ist. Dieses pathophysiologische Konzept zeigt Abbildung 6 schematisch.

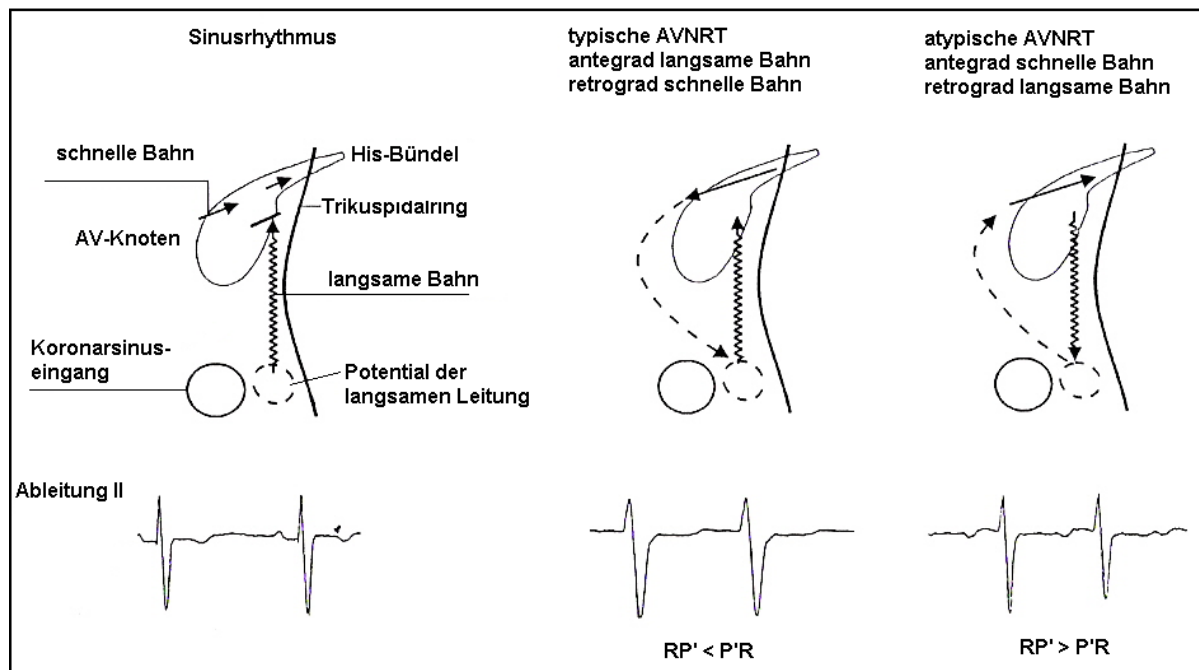


Abb. 6: Schematische Darstellung des pathophysiologischen Konzepts der AV-Knoten-Reentrytachykardie

Hierdurch wurde das bisherige Konzept einer funktionellen Längsdissoziation innerhalb des AV-Knotens als Reentrymechanismus abgelöst. Meist wird die Erregung über eine schnelle Bahn retrograd auf die Vorhöfe zurückgeleitet (typische AVNRT). Dies führt zu einer annähernd simultanen Erregung von Kammer und Vorhöfen. In 10% der Fälle ist die Erregungssequenz umgekehrt (atypische AVNRT). Diese Lokalisation der retrograden Bahn ist entscheidende Aufgabe einer invasiven elektrophysiologischen Untersuchung, aufgrund derer dann durch gezielte Zerstörung einer Bahn durch Katheterablation eine Heilung erreicht werden kann.

Patienten mit AV-Knoten-Reentrytachykardie haben im allgemeinen keine organische Herzerkrankung. Tachykardieassoziierte klinische Symptome reichen von Palpitationen, Nervosität, Dyspnoe, Pulsationen im Hals, vermehrter Urinausscheidung und Hypotonie bis zur Herzinsuffizienz, Synkope und Schock bei hämodynamisch relevanten hochfrequenten oder länger anhaltenden Tachykardien. Typisch sind u.a. die Erstmanifestation im jüngeren Lebensalter (28 ± 17 Jahre). Die Geschlechtsverteilung liegt bei $m:w=1:2$, häufig ist ein On-Off-Phänomen, Harndrang nach Tachykardieende und eine Terminierung durch Vagusaktivierung. Im EKG liegt eine regelmäßige Tachykardie mit meist schmalen Kammerkomplexen, seltener mit Verbreiterungen vor. Die P-Wellen sind meist nicht sichtbar

oder projizieren sich in den Beginn der ST-Strecke, die häufig gesenkt ist. Der Herzfrequenzbereich liegt bei 150-250/min.

In den letzten Jahren wurde vermehrt nach anatomischen Substraten der AV-Knoten-Reentry-Tachykardie gesucht. Ren et al.²⁸ ermittelten im dreidimensionalen intrakardialen Ultraschall von AVNRT-Patienten eine signifikante Erweiterung des Ostiums des Koronarsinus. Ein einfacher direkter Zusammenhang wird jedoch von den Autoren als unwahrscheinlich angenommen, vielmehr scheint das Substrat der AVNRT sowohl aus anatomischen als auch aus elektrophysiologischen Gesichtspunkten ableitbar zu sein.

Risikofaktor der AV-Knoten-Reentrytachykardie ist das weibliche Geschlecht, alle anderen wie Alter, arterielle Hypertonie, Diabetes, Herzinsuffizienz, Klappenvitium, Myokarditis, Congenitale Herzerkrankung, Hyperthyreose, Adipositas, Hypercholesterinämie, Nikotin und Alkohol sind fraglich. Als wahrscheinlich gilt eine genetische Komponente.

2. Fragestellung

Es stellt sich die Frage, ob der C825T Polymorphismus des GNB3 bei der Entstehung von atrialen Arrhythmien eine Rolle spielt. Ein vermindertes Risiko für das Auftreten von Vorhofflimmern beim TT-Genotyp wurde bereits nachgewiesen.³⁴ In dieser Arbeit wurde ein möglicher Zusammenhang mit der AV-Knoten-Reentrytachykardie durch eine Fall-Kontroll-Studie untersucht. Diese Frage liegt nahe aufgrund der bekannten Assoziation des C825T Polymorphismus mit verstärkter Signaltransduktion via Pertussistoxin-sensitive G_i -Proteine und der Veränderung der Strömungsdichte einwärtsgerichteter Kaliumkanäle in Vorhofmyozyten bei homozygoten GNB3 825T-Trägern. So ist insbesondere der $I_{K,ACH}$ von großer Bedeutung für AV-Knotenleitung. Durch einen Vagusreiz wird vermittelt durch eine Acetylcholinfreisetzung und G_i -Proteinaktivierung der $I_{K,ACH}$ verstärkt. Dadurch kommt es zu einer Hyperpolarisation und verminderter Erregbarkeit der Zellmembran, so dass die Überleitung im AV-Knoten gebremst wird und oder gar die Erregungsausbreitung von den Vorhöfen auf die Ventrikel blockiert wird. Möglicherweise beeinflussen deshalb die Intensität der einwärtsgerichteten Kaliumströme bei den verschiedenen Genotypen des C825T Polymorphismus die Anfälligkeit für die Entstehung einer AV-Knoten-Reentrytachykardie.

3. Methodik

3.1. Studienkonzept und Populationsplanung

3.1.1. Patientenkollektive

Die vorliegende Studie soll prüfen, ob der GNB3 Polymorphismus mit dem Auftreten von AV-Knoten-Reentrytachykardien (AVNRT) assoziiert ist.

Um dieser Fragestellung gerecht zu werden, waren zwei Patienten-Gruppen vorgesehen:

- die AVNRT-Gruppe
und
- die Kontrollgruppe

Dieser Vergleich soll aufzeigen, ob bei AVNRT-Patienten ein Genotyp des C825T Polymorphismus signifikant häufiger oder seltener vorkommt als in der Gesamtbevölkerung, hier repräsentiert durch die Kontrollgruppe, die definitiv keine AVNRT hat.

Die Studie wurde vom lokalen ethischen Komitee der Universität befürwortet und alle Patienten waren mit der Teilnahme einverstanden. Die Studie läuft konform mit den Prinzipien der Helsinki Deklaration.

Die AVNRT-Gruppe besteht aus 408 konsekutiven Patienten des Deutschen Herzzentrums München mit dokumentierter AV-nodaler-Reentrytachykardie, die Kontrollgruppe aus 213 konsekutiven Patienten, die im Herzzentrum wegen anderer Rhythmusstörungen eine elektrophysiologische Untersuchung (EPU) erhielten und bei denen weder eine induzierbare AVNRT noch AV-nodale Echoschläge vorlagen.

Die Kontrollpatienten wurden während derselben Zeitspanne rekrutiert wie die AVNRT-Patienten.

Alle Patienten wurden retrospektiv in einer großen Datenbank hinsichtlich persönlicher Daten, Rhythmusstörung, kardiologischem Risikoprofil und Untersuchungsergebnissen dokumentiert.

3.1.2. Ein- und Ausschlusskriterien

Um möglichst aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, wurden die Studien-Patienten nach strengen Kriterien beurteilt und ausgewählt. Ausgeschlossen wurden Patienten mit LQTS, WPW-Syndrom und Vorhofflimmern/-flattern. Außerdem nicht berücksichtigt wurden Patienten mit signifikanter koronarer Herzkrankheit, dilatativer und hypertrophischer Kardiomyopathie, kongenitaler Herzerkrankung sowie Erkrankungen des Klappenapparates und Myokarditis in der Vorgeschichte. Patienten mit linksventrikulärer Hypertrophie auf dem Boden von arteriellem Hypertonus und erhaltener oder leichtgradig reduzierter

linksventrikulärer Ejektionsfraktion (LVEF > 50%) wurden in beiden Gruppen belassen. Weitere Ausschlusskriterien waren schwere begleitende pathologische Zustände wie Hyperthyreoidismus, Alkoholabusus und chronische Lungenerkrankung (außer sie war gut eingestellt). Patienten mit Synkopen aufgrund kardiovaskulärer Probleme wurden nicht in die Studie eingeschlossen, da der GNB3 Polymorphismus eine Rolle bei der orthostatischen Dysregulation des Blutdruckes spielt. Patienten mit Herzschrittmacher- oder Cardioverter-Defibrillator-Implantation vor dem Auftreten von AVNRT wurden ebenfalls ausgeschlossen. Schließlich wurde als Altersgrenze 75 Jahre festgelegt, da der GNB3 Polymorphismus mit der Lebenserwartung assoziiert sein könnte.

3.2. Datenerhebung

3.2.1. Rhythmevaluation

Bei allen Patienten der AVNRT-Gruppe wurde aufgrund von paroxysmalen oder rezidivierenden supraventrikulären Tachykardien oder bei Verdacht auf AV-Knoten-Reentrytachykardie eine elektrophysiologische Untersuchung durchgeführt. Bei allen wurde eine AVNRT dokumentiert und nach Möglichkeit wurde in derselben Sitzung eine Katheterablation der für das Reentry verantwortlichen Leitungsbahn vorgenommen.

In der Kontrollgruppe war anamnestisch keine atriale Tachyarrhythmie eruierbar. Auch in vorexistierenden EKGs durfte sich kein Hinweis darauf finden lassen. Bei Patienten mit Palpitationen wurde mindestens ein Langzeit-EKG durchgeführt. Wenn die Palpitationen einzig auf dokumentierte vorzeitige ventrikuläre oder supraventrikuläre Schläge zurückzuführen waren, war dies kein Ausschlusskriterium. Anders das Vorhandensein von nicht anhaltenden atrialen Tachykardien von mehr als 4 Schlägen. Diese Patienten wurden bei der Studie nicht berücksichtigt. Ebenfalls ausgeschlossen wurden Patienten mit Vorhofflimmern und -flattern oder Tachykardien mit akzessorischen atrioventrikulären Leitungsbahnen.

3.2.2 Definitionen

In die Datenbank gingen neben den persönlichen Daten und der bei allen durchgeführten Rhythmevaluation (EKG, EPU) auch die gängigen kardiovaskulären Risikofaktoren wie Diabetes mellitus, Nikotinabusus, Hypertonie, Hypercholesterinämie, Hyperlipidämie, Adipositas, familiäre Disposition und Alkoholabusus ein. Ebenfalls dokumentiert wurden die Ergebnisse der je nach Patient unterschiedlichen weiterführenden Untersuchungen. Dazu zählen die Herzkatheter-Untersuchung, Laboranalysen, Langzeit-EKG, Belastungs-EKG und

die Myokardszintigraphie. Alle Patienten erhielten vor der EPU eine Herzechokardiographie. Außerdem festgehalten wurde die Medikation zum Zeitpunkt des Auftretens der Beschwerden sowie natürlich der GNB3-Genotyp.

In der Folge soll kurz auf die Definitionen der Risikofaktoren und Grunderkrankungen der Patienten sowie auf die genauen Modalitäten bei einigen Untersuchungen und bei der Dokumentation der Ergebnisse eingegangen werden.

Von Diabetes mellitus wurde gesprochen, wenn eine Therapie mit Insulin oder oralen Antidiabetika gegeben wurde, wenn Patienten eine diätetische Therapie verfolgten, oder wenn abnorme Nüchtern-Blutglukose-Werte beziehungsweise Glukose-Toleranz-Werte basierend auf dem WHO-Kriterien⁴⁸ dokumentiert wurden.

Als Raucher wurden jene Personen betrachtet, die während der sechs vorangegangenen Monate regelmäßiges Rauchen angaben.

Die Diagnose der systemischen arteriellen Hypertonie stellten wir, wenn die Patienten eine Therapie mit Antihypertensiva erhielten. Ebenfalls als hyperten eingestuft wurden Patienten mit einem systolischen Blutdruck von 140 mmHg und höher und/oder einem diastolischen Blutdruck von 90 mmHg und höher bei mindestens zwei Messungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

Von erhöhtem totalem Serumcholesterin sprachen wir bei einem dokumentierten totalen Cholesterinwert von $> 6,2$ mmol/l (240 mg/dl).

Adipositas wurde definiert als ein Body-Mass-Index (BMI) von >26 . Der BMI wurde nach der bekannten Formel $BMI = \text{Körpergewicht (kg)} / \text{Körpergröße}^2 (\text{m}^2)$ berechnet.

Eine familiäre Disposition besteht, wenn mindestens ein erstgradiges Familienmitglied im Alter von unter 60 Jahren eine kardiovaskuläre Erkrankung aufweist, oder zwei Familienmitglieder von über 60 Jahren.

Alkoholabusus wurde nur im Fall von Alkoholabhängigkeit und Quartalssäufertum als positiv gewertet.

Bei jedem Patienten wurde in Halblinksseitenlage ein zweidimensionales M-mode Echokardiogramm durchgeführt. Gemäß den Kriterien der American Society of Echocardiography³³ wurden diastolisch die ventrikuläre Hinterwand- und Septumdicke gemessen. Wenn mindestens einer dieser Parameter die Marke von 12 mm erreichte oder übertraf, wurde dies als Linksherzhypertrophie gewertet.

Der Ausschluss von Patienten mit koronarer Herzerkrankung (KHK) wurde gewährleistet durch den Nachweis von völlig glattbegrenzten Koronargefäßen oder Gefäßwandirregularitäten mit weniger als 10% Lumeneinengung in der Koronarangiographie.

59,2% der Kontroll- und 26,7% der AVNRT-Patienten erhielten eine Koronarangiographie. Bei den übrigen Patienten ohne Koronarangiographie fehlten klinische Hinweise wie pektanginöse Beschwerden und Belastungs-Tests ergaben keinen Anhalt für eine signifikante koronare Herzerkrankung. Diese Belastungs-Tests bestanden aus Belastungs-EKG oder Myokardszintigraphie.

3.3. Experimente - Bestimmung des GNB3 C825T Genotyps

Zur Bestimmung der Gendaten wurde das in den Zellkernen der Leukozyten enthaltene Erbgut isoliert, gereinigt, das für die Bestimmung relevante DNA-Teilstück amplifiziert, nach dem Prinzip der RFLP (restriction fragment length polymorphism) aufgespalten und die Ergebnisse mittels einer Gelelektrophorese dargestellt.

Im Anschluss sind die Einzelschritte der Analyseprozedur erläutert.

3.3.1. Probenentnahme

Die Blutproben wurden routinemäßig im Katheterlabor peripher venös entnommen. Sofern keine sofortige Bearbeitung im Labor durchgeführt wurde, wurden die Proben bei -20°C gelagert, ebenso Testvolumina post analysis im Sinne einer Blutbank für Nachkontrollen. Zur Bearbeitung wurden die Proben für die Zeit der Entnahme der Analysevolumen kurz auf Raumtemperatur gebracht.

3.3.2. DNA-Isolierung und Reinigung

Ausgangsmaterial für den analytischen Teil ist EDTA-Vollblut. Zur Weiterverarbeitung des Erbguts mittels Amplifikationsverfahren ist es erforderlich, die DNA aus den kernhaltigen Zellen des Bluts freizusetzen und in eine gereinigte Form zu überführen.

Das betrifft vor allem die Entfernung beziehungsweise Inaktivierung von:

- Ionen und Proteinen, die zu falscher oder verminderter Anlagerung der Primer-Oligonukleotide und Polymerasen der PCR-Reaktion führen
- DNAsen, also den Basenstrang enzymatisch teilenden Enzymen, die zu unverwertbaren Bruchstücken und abnehmenden Konzentrationen intakten Erbguts führen.

Diese Faktoren beeinflussen zum einen die Auswertbarkeit der Restriktionsendprodukte (Signalstärke und Störhintergrund), zum anderen ist so auch die Haltbarkeit des Extraktes deutlich gesteigert.

Die DNA wurde aus 200 µl peripherer Blutleukozyten mit Hilfe des QIAmp Blood Kit (Quiagen, Hilden, Deutschland) oder des High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) extrahiert.

Dieses Kits vereinigen folgende Prinzipien:

- Lyse der Zellen und Zellorganellen durch mechanische Beeinflussung (mehrfaches Vortexen bei hoher Stufe), durch enzymatischen Verdau (25 µl Protease C, mitgeliefert) und Veränderung des Milieus (210 µl Puffer AL) sowie thermische Lyse (Inkubation bei 70 °C für 10 Minuten)
- Elution störender Stoffe durch Lösung in Ethanol (200 µl) und mehrfaches Waschen mit Puffer AW (3*500 µl, mitgeliefert)
- Vollständiges Entfernen der gelösten Stoffe durch Zentrifugation bei 8000 und 14000 /min, während die DNA durch Adsorption an eine spezielle Filtermatrix (spin column, mitgeliefert) zurückgehalten wird.

Resultat aus 200 µl eingesetztem Vollblut sind 200 µl gereinigten DNA-Extraktes, das wegen seiner hohen Konzentration für eine Vielzahl an Bestimmungen suffizientes Ausgangsmaterial bietet. Um in diesem Sinne eine gute Haltbarkeit zu gewährleisten, wurde zur finalen Elution aus der Matrix auf 70°C temperierter Puffer AE (200µl, mitgeliefert) eingesetzt und die Proben dann bei –20°C in Eppendorfcups gelagert.

3.3.3. PCR-Reaktion

Die jetzt vorliegende DNA-Lösung ist noch nicht ausreichend konzentriert, um direkt dem Enzymverdau und der Gelelektrophorese zugeführt zu werden. An dieser Stelle wurde daher das Amplifikationsverfahren der Polymerase Ketten Reaktion (PCR) eingesetzt, das heute zentrales Element für die meisten Methoden der Gentechnik ist.

Dieses Verfahren sei hier in Kürze dargestellt:

Grundsätzlich macht man sich ein biologisches Prinzip zunutze, das in allen Eukaryontenzellen zur Replikation gebraucht wird. Das Enzym DNA-Polymerase läuft unter geeigneten Bedingungen einen vorgegebenen DNA-Einzelstrang (DNA-Extrakt) entlang. Sind hierbei die Bausteine der DNA, also die Nukleoside Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin in energetisch aktivierter Form vorhanden, so baut die Polymerase den jeweiligen Gegenstrang auf. Trennt man nachfolgend den synthetisierten Doppelstrang thermisch in Einzelstränge auf, so stehen zwei neue Ausgangsstränge zur Verfügung.

Lässt man diese Reaktion mehrfach ablaufen, so entsteht durch den Effekt der Zweier-Potenzierung ein pyramidenförmiger Zuwachs an DNA.

Für eine Laboranalyse anwendbar wird dieses Prinzip durch folgende Modifikationen:

- Einsatz einer besonderen „Taq-Polymerase“ aus dem Bakterium *thermus aquaticus*, die aufgrund ihres natürlichen Umfeldes in heißen Quellen sehr temperaturresistent ist. Das eröffnet zwei Möglichkeiten: zum einen die Beschleunigung der Synthesereaktion des Enzyms bei erhöhter Temperatur, zum anderen das häufige Durchführen des Elongations-Strangtrennungs-Zyklus, da das Enzym der thermischen Strangtrennung bei 95°C standhält.
- Verwendung von speziellen Primern: Da für meine Fragestellung nur eine Sequenz von einigen hundert Basenpaaren rund um den polymorphen Locus von Interesse ist, liegt das Konzept nahe, auch nur diesen kleinen Bereich des Millionen von Basenpaaren umfassenden Genoms zu amplifizieren. Diese Markierung geschieht durch synthetische Oligonukleotide, sogenannte Primer. Ein Primer ist eine kleine Basenpaarsequenz, die sich aufgrund der komplementären Basenabfolge an einer Stelle des Mutterstrangs bindet und zusammen mit einem zweiten Oligonukleotid Start- und Endpunkt der Polymerase-Reaktion auf dem Strang markiert.

Wir verwendeten das ABI Prism Sequence Detection System (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland), welches die Kombination von DNA-Amplifizierung und Genotypisierung in einem einzelnen (TaqMan) Versuch erlaubt. Die Primer bzw. Sonden hatten folgende Nukleotidsequenzen: forward primer 5' TTC TCC CAC GAC AGC ATC ATC T 3', reverse primer 5' GTC GTC GTA GCC AGC GAA TAG TA 3', allele 825C probe 5' CAT CAC GTC CGT GGC CTT CTC C 3' und allele 825T probe 5' CAT CAC GTC TGT GGC CTT CTC CCT 3'.

Die 825C Sonde war mit 6-Carboxy-Fluorescein (FAM) an ihrem 5' Ende markiert, die 825T Sonde mit VIC (Applied Biosystems, patent pending). An ihren 3' Enden erfolgte die Markierung mit 6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodanin (TAMRA).

- Schaffung optimaler Temperaturbedingungen durch einen Thermocycler. Wie schon beschrieben, muss für das Verlängern („Elongation“) der neuen Kette durch die Polymerase, für das Trennen („Denaturation“) des entstandenen Doppelstrangs und vor diesen beiden Phasen für das Koppeln („Annealing“) der Primer ein jeweiliges Temperaturoptimum vorliegen.

Während der konkreten, idealen Zeiten (Tabelle 1) für diese Vorgänge sollte die Temperatur möglichst konstant gehalten werden, im Wechsel dazwischen sehr schnell den neuen Wert erreichen. Diese Bedingungen wurden mit einem Thermocycler-Gerät geschaffen. Dieses ermöglicht, ca. 50 Proben gleichzeitig nach

Tabelle 1: PCR-Bedingungen

Vorlaufphase	2 min 95°C
Denaturierung	15 s 95°C (x40)
Annealing und Kettenverlängerung	1 min 60°C (x40)
Nachlaufphase	7 min 72°C
Abkühlen	2 min 25°C

einem programmierten Zyklus mit variabler Wiederholung, hier 40mal, zu prozessieren. Das resultierende Programm bestand aus 40 Denaturierungszyklen bei 95°C zu je 15 Sekunden, sowie einer finalen Elongation bei 62°C für 1 Minute .

3.3.4. Restriktionsverdau

Die PCR-Produkte erlauben nach dem Prinzip der einfachen Gelelektrophorese noch keine Aussage, welches Allel vorliegt. Hier wird lediglich nach Größe und Laufeigenschaft getrennt, der Austausch einer Base stellt keinen zur Darstellung ausreichenden physikalischen Unterschied dar. Daher wurde ein Zwischenschritt erforderlich. Hier kommen Restriktionsenzyme zur Anwendung. Solche sind DNAsen, die den DNA-Strang nur dann zerteilen, wenn das Enzym eine besondere Basensequenz „erkennt“, d.h. aufgrund sterischer Verhältnisse eine hohe Affinität zu dieser Stelle aufweist.

Wählt man aus einer enormen Zahl verschiedener erhältlicher Enzyme ein geeignetes aus, das nur im Falle einer genetischen Variante an dem polymorphen Locus bindet und schneidet, so kann man das Vorliegen eines geschnittenen oder unversehrten PCR-Produktes als Merkmal für das vorliegende Allel nützen.

Zusätzlich waren folgende Bedingungen für die Wahl des Enzyms entscheidend:

- Es soll an mindestens einer weiteren, nicht allel-abhängigen Stelle schneiden. Diese Veränderung der bp-Länge, bzw. das Vorliegen des Schnittfragments fungiert als Erfolgskontrolle der Verdaureaktion („internal control“).
- Dennoch sollte die Zahl der Schnittstellen nicht zu groß sein, um eine Zerstückelung in viele kleine, evtl. nicht optisch trennbare Fragmente zu verhindern.
- Die Fragmente sollten einen bp-Unterschied von mindestens 20 bp haben. Nur so ist eine deutliche Darstellung der Einzelfragmente bei einem Routine-Gellauf sinnvoll möglich. Natürlich muss für einen sicheren und effizienten Verdau ein dem Enzym angepasstes Milieu vorliegen. Alle Reaktionen wurden daher bei einer Temperatur von 37°C (Inkubation im

Thermoblock) durchgeführt. Ideale Ionenkonzentrationen und pH-Werte ließen sich durch Zugabe von Puffern einstellen, welche vom Hersteller mitgeliefert wurden. Bis zum vollständigen Schnitt des Ausgangsprodukts war ca. 1h ausreichend. Laut Auskunft des Herstellers ist aber sogar ein Verdau bis zu 16h ohne falsche Schnittstellen garantiert.

3.3.5 Gelelektrophorese

Dieser finale Schritt dient der Darstellung der nun ausreichenden Menge (PCR) an DNA-Fragmenten aussagekräftiger Länge (Restriktion). Das Prinzip ist einfach: DNA-Moleküle werden in einem elektrischen Feld auf einem Medium bewegt. Wie weit unterschiedliche Moleküle wandern, hängt ab von konstantgehaltenen Parametern:

- der Dauer des angelegten Feldes (ca. 90 min.)
- der Spannung und resultierenden Feldstärke (150V)
- der Ladung des Moleküls, die vom Ionisationsgrad abhängt (pH-Milieu des Loading Buffers)
- der Porosität der Matrix (Agarosegel konstanter Zusammensetzung) und den physikalischen Determinanten des DNA-Moleküls (Größe), deren Effekt zur Analyse genutzt wird.

Vereinfacht gesagt wandern unter konstanten Bedingungen gleiche Fragmente immer gleich weit, wobei kleinere DNA-Moleküle auf dem Gel weiter bewegt werden. Die Zuverlässigkeit des Versuchs wurde zusätzlich durch ein mitlaufendes Standard-DNA-Gemisch (Marker VIII, Boehringer, Mannheim, BRD) erhöht, welches eine Skala bekannter Fragmentgrößen markierte.

Da die Banden auf dem Gel dem Auge nicht unmittelbar sichtbar sind, wurde dem Medium eine stark DNA-affine Substanz (Ethidiumbromid) zugesetzt. Regt man die so markierte DNA auf einem Speziialschirm mit UV-Strahlung an, so kann man die Banden durch Lichtemission im sichtbaren Bereich deutlich ausmachen. Für die Agarosegele wurde eine erhitzte Mischung aus 10% Tris-Borat-EDTAPuffer (TBE, Fa. Gibco) in destilliertem Wasser, zwei Prozent Agarose (Seakem GTG Agarose, Biozym, Oldenburg, BRD) und zwei Promille Ethidiumbromid verwendet. Nach dem Festwerden wurden die Gele mit selbiger TBE-Pufferlösung in die Gelkästen eingebracht und die Taschen mit den Laufansätzen beschickt. Für diese Ansätze wurden 15 µl des Verdaus mit 5 µl Ficoll-Puffer versetzt (1,5% in TBE-Puffer).

3.3.6 Auswertung

Wie schon beschrieben, geht aus der Konzeptionierung des Verdaus bereits hervor, welche Basenpaar-Längen potentiell entstehen sollen. Die Banden auf dem Gel diesen erwarteten Banden zuzuordnen wird dadurch einfach, dass als Skala gedachte Banden mitlaufender, vielbandiger Normmarker verwendet werden. Als weitere Orientierung lief grundsätzlich ein ungeschnittenes PCR Produkt mit.

Bei heterozygoten Individuen bezüglich des polymorphen Gens sind sowohl die Banden des ungeschnittenen als auch der geschnittenen Fragmente gleichzeitig sichtbar.

3.4. Statistik und Datenverarbeitung

Alle Patientendaten und Genbestimmungen wurden in einer Datenbank verwaltet. Es handelt sich hierbei um eine Microsoft Excel Datei. Von hier aus erfolgte der Transfer in die Statistiksoftware SPSS 11.0 beziehungsweise 12.0, mit deren Hilfe die statistischen Kalkulationen einfacher zu bewerkstelligen sind.

Zum Vergleich kategorischer Variablen (Patientencharakteristika, GNB3 Genotyp Verteilung, T und C Allel Verteilung) verwendete ich den Chi-Quadrat-Test, beziehungsweise den exakten Test nach Fischer. Den Mann-Whitney Test zog ich heran zum Vergleich des quantitativen Parameters Alter (nicht normalverteilte kontinuierliche Variable). Ein p-Wert $<0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

4.1. Patientencharakteristika

Wie schon mehrfach erwähnt besteht die AVNRT-Gruppe aus einem recht großen Kollektiv von 408 Patienten. Die Kontroll-Gruppe ist nach Selektion durch die Ein- und Ausschlusskriterien mit 213 Patienten kleiner ausgefallen. Das Durchschnittsalter in der AVNRT-Gruppe beträgt 53,2 Jahre, die Standardabweichung 16,1 Jahre. In der Kontrollgruppe war der Altersschnitt $53,1 \pm 17,0$ Jahre. Abb. 7 zeigt die Altersverteilung im einzelnen.

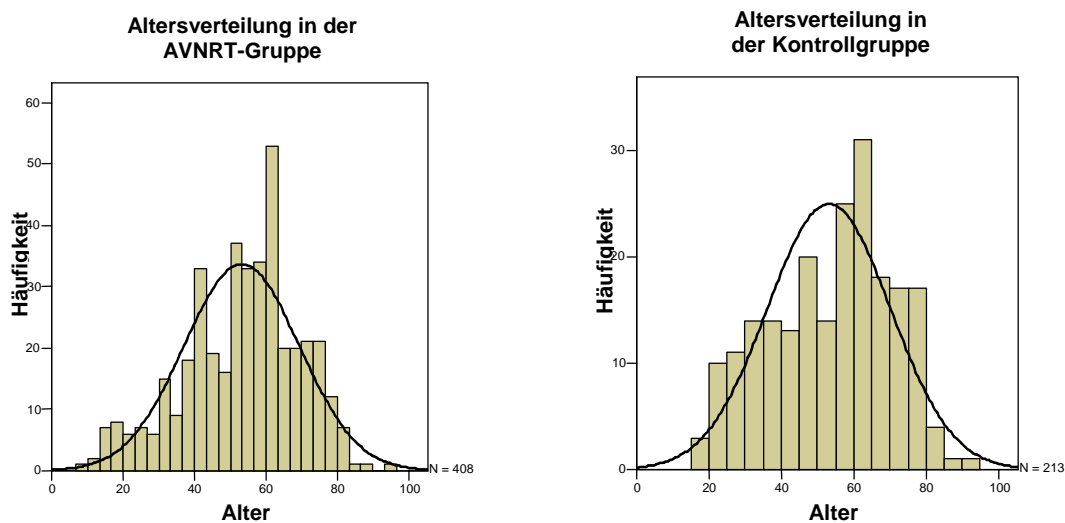


Abb. 7: Altersverteilung in der AVNRT- und Kontrollgruppe

Die beiden Gruppen wurden hinsichtlich Alter, Geschlecht und kardiovaskulärer Risikofaktoren auf signifikante Unterschiede verglichen. Eine Übersicht der Patientencharakteristika gibt Tabelle 2.

	AVNRT-Gruppe	Kontroll-Gruppe	P Wert
Anzahl	n=408	n=213	
Alter	$53,2 \pm 16,1$	$53,1 \pm 17,0$	0,953
Männl. Geschlecht	39,2%	62,9%	< 0,001
Art. Hypertonie	39,3%	41,3%	0,666
Adipositas (BMI>26)	50%	45,5%	0,311
Diabetes mellitus	5,9%	6,6%	0,745
KHK	11,8%	16%	0,169

Tabelle 2 : Patientencharakteristika

In der Kontrollgruppe finden sich mit 62,9% signifikant mehr männliche Patienten als in der AVNRT-Gruppe (39,2%). Der hohe Frauenanteil in der AVNRT-Gruppe spiegelt die Tatsache wieder, dass beim weiblichen Geschlecht das Risiko für AVNRT erhöht ist.

Bei den Parametern Alter und kardiovaskuläre Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie, Adipositas, Diabetes mellitus und koronare Herzkrankheit, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Nach dieser Analyse der klinischen Charakteristika scheinen beide Gruppen bis auf das Geschlecht ausreichend vergleichbar zu sein.

Abbildung 8 stellt die Patientencharakteristika graphisch dar.

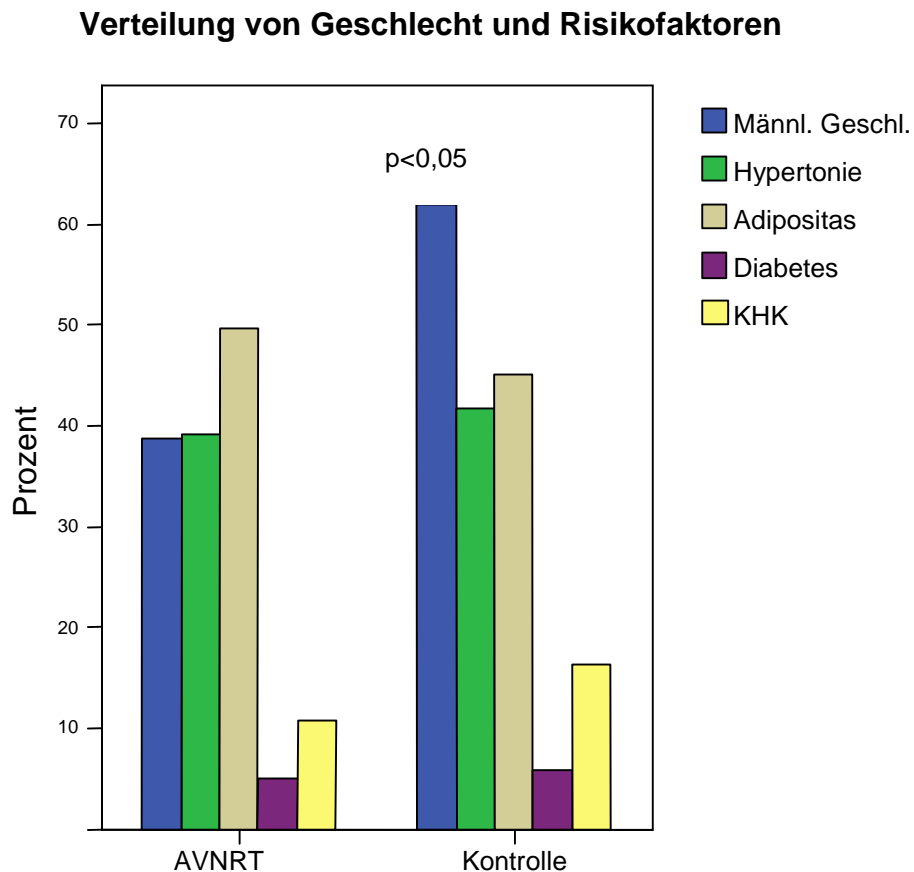


Abb. 8: Verteilung von Geschlecht und Risikofaktoren in der AVNRT- und Kontrollgruppe

4.2. GNB3 Genotyp Verteilung und AVNRT

Die Analyse der Genotypen war in allen Fällen erfolgreich und eindeutig. Es wurden 5% Doppelauswertungen als Sicherheitskontrollen durchgeführt, die keine Abweichungen ergaben.

Die GNB3 Genotyp Verteilung unter den AVNRT- und Kontrollpatienten zeigen Tabelle 3 und Abbildung 9.

	CC	CT	TT
AVNRT-Gruppe	51,7%	41,4%	6,9%
Kontrollgruppe	46,5%	40,8%	12,7%

Tabelle 3: GNB3 Genotyp Verteilung, $p < 0,05$ im Chi-Quadrat 6-Feldertest

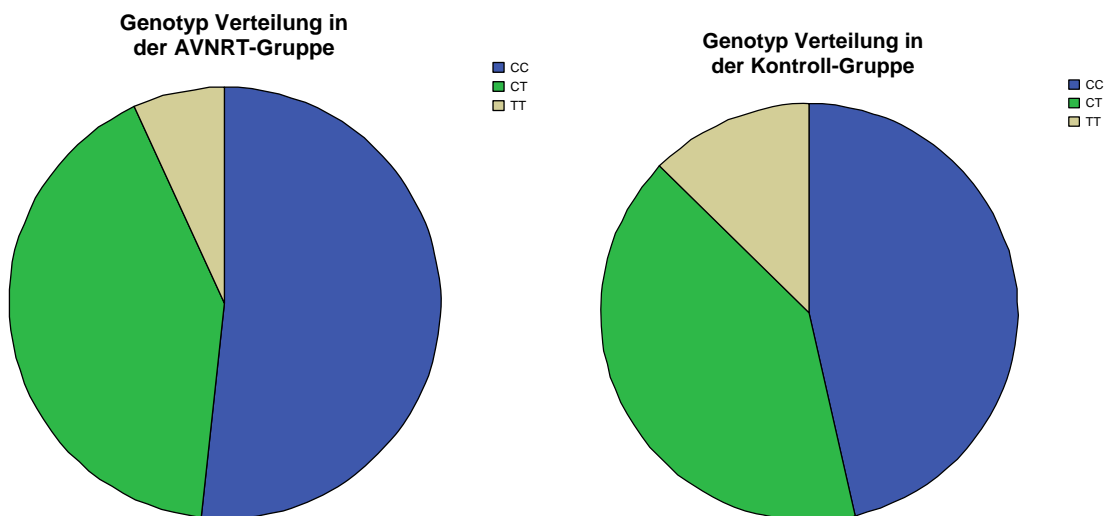


Abb. 9: GNB3 Genotyp Verteilung in der AVNRT- und Kontrollgruppe

Der TT-Genotyp ist in der AVNRT-Gruppe mit 6,9% signifikant seltener anzutreffen als in der Kontrollgruppe mit 12,7% ($p=0,016$).

Im Test CC versus CT/TT belief sich p auf 0,237 und war also nicht signifikant unterschiedlich zwischen beiden Gruppen.

Im Gegensatz hierzu ergab sich im Test TT versus CC/CT ein p -Wert von 0,016.

Also kommt die homozygote Trägerschaft des T-Allels in der AVNRT-Gruppe signifikant seltener vor als im Kontroll-Kollektiv und man kann von einem protektiven Effekt des TT-Genotyps gegenüber AV-Knoten-Reentrytachykardie ausgehen.

Da es im Test CC versus CT/TT keinen signifikanten Unterschied gibt, scheint ein Exemplar des T-Allels nicht auszureichen, um den schützenden Effekt auszulösen.

Die Odds Ratio des Genotyps TT für die AV-Knoten-Reentrytachykardie beträgt: OR =0,51.

Das bedeutet, dass die "Chance", in der AVNRT-Gruppe auf einen homozygoten T Allel Träger zu stoßen, nur halb so groß ist wie in der Kontrollgruppe.

Das 95%-Konfidenzintervall (CI) liegt zwischen 0,291 und 0.886, also liegt der wahre Wert der Odds Ratio mit 95prozentiger Wahrscheinlichkeit innerhalb dieser beiden Werte.

Um die Frage zu klären, ob die unterschiedliche Genotyp Verteilung auch noch signifikant ist, wenn die kardiovaskulären Risikofaktoren und das Geschlecht in die Rechnung mit einbezogen werden, wurde eine logistische Regressionsanalyse durchgeführt (Abb. 10).

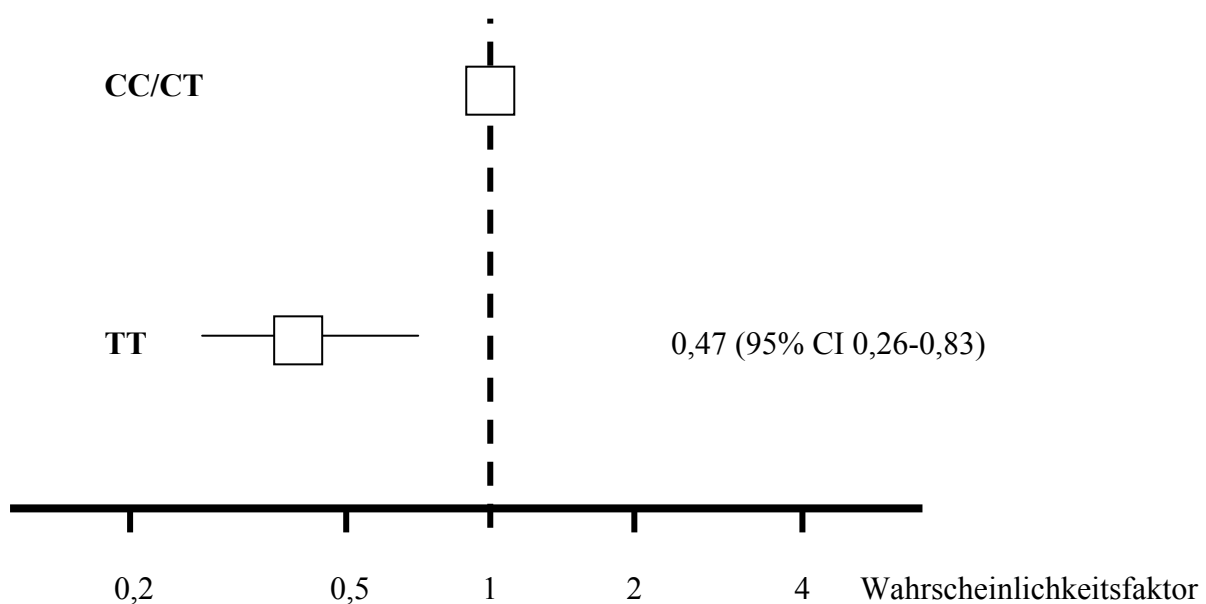


Abb. 10: Wahrscheinlichkeitsfaktoren mit Konfidenzintervall mittels logistischer Regressionsanalyse unter Einschluss der Kofaktoren Geschlecht, Art. Hypertonie, Adipositas, Diabetes mellitus und koronare Herzerkrankung

Diese zeigte, dass die signifikant niedrigere Häufigkeit des Genotyps TT versus CC/CT in der AVNRT-Gruppe unabhängig vom Geschlecht, Arteriellen Hypertonus, Diabetes mellitus, Body-Mass-Index und Koronarer Herzerkrankung war. Die Odds Ratio beträgt 0,47 bei einem

95prozentigen Konfidenzintervall zwischen 0,26 und 0,83. Die "Chance", einen TT Genotyp in der Kontrollgruppe vorzufinden ist also auch unter Einschluss von Geschlecht und kardiovaskulären Risikofaktoren noch etwa doppelt so hoch wie in der AVNRT-Gruppe.

4.3. T- und C-Allel Verteilung und kardiovaskuläre Risikofaktoren

Da aus anderen Studien bekannt ist, dass das 825T-Allel ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko mit sich bringt, wurden in der Folge jeweils zwei Patientengruppen mit und ohne dem jeweiligen kardiovaskulären Risikofaktor gebildet und innerhalb dieser Gruppen das T- und das C-Allel quantifiziert und die Häufigkeiten miteinander verglichen.

4.3.1 T- und C-Allel Verteilung und Arterielle Hypertonie

Das T-Allel ist aus früheren Studien als Risikofaktor für Arterielle Hypertonie bekannt. Das Patientengut dieser Studie wurde in zwei Gruppen (mit und ohne Hypertonie) eingeteilt. Bei den Hypertonikern (n= 248) fanden sich 145 T-Allele und 351 C-Allele, das entspricht 29,2% T-Allelen. Bei den Normotonikern waren es 29,7%. Vergleicht man diese Ergebnisse, erweisen sie sich als nicht signifikant unterschiedlich. (p=0,859).

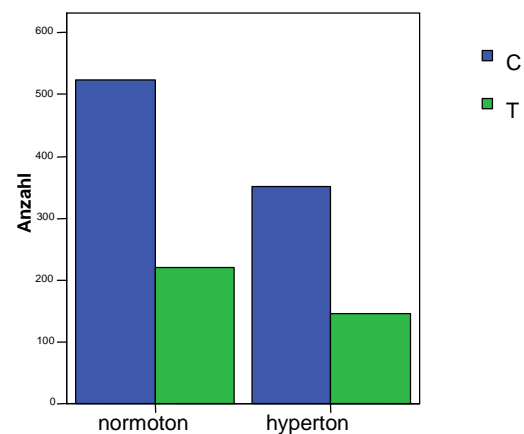


Abb. 11: T- und C-Allel Verteilung und Arterielle Hypertonie

4.3.2. T- und C-Allel Verteilung und Adipositas

Auch zwischen dem T-Allel und Adipositas wurde in früheren Studien eine signifikante Assoziation nachgewiesen. In dieser Studie waren in dem Genpool der Patienten mit einem BMI>26 (n=301) 30,1% T-Allele zu finden. Bei den normalgewichtigen Patienten waren es 28,9% T-Allele. Auch dieser Unterschied ist nicht signifikant unterschiedlich (p=0,654).

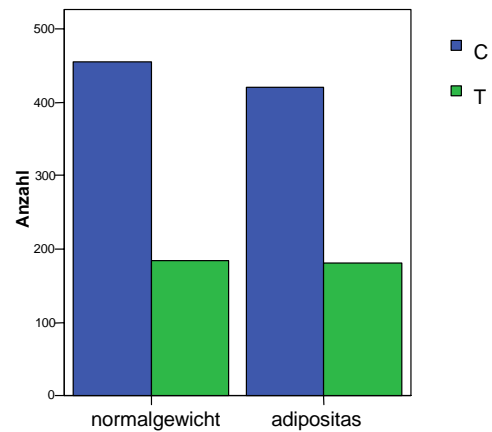


Abb. 12: T- und C-Allel Verteilung und Adipositas

4.3.3. T- und C-Allel Verteilung und Diabetes mellitus

Die Allel Verteilung bei den Diabetikern (n=38) war wie folgt: 30,3% waren T-Allele, 69,7% C-Allele. Bei den Nichtdiabetikern fanden sich 29,5% T-Allele. Es ergibt sich im χ^2 -Test ein p-Wert von p= 0,890. Somit ist auch dieser Vergleich nicht signifikant.

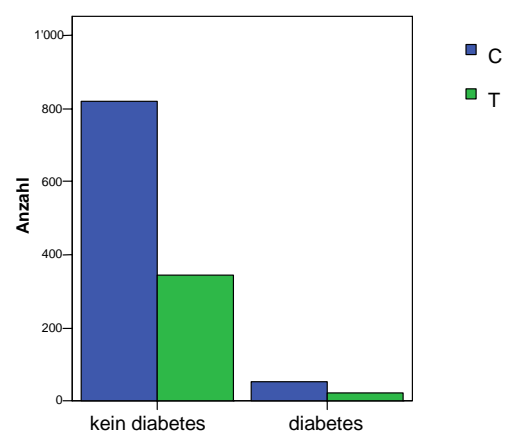


Abb. 13: T- und C-Allel Verteilung und Diabetes mellitus

5. Diskussion

Die hier vorliegende Untersuchung hat ergeben, dass der GNB3 TT-Genotyp in der AVNRT-Gruppe signifikant seltener vorkommt als in der Kontrollgruppe ($p=0,016$). Somit scheint der TT-Genotyp mit einem verminderten Risiko für AV-Knoten-Reentrytachykardie einher zu gehen. Die Assoziation des T-Allels mit Arterieller Hypertonie, Adipositas und Diabetes mellitus ließ sich jedoch in dieser Studie nicht bestätigen.

5.1. Assoziation zwischen dem GNB3 Genotyp und AVNRT

Dies ist die erste Studie, die sich mit der Assoziation zwischen dem GNB3 C825T Polymorphismus und AV-Knoten-Reentrytachykardie befasst. Somit gibt es bisher keine weiteren Ergebnisse, die den in dieser Studie aufgezeigten protektiven Effekt des TT-Genotyps gegenüber AVNRT bestätigen oder widerlegen.

Schreieck et al.³⁰ führten jedoch im Jahr 2003 eine ähnliche Studie durch. Es wurde untersucht, ob es eine Assoziation zwischen der GNB3 Genotyp Verteilung und Vorhofflimmern gibt. Auch das war die erste Studie, die sich mit jenem Thema befasste. Es stellte sich heraus, dass ebenso wie in der vorliegenden Untersuchung der TT-Genotyp in der Arrhythmie-Gruppe (Patienten mit meist intermittierendem Vorhofflimmern) signifikant seltener vorkam, als in der Kontrollgruppe. Auch gegenüber Vorhofflimmern scheint der TT Genotyp einen gewissen Schutz zu bieten.

Eine weitere Gemeinsamkeit zwischen dieser Studie und der von Schreieck et al. ist, dass jeweils nur der TT-Genotyp, nicht aber der CT-Genotyp diesen protektiven Effekt auszulösen vermag. Meine Untersuchungen ergeben im Test TT versus CC/CT das signifikante Ergebnis $p=0,016$, das Ergebnis des Tests CT/TT versus CC ($p=0,237$) war dagegen nicht signifikant.

Man spricht in diesem Zusammenhang von dem nicht vorhandenen Gen-Dosis-Effekt, wie er auch schon auf Ebene der atrialen Einwärtsgleichrichterströme beschrieben wurde (Dobrev et al.⁸). Dagegen zeigte sich in früheren Studien bezüglich der Assoziation des GNB3 C825T Polymorphismus mit kardiovaskulären Risikofaktoren, dass schon beim heterozygoten Merkmalsträger, der ja beide Varianten des Gens auf Ebene des Aminosäure-Austausches exprimiert, eine erhöhte Häufigkeit des jeweiligen klinischen Risikofaktors vorliegt. Des Weiteren hatte der homozygote T-Allel-Träger ein noch höheres Risiko als der heterozygote. Das heißt, hier lagen Gen-Dosis-Effekte vor. So hatten in einer Studie von Siffert et al. die homozygoten Individuen verglichen mit den heterozygoten ein erhöhtes Hypertonie-Risiko. Die Odds Ratios lagen im Test TT versus CC bei 1,79, im Test TT+CT versus CC bei 1,44, und im Test TT versus TC nur bei 1,38.⁴⁰ Hengstenberg et al. zeigte, dass bei Männern mit dem TT Genotyp die Prävalenz von ausgeprägter Hypertonie signifikant höher war als beim CT Genotyp.

Die Prävalenz beim CC Genotyp war noch um einiges niedriger als beim CT Genotyp.¹² Auch Benjafield et al. wiesen einen Einfluss der Anzahl der T-Allele auf die Höhe des Blutdrucks nach, bei den homozygoten T-Trägern waren die Werte höher als bei den Heterozygoten.¹ Ein ähnlicher Trend zeigte sich in einer Studie von Siffert et al. in Assoziation zu Adipositas, wengleich der Effekt nur in einer ethnischen Gruppe, die der Chinesen, statistisch signifikant war.³⁸ Weitere Gen Dosis Effekte ließen sich für Linksherzhypertrophie²⁷ und koronare Herzkrankheit⁴⁵ nachweisen.

Bei elektrophysiologischen Einflüssen scheint eine veränderte Funktionalität der T-Variante bei Heterozygoten nicht präsent zu sein. Es gibt also keinen Gen-Dosis-Effekt und nur der homozygote T-Allel-Träger hat ein vermindertes Risiko an AVNRT zu erkranken. Anders ausgedrückt folgt der elektrophysiologisch protektive Effekt einem rezessiven Vererbungsmodus. Eine schlüssige Erklärung, warum nur TT, nicht aber CT einen Schutz gegenüber AVNRT darstellt, kann bisher nicht gegeben werden. Zudem ist noch nicht völlig klar, wie bzw. ob das 825T-Allel das alternative Splicing der entsprechenden mRNA induziert. Hier besteht also noch Aufklärungsbedarf.

Auch eine elektrophysiologische Alteration der Vorhofzellen wurde nur für den TT- und nicht für den CT-Genotyp beschrieben. Dobrev et al.⁸ veröffentlichte im Jahr 2000 den bereits in der Einleitung erwähnten Artikel über eine Studie mit der Fragestellung, ob das T-Allel zu einer verstärkten Signaltransduktion durch das $\beta\gamma$ -Dimer auf den Acetylcholin-stimulierten Kaliumstrom ($I_{K, ACh}$) führt. Bei 70 für den C825T Polymorphismus typisierten Patienten untersuchten sie die Einwärtsgleichrichterströme I_{K1} und $I_{K, ACh}$. Es gelang, eine signifikante Assoziation zwischen dem 825T-Allel und der Aktivität von beiden Einwärtsgleichrichter-Kaliumströmen in menschlichen Vorhofmyozyten nachzuweisen. Die Amplitude von I_{K1} war beim TT- im Vergleich zum CC- bzw. CT- Genotyp gesteigert. Außerdem war die Steigerung von $I_{K, ACh}$ durch muskarinische Stimulation mit Carbachol bei homozygoten T-Allel-Trägern vermindert. Da I_{K1} das Ruhemembranpotential bestimmt, könnte die erhöhte Dichte von I_{K1} bei TT-Trägern zu einem negativeren Membranpotential und einer früheren Repolarisation führen.

$I_{K, ACh}$, welcher ebenfalls zum Ruhemembranpotential beiträgt, war bei Patienten mit TT-Genotyp vermindert. Es konnte insgesamt von Dobrev et al. kein verändertes Ruhemembranpotential bei den verschiedenen Genotypen gemessen werden. Die erhöhte Dichte von I_{K1} bei TT-Trägern könnte die Aktionspotentialdauer verkürzen. Obwohl Veränderungen der Protein Expression dieser Kanäle nicht ausgeschlossen werden konnten, spekulierten Dobrev et al., dass die erhöhte Dichte des Hintergrund-Stroms im Myozyten von TT-Trägern in Kombination mit einer

verminderten Stimulation durch Carbachol das Resultat einer grundlegenden Aktivität von $I_{K, ACh}$ bei diesem Genotyp sein könnte.

Im Jahr 2002 wurde erstmals von Karle et al.¹⁵ die G-Protein vermittelte Hemmung von Einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanälen (I_{K1}) durch Proteinkinase C nachgewiesen. Mehr als 10 Jahre früher wurde eine ebensolche Hemmung über α_1 -adrenerge Rezeptoren aufgezeigt⁵. Die Ergebnisse von Ruiz-Velasco et al.³² aus dem Jahr 2003, dass das mit dem 825T-Allel einhergehende G β 3-s keine biologische Aktivität aufweist, passen zu den eben genannten Ergebnissen, insofern eine G-Protein vermittelte α -adrenerge Hemmung auf den I_{K1} wegfallen könnte. Bei den homozygoten T-Allel Trägern könnte ein gesteigerter Einwärtsgleichrichter-Auswärts-Strom das atriale Ruhepotential hyperpolarisieren und die Aktionspotential-Dauer verkürzen. Es ist bekannt, dass dem T-Allel auch bezüglich der Entstehung von Vorhofflimmern ein protektiver Effekt zugewiesen wurde. Bei der Adaptierung an den schnellen Herzschlag bei Vorhofflimmern wurde außerdem eine gesteigerte Expression des Einwärtsgleichrichterstroms beschrieben. Diese elektrophysiologischen Einflüsse auf Ruhe- und Aktionspotential dürften die atrialen Myozyten vor einer Kalzium-Überladung und deren Konsequenzen schützen. Solche Folgen wären Zellschaden oder struktureller Umbau auf Vorhofebene, die letztlich die Persistenz oder das Wiederauftreten von Vorhofflimmern begünstigen.

Vieles spricht dafür, dass durch den TT Genotyp veränderte elektrophysiologische Vorgänge im Atrium direkt mit dem vor Vorhofflimmern schützenden Effekt zusammenhängen. Dass es sich um dieselben Mechanismen handelt, die auch vor AVNRT schützen, ist allerdings sehr spekulativ.

Die angeführten möglichen Erklärungen für die Assoziation zwischen dem TT-Genotyp und einem verminderten AVNRT-Risiko sind jedoch rein spekulativ. Diese Studie erbringt keinen Kausalitätsbeweis und die genauen Mechanismen, die zu dieser Protektion führen, könnten in der Zukunft interessante Forschungsschwerpunkte bilden.

5.2. Assoziation zwischen dem T-Allel und kardiovaskulären Risikofaktoren

In früheren Studien wurde eine signifikante Assoziation zwischen dem T-Allel und kardiovaskulären Risikofaktoren wie der arterielle Hypertonie, Adipositas, Diabetes mellitus und koronaren Herzerkrankung nachgewiesen. Bei meinen Patientenkollektiven fallen alle assoziativen Berechnungen zu Hypertonie, Adipositas und Diabetes nicht signifikant aus. Berechnungen zu GNB3 als Risikofaktor für koronare Herzerkrankung waren nicht sinnvoll, da bei dieser Studie Patienten mit signifikanter KHK ausgeschlossen wurden. Durch den Ausschluss von Patienten mit manifester KHK und schweren Herzerkrankungen aus den Gruppen kann der

Einfluss des T-Allels auf alle kardiovaskulären Risikofaktoren verwässert werden. Wie in der Einleitung kurz aufgeführt, gibt es viele Studien, die positive Assoziationen aufzeigen, zahlreiche andere konnten jedoch keinen Zusammenhang von kardiovaskulären Risikofaktoren mit dem T-Allel herstellen.

5.2.1. Assoziation zwischen dem T-Allel und Arterieller Hypertonie

Nachdem Siffert et al. eine Assoziation zwischen dem T-Allel und Hypertonie aufgezeigt hatten, haben mehrere Forschungsgruppen weltweit sich ebenfalls dieses Themas angenommen und sind auf zum Teil kontroverse Ergebnisse gestoßen. So ließ sich etwa bei Studien mit asiatischen Probanden^{13, 42, 36, 14} kein signifikanter Zusammenhang nachweisen und auch Brand et al.⁴ fanden bei einem kaukasischen Kollektiv keine signifikante Assoziation. Allerdings wird von Siffert kritisiert, dass es in der Studie von Brand et al. zu einer Missklassifikation der normotensiven Kontrollen gekommen ist, da entgegen der Richtlinien der WHO diastolische Werte von 90-95 mmHG noch als normotensiv angesehen wurden. In meiner Studie wurden Patienten als Hypertoniker klassifiziert ab Werten von >140 mmHg systolisch und >90 mmHG diastolisch. Dennoch gab es in meinem Patientenkollektiv keine Assoziation des T-Allels mit arterieller Hypertonie. Aufgrund der Komplexität der Mechanismen, die zur Blutdruckregulierung beitragen, wie hormoneller Status, Volumen-Regulations-Mechanismen und Reaktivität der Blutgefäße, ist es aber nicht überraschend, dass das Hypertonie-Risiko bei Trägern eines einzigen genetischen Markers nicht exzessiv hoch ist und dass einige Studien diese Ergebnisse nicht reproduzieren können. Außerdem kann durch den Ausschluss von Patienten mit manifester KHK und schweren Herzerkrankungen aus dieser Studie der Einfluss des T-Allels auf kardiovaskuläre Risikofaktoren verwässert worden sein. So können meine Ergebnisse nicht ausschließen, dass das T-Allel in signifikantem Zusammenhang mit arterieller Hypertonie steht.

5.2.2. Assoziation zwischen dem T-Allel und Adipositas

In dem vorliegenden Studienkollektiv fand sich keine signifikante Assoziation zwischen dem T-Allel und Adipositas. Auch zu diesem Thema gab es in der Vergangenheit gegensätzliche Untersuchungen. Siffert et al.³⁸ zeigten eine signifikante Erhöhung der T-Allel-Frequenz bei übergewichtigen (BMI>25) Männern aus Deutschland, China, Südafrika und Zimbabwe. Banjafield et al.² konnten keine Assoziation feststellen, nicht einmal bei sehr übergewichtigen Patienten mit einem BMI>43. Die Probandenzahl in dieser Studie war wesentlich höher als bei Siffert et al. In einer japanischen Studie von Ohshiro²⁶ war ebenfalls kein Zusammenhang

eruiert, jedoch wurde hier ein kleines Kollektiv untersucht. Außerdem ist die ethnische Variation von Faktoren zu berücksichtigen, die Adipositas begünstigen.

Siffert geht davon aus, dass das T-Allel primär für ein erhöhtes Körperfett prädisponiert, welches dann über Jahre zur Entwicklung von Bluthochdruck führt. Allerdings wirkt gerade ein hohes Level an körperlicher Aktivität dieser Veranlagung entgegen. Weder in der Studie von Ohshiro noch in meiner sind Angaben vorhanden über die Lebensgewohnheiten der Probanden, wie etwa physische Aktivität. Diese Tatsache sowie Selektionsbias oder inadäquates Matching der Fall- und Kontrollgruppen könnten für die Diskrepanz der Ergebnisse verantwortlich sein.

5.2.3. Assoziation zwischen dem T-Allel und Diabetes

Auch Diabetes entsteht durch ein Zusammenspiel von genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen. Da Insulin G-Protein-vermittelte Mechanismen benutzt, um die Glukoseaufnahme in Geweben zu steigern, könnte das GNB3 Gen eine Rolle bei der Genese von Diabetes Typ 2 spielen. Das GNB3 Gen ist nur eines von vielen, das bei der Genese dieser Erkrankung involviert sein könnte. In einigen Studien¹⁷ gelang es, eine solche Assoziation nachzuweisen, bei meinem Patientengut war dies nicht möglich, sicherlich auch weil der Anteil der Diabetiker gering war. Die kontroversen Ergebnisse könnten das Resultat von Selektionsbias oder inadäquatem Matching der Fall- und Kontrollgruppen sein. Möglicherweise waren andere nicht ermittelte Faktoren, die bei der Entstehung von Diabetes von Bedeutung sind, in meinen Patientengruppen über- oder unterdurchschnittlich vertreten. Daher lässt sich ein Mitwirken des T-Allels bei der Pathogenese der Zuckerkrankheit aufgrund meiner Ergebnisse nicht ausschließen.

5.3. Limitationen und Kritikpunkte der Arbeit

5.3.1. Studiendesign

Für Fragestellungen dieser Art eignet sich auch eine retrospektive Analyse. Das Studiendesign ist eine Assoziationsstudie mit Fall- und Kontrollgruppe. Anstatt der Matched-Pair-Analyse werden durch entsprechende Ein- und Ausschlusskriterien sehr ähnliche Patientenkollektive für Fall- und Kontrollgruppe geschaffen. Die den Berechnungen zugrundeliegenden Daten wurden Krankenakten des Deutschen Herzzentrums entnommen. Da die Dokumentation an diesem Haus nach einem standardisierten System durchgeführt wird, kann mit aussagekräftigen Ergebnissen gerechnet werden.

5.3.2. Patientenselektion

Bei der Auswahl unserer Fall- und Kontrollpatienten entschieden wir uns statt eines eins-zu-eins gematchten Fall-Kontroll-Studien-Designs für konsekutive AVNRT-Patienten des Deutschen Herzzentrums, sowie für eine Kontroll-Kohorte, die in ihrem kardiovaskulären Risikoprofil in etwa der AVNRT-Gruppe entsprach. Die Patienten dieser konsistenten Kontrollgruppe wurden im selben Zeitraum und im selben Krankenhaus rekrutiert wie die AVNRT-Patienten. In beide Gruppen wurden Patienten mit schwerer Herzerkrankung ausgeschlossen, allerdings Patienten mit myokardialer Schädigung aufgrund chronischer Hypertonie, also linksventrikulärer Hypertrophie und leichter linksventrikulärer Dysfunktion, eingeschlossen, sofern keine sonstigen Gründe für diese Veränderungen eruierbar waren.

Die Prävalenz des TT-Genotyps in unserer Kontrollgruppe beträgt 12,7%. Die populationsbasierte Prävalenz des TT-Genotyps in unseren geographischen Breiten wurde durch die MONICA-Studie-Augsburg¹² ermittelt. Wenngleich wir unsere Patientengruppen nicht klar ethnisch definiert haben und die Häufigkeit des T-Allels wie in der Einleitung dargestellt je nach Ethnie sehr stark variiert, können die Zahlen der MONICA-Studie-Augsburg dennoch mit unseren Ergebnissen in Beziehung gesetzt werden, da die überwiegende Mehrheit der untersuchten Patienten derselben Bevölkerungsgruppe angehört wie die MONICA-Patienten. Hengstenberg et al. untersuchten 2052 Patienten aus der Stadt Augsburg und deren Umland auf ihren GNB3 Genotyp. In diesem vergleichsweise sehr großen Kollektiv fanden sich folgende Werte: 46,2% CC, 43,5% CT und 10,3% TT. Unser Wert ist im Vergleich also recht hoch. Er ist jedoch erklärbar durch die Patientenselektion, da die Symptomatik (diverse Rhythmusstörungen) die zur Klinikeinweisung der Kontrollpatienten führte, in Zusammenhang mit Hypertonie und Übergewicht stehen könnte. Hypertonie und Übergewicht wiederum finden sich mit einer erhöhten Prävalenz beim TT-Genotyp.

Die Inzidenz des TT-Genotyps in der AVNRT-Gruppe wurde mit 6,9% ermittelt. Es ist wahrscheinlich, dass unsere Hypothese vom protektiven Effekt der homozygoten TT-Allel Trägerschaft gegenüber AVNRT auf die gesamte Bevölkerung zutreffen dürfte.

5.3.3. Kein Kausalitätsbeweis

In dieser Studie wurde lediglich eine signifikant verminderte Häufigkeit des TT-Genotyps in der AVNRT-Gruppe nachgewiesen. Wir schließen daraus, dass dieser Genotyp ein protektiver Faktor gegenüber AV-Knoten-Reentrytachykardie ist. Wie dieser Schutz zustande kommt, geht aus dieser Studie nicht hervor, und Erklärungsversuche sind rein spekulativ. Der Kausalitätsbeweis zu dem Ergebnis dieser Studie ist noch zu erbringen.

5.4. Ausblick

Unsere Ergebnisse suggerieren, dass die G-Protein vermittelte Signaltransduktion bei der Entstehung der AV-Knoten-Reentrytachyardie eine Rolle spielt. Auch wenn die Ergebnisse dieser Studie aktuell keine klare klinische Relevanz haben, so können sie doch zum besseren Verständnis der Genese von AV-Knoten-Reentrytachyardie beitragen.

Zudem ist dies die erste Studie, die einen konkreten genetischen Risikofaktor für diese Rhythmusstörung determiniert. Man spekulierte zwar schon seit langem, dass bei der Pathogenese der AV-Knoten-Reentrytachyardie eine genetische Komponente eine Rolle spielt, aber bisher wurde dies nie an einem bestimmten Genlocus beziehungsweise an einem bestimmten genetischen Polymorphismus festgemacht.

Interessant wäre in der Zukunft eventuelle weitere genetische Risikofaktoren oder Protektionsfaktoren für die AVNRT aufzuzeigen, da es sich mit größter Wahrscheinlichkeit nicht um ein monogenetisches Geschehen handelt.

Gegenstand weiterer Forschung könnten auch die genauen elektrophysiologischen G-Protein-vermittelten Vorgänge auf Vorhofebene werden, da wie gesagt die in der Diskussion aufgezeigten möglichen Erklärungen für den Schutzeffekt und den nicht vorhandenen Gen-Dosis-Effekt auf Spekulationen beruhen und der weiteren experimentellen Abklärung bedürfen.

6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Studie war es, eine mögliche Assoziation zwischen dem C825T-Polymorphismus der Beta (3)-Untereinheit von G-Proteinen und dem Auftreten von AV-Knoten-Reentrytachykardien aufzuzeigen. Das T-Allel dieses Polymorphismus ist assoziiert mit einer verstärkten Signaltransduktion über pertussistoxinsensitive G-Proteine. Diese G-Proteine vermitteln auch die cholinerge Erregung im Herz-Vorhof. Darüber hinaus ist eine Assoziation zwischen einem verstärkten Einwärtsgleichrichterstrom und homozygoten GNB3 825T-Allel Trägern, aber nicht heterozygoten T-Allel Trägern gezeigt worden.

Wir stellten zwei Patientengruppen zusammen, die AVNRT-Gruppe bestehend aus 408 konsekutiven Patienten mit induzierbarer AVNRT ($53,2 \pm 16,1$ Jahre) und die Kontrollgruppe bestehend aus 213 Patienten ($53,1 \pm 17,0$ Jahre) ohne induzierbare AV-nodale Echoschläge und ohne sonstige induzierbare oder dokumentierte anhaltende Tachykardien. Alle Patienten wurden elektrophysiologisch untersucht und in Bezug auf den C825T-Polymorphismus genotypisiert.

Die Häufigkeit des 825 TT Genotyps war bei den AVNRT-Patienten (6,9%), verglichen mit den Kontrollpatienten (12,7%), signifikant niedriger ($p < 0,05$). Keine signifikanten Unterschiede lagen hingegen in der Häufigkeitsverteilung der Genotypen CC und CT vor. Eine logistische Regressionsanalyse zeigte, dass die signifikant niedrigere Häufigkeit des Genotyps TT in der AVNRT-Gruppe unabhängig vom Geschlecht, arteriellen Hypertonus, Diabetes mellitus, Body-Mass-Index und koronarer Herzerkrankung war.

Eine Assoziation des T-Allels mit den kardiovaskulären Risikofaktoren arterielle Hypertonie, Adipositas und Diabetes mellitus ließ sich nicht nachweisen.

Die Assoziation zwischen dem Auftreten einer AVNRT mit einer verminderten Häufigkeit homozygoter 825T-Allel Träger des GNB3-Polymorphismus spricht für einen protektiven Effekt des TT-Genotyps gegenüber der AVNRT.

Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich bei

Augusto del Pozo Ben (MTA)

Dr. Stefan Dostal

Dr. Jürgen Schrieck für die Themenstellung und inhaltliche Betreuung

Dr. Koch / Prof. Schömig für die Blutdatenbank

Prof. Schmitt, Leiter der EPU und Elektrophysiologie

7. Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
art.	arteriell
ATP	Adenosintriphosphat
AV	Atrioventrikular
AVNRT	AV-Knoten-Reentrytachykardie
bp	Basenpaare
BMI	Body mass index
°C	Grad Celsius
CI	Konfidenzintervall
d.h.	das heißt
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
EPU	elektrophysiologische Untersuchung
et al.	et altera
evtl.	eventuell
g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
Geschl.	Geschlecht
GNB3	G-Protein β 3 Gen
G-Protein	Guaninnukleotik-bindende Proteine
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
Hg	Quecksilber
$I_{K, Ach}$	Acetylcholin-aktivierte Kaliumkanäle
kb	Kilobasen
kDa	Kilo Dalton
kg	Kilogramm
l	Liter
KHK	Koronare Herzkrankheit
LQTS-Syndrom	Long QT Syndrom

LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
m	Meter
männl.	männlich
mm	Millimeter
mg	Milligramm
min	Minute
μl	Microliter
mmol	Millimol
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
V	Volt
WHO	World Health Organisation
WPW-Syndrom	Wolff-Parkinson-White-Syndrom

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: G-Protein-Struktur, (modifiziert nach Farfel et al.⁹)

Abb. 2: GTP Bindungs- und Hydrolyse-Zyklus, (modifiziert nach Farfel et al.⁹)

Abb. 3: Genstruktur und alternativer Splicingmechanismus von GNB3, (modifiziert nach Rosskopf et al.⁶)

Abb. 4: Struktur von Gβ3 und Gβ3v, (modifiziert nach Rosskopf et al.³⁰)

Abb. 5: Weltweite prozentuale Verteilung des GNB3 825T, (modifiziert nach Siffert et al.³⁸)

Abb. 6: Schematische Darstellung des pathophysiologischen Konzepts der AV-Knoten-Reentrytachykardie

Abb. 7: Altersverteilung in der AVNRT- und Kontrollgruppe

Abb. 8: Verteilung von Geschlecht und Risikofaktoren in der AVNRT- und Kontrollgruppe

Abb. 9: GNB3 Genotyp Verteilung in der AVNRT- und Kontrollgruppe

Abb. 10: Logistische Regressionsanalyse mit Einschluss der Kofaktoren Geschlecht, art. Hypertonie, Adipositas, Diabetes mellitus und koronare Herzerkrankung

Abb. 11: GNB3 Genotyp Verteilung und Arterielle Hypertonie

Abb. 12: GNB3 Genotyp Verteilung und Diabetes mellitus

Abb. 13: GNB3 Genotyp Verteilung und Adipositas

Tabelle 1: PCR-Bedingungen

Tabelle 2: Patientencharakteristika

Tabelle 3: GNB3 Genotyp Verteilung

9. Literaturverzeichnis

- ¹ Benjafield AV, Jeyasingam CL, Nyholt DR, Griffiths LR, Morris BJ. G-protein beta3 subunit gene (GNB3) variant in causation of essential hypertension. *Hypertension*. 1998; 32:1094-7.
- ² Benjafield AV, Lin RC, Dalziel B, Gosby AK, Caterson ID, Morris BJ. G-protein beta3 subunit gene splice variant in obesity and overweight. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2001; 25:777-80.
- ³ Bondy B, Baghai TC, Zill P, Bottlender R, Jaeger M, Minov C, Schule C, Zwanzger P, Rupprecht R, Engel RR. Combined action of the ACE D- and the G-protein β 3 T-allele in major depression: a possible link to cardiovascular disease? *Mol Psychiatry* 2002; 7:1120–6.
- ⁴ Brand E, Wang JG, Herrmann SM, Staessen JA. An epidemiological study of blood pressure and metabolic phenotypes in relation to the Gbeta3 C825T polymorphism. *J Hypertens*. 2003; 21:729-37.
- ⁵ Braun AP, Fedida D, Giles WR. Activation of alpha 1-adrenoceptors modulates the inwardly rectifying potassium currents of mammalian atrial myocytes. *Pflugers Arch* 1992; 421:431-9.
- ⁶ Clapham DE, Neer EJ. G protein beta gamma subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1997; 37:167-203. Review.
- ⁷ Dhamoon AS, Jalife J. The inward rectifier current (IK1) controls cardiac excitability and is involved in arrhythmogenesis. *Heart Rhythm*. 2005; 2:316-24. Review.
- ⁸ Dobrev D, Wettwer E, Himmel HM, Kortner A, Kuhlisch E, Schuler S, Siffert W, Ravens U. G-Protein beta(3)-subunit 825T allele is associated with enhanced human atrial inward rectifier potassium currents. *Circulation*. 2000; 102:692-7.
- ⁹ Farfel Z, Bourne HR, Iiri T. The expanding spectrum of G protein diseases. *N Engl J Med*. 1999; 340:1012-20. Review.
- ¹⁰ Gudermann T, Nürnberg B, Schultz G. Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction, Part 1. G-protein-coupled receptors: structure and function. *J Mol. Med*. 1995; 73:51-63
- ¹¹ Gutersohn A, Naber C, Müller N, Erbel R, Siffert W. G protein β 3 subunit 825 TT genotype and post-pregnancy weight retention. *Lancet* 2000; 355:1240–1.
- ¹² Hengstenberg C, Schunkert H, Mayer B, Döring A, Löwel H, Hense H, Fischer M, Riegger GA, Holmer SR. Association between a polymorphism in the G protein β 3 subunit gene (GNB3) with arterial hypertension but not with myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2001; 49:820-7.
- ¹³ Huang X, Ju Z, Song Y, Zhang H, Sun K, Lu H, Yang Z, Jose PA, Zhou G, Wang M, Wang W, Feng S, Hui R. Lack of association between the G protein beta3 subunit gene and essential hypertension in Chinese: a case-control and a family-based study. *J Mol Med*. 2003; 81:729-35.

- ¹⁴ Ishikawa K, Imai Y, Katsuya T, Ohkubo T, Tsuji I, Nagai K, Takami S, Nakata Y, Satoh H, Hisamichi S, Higaki J, Ogihara T. Human G-protein beta3 subunit variant is associated with serum potassium and total cholesterol levels but not with blood pressure. *Am J Hypertens.* 2000; 13:140-5.
- ¹⁵ Karle CA, Zitron E, Zhang W, Wendt-Nordahl G, Kathofer S, Thomas D, Gut B, Scholz E, Vahl CF, Katus HA, Kiehn J. Human cardiac inwardly-rectifying K⁺ channel Kir(2.1b) is inhibited by direct protein kinase C-dependent regulation in human isolated cardiomyocytes and in an expression system. *Circulation* 2002; 106:1493-9.
- ¹⁶ Kato N, Sugiyama T, Morita H, Kurihara H, Yamori Y, Yazaki Y. G protein β3 subunit variant and essential hypertension in Japanese. *Hypertension* 1998; 32:935–8.
- ¹⁷ Kiani JG, Saeed M, Parvez SH, Frossard PM. Association of G-protein beta-3 subunit gene (GNB3) T825 allele with Type II diabetes. *Neuro Endocrinol Lett.* 2005; 26:87-8.
- ¹⁸ Larson N, Hutchinson R, Boerwinkle E. Lack of association of 3 functional gene variants with hypertension in African Americans. *Hypertension* 2000; 35:1297–1300.
- ¹⁹ Levine MA, Smallwood PM, Moen PT Jr, Helman LJ, Ahn TG. Molecular cloning of beta 3 subunit, a third form of the G protein beta-subunit polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87:2329-33.
- ²⁰ Lin CN, Tsai SJ, Hong CJ. Association analysis of a functional G protein β3 subunit gene polymorphism (C825T) in mood disorders. *Neuropsychobiology* 2001; 44:118–21.
- ²¹ Lindemann M, Barsegian V, Siffert W, Ferencik S, Roggendorf M, Grosse-Wilde H. Role of G protein β3 subunit C825T and HLA class II polymorphisms in the immune response after HBV vaccination. *Virology* 2002; 297:245–52.
- ²² Mitchell A, Dammer S, Nürnberger J, Wenzel RR, Siffert W, Philipp T, Schäfers RF. Increased haemodynamic response to clonidine in subjects carrying the 825T-allele of the G protein β3 subunit (Abstract). *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2002; 365 Suppl 1:R113.
- ²³ Morrison AC, Doris PA, Folsom AR, Nieto FJ, Boerwinkle E. G protein β3 subunit and α-adducin polymorphisms and risk of subclinical and clinical stroke. *Stroke* 2001; 32:822–9, 2001.
- ²⁴ Naber CK, Hüsing J, Wolfhard U, Erbel R, Siffert W. Interaction of the ACE D allele and the GNB3 825T allele in myocardial infarction. *Hypertension* 2000; 36:986–9.
- ²⁵ Nürnberg B, Gudermann T, Schultz G. Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction, Part 2. G-proteins: structure and function. *J Mol. Med.* 1995; 73:123-32.

- ²⁶ Ohshiro Y, Ueda K, Wakasaki H, Takasu N, Nanjo K. Analysis of 825C/T polymorphism of G protein beta3 subunit in obese/diabetic Japanese. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 286:678-80.
- ²⁷ Poch E, González D, Gómez-Angelats E, Enjuto M, Paré JC, Rivera F, de la Sierra A. G-Protein β_3 subunit gene variant and left ventricular hypertrophy in essential hypertension. *Hypertension.* 2000; 35(part 2):214-8.
- ²⁸ Ren JF, Marchlinski FE. Intracardiac ultrasound catheter imaging for electrophysiologic substrate of AV nodal reentrant tachycardia: anatomic versus electrophysiologic evidence. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2004; 15:274-5.
- ²⁹ Roskopf D, Busch S, Manthey I, Siffert W. G protein beta 3 gene: structure, promoter, and additional polymorphisms. *Hypertension.* 2000; 36:33-41.
- ³⁰ Roskopf D, Kielbik M, Manthey I, Bilmen G, Eisenhardt A, Siffert W. Characterization of the splice variant Gbeta3v of the human G-protein Gbeta3 subunit. *Biochim Biophys Acta.* 2003; 1626(1-3):33-42.
- ³¹ Roskopf D, Manthey I, Habich C, Kielbik M, Eisenhardt A, Nikula C, Urban M, Kohnen S, Graf E, Ravens U, Siffert W. Identification and characterization of G beta 3s2, a novel splice variant of the G-protein beta 3 subunit. *Biochem J.* 2003; 371:223-32.
- ³² Ruiz-Velasco V, Ikeda SR. A splice variant of the G protein β_3 -subunit implicated in disease states does not modulate ion channels. *Physiol Genomics* 2003; 13:85-95.
- ³³ Sahn DJ, De Maria A, Kisslo J, Weyman A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation* 1978; 58:1072-83
- ³⁴ Schreieck J, Dostal S, von Beckerath N, Wacker A, Flory M, Weyerbrock S, Koch W, Schomig A, Schmitt C. C825T polymorphism of the G-protein beta3 subunit gene and atrial fibrillation: association of the TT genotype with a reduced risk for atrial fibrillation. *Am Heart J.* 2004; 148:545-50.
- ³⁵ Schunkert H, Hense HW, Döring A, Riegger GAJ, Siffert W. Association between a polymorphism in the G protein β_3 subunit gene and lower renin and elevated diastolic blood pressure. *Hypertension* 1998; 32:510-3.
- ³⁶ Shioji K, Kokubo Y, Mannami T, Inamoto N, Morisaki H, Mino Y, Tagoi N, Yasui N, Iwaii N. Association between hypertension and the alpha-adducin, beta1-adrenoreceptor, and G-protein beta3 subunit genes in the Japanese population; the Suita study. *Hypertens Res.* 2004; 27:31-7.
- ³⁷ Siffert W. Molecular genetics of G proteins and atherosclerosis risk. *Basic Res Cardiol* 2001; 96:606-11.

- ³⁸ Siffert W, Forster P, Jöckel KH, Mvere DA, Brinkmann B, Naber C, Crookes R, Du PH, Eppelen JT, Fridey J, Freedman BI, Muller N, Stolke D, Sharma AM, al Moutaery K, Grosse-Wilde H, Buerbaum B, Ehrlich T, Ahmad HR, Horsthemke B, Du Toit ED, Tiilikainen A, Ge J, Wang Y, Roszkopf D. Worldwide ethnic distribution of the G protein $\beta 3$ subunit 825T allele and its association with obesity in Caucasian, Chinese, and Black African individuals. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10:1921–30.
- ³⁹ Siffert W, Naber C, Walla M, Ritz E. G protein $\beta 3$ subunit 825T allele and its potential association with obesity in hypertensive subjects. *J Hypertens* 1999; 17:1095–8.
- ⁴⁰ Siffert W, Roszkopf D, Siffert G, Busch S, Moritz A, Erbel R, Sharma AM, Ritz E, Wichmann HE, Jakobs KH, Horsthemke B. Association of a human G-protein beta3 subunit variant with hypertension. *Nat Genet* 1998; 18:45–8.
- ⁴¹ Sperling H, Eisenhardt A, Virchow S, Hauck E, Lenk S, Porst H, Stief C, Wetterauer U, Rübber H, Müller N, Siffert W. Sildenafil response is influenced by the G protein $\beta 3$ subunit GNB3 C825T polymorphism: a pilot study. *J Urol* 2003; 169:1048–51.
- ⁴² Suwazono Y, Okubo Y, Kobayashi E, Miura K, Morikawa Y, Ishizaki M, Kido T, Nakagawa H, Nogawa K. Lack of association of human G-protein beta 3 subunit variant with hypertension in Japanese workers. *J Hypertens*. 2004; 22:493-500.
- ⁴³ Tsai C, Yeh H, Chou Y, Liu H, Yang T, Wang J, Wang NM, Chang J. G protein $\beta 3$ subunit variant and essential hypertension in Taiwan: a case-control study. *Int J Cardiol* 2000; 73:191–5.
- ⁴⁴ Turner ST, Schwartz GL, Chapman AB, Boerwinkle E. C825T polymorphism of the G protein $\beta(3)$ -subunit and antihypertensive response to a thiazide diuretic. *Hypertension* 2001; 37:739–43.
- ⁴⁵ von Beckerath N, Schusterschitz Y, Koch W, Griesser K, Mehilli J, Gorchakova O, Schomig A, Kastrati A. G protein $\beta 3$ subunit 825T allele carriage and risk of coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2003; 167:135–9.
- ⁴⁶ Wascher TC, Paulweber B, Malaimare L, Stadlmayr A, Iglseder B, Schmoelzer I, Renner W. Associations of a human G protein $\beta 3$ subunit dimorphism with insulin resistance and carotid atherosclerosis. *Stroke* 2003; 34:605–9.
- ⁴⁷ Wenzel RR, Siffert W, Bruck H, Philipp T, Schafers RF. Enhanced vasoconstriction to endothelin-1, angiotensin II and noradrenaline in carriers of the GNB3 825T allele in the skin microcirculation. *Pharmacogenetics* 2002; 12:489–95.
- ⁴⁸ World Health Organisation Study Group. Diabetes mellitus. WHO Tech Rep Ser 1985; 727:101-4.

⁴⁹ Zill P, Baghai TC, Zwanzger P, Schule C, Minov C, Riedel M, Neumeier K, Rupprecht R, Bondy B. Evidence for an association between a G-protein $\beta 3$ -gene variant with depression and response to antidepressant treatment. *Neuroreport* 2000; 11:1893–7.