

Medizinische Fakultät der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem
Institut für Pharmakogenetik

***GNB3 C825T*-Polymorphismus
bei dilatativer Kardiomyopathie**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Alisan Kahraman
aus Erzincan/ Türkei

2006

Dekan: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. H.-K. Jöckel

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. W. Siffert

2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. B. Horsthemke

Tag der mündlichen Prüfung: 20. März 2006

Widmung

In dankbarer Erinnerung an meinen lieben Vater.

Inhaltsverzeichnis

Widmung	3
Inhaltsverzeichnis	4
1 Einleitung	8
1.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	8
1.2 Der Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher	9
1.3 Genetischer Polymorphismus in der G-Protein-β3-Untereinheit	12
1.4 Assoziation des Polymorphismus mit der sog. “low-renin hypertension”	15
1.5 Ethnische Verteilung des 825T-Allels	16
1.6 Gβ3-s und verstärkte Chemotaxis neutrophiler Granulozyten	17
1.7 <i>GNB3</i> C825T-Polymorphismus und Körpergewicht nach der Entbindung	18
1.8 C825T-Polymorphismus und Aktivität kardialer K ⁺ -Kanäle	19
1.9 Kardiomyopathie - historischer Hintergrund	20
1.10 Einteilung der Kardiomyopathien	21
1.11 Epidemiologie der Kardiomyopathie	22
1.12 Ätiologie der Kardiomyopathie	22
1.13 Klinik und Therapie der Kardiomyopathie	23
1.14 Definition und Diagnose der familiären DCM	24
1.15 Bedeutung von G-Proteinen für die Myokardhypertrophie	27
1.16 Zielsetzung der Arbeit	29

2 Material und Methoden	31
2.1 Untersuchungsmaterial	31
2.1.1 Patienten	31
2.1.2 Geräte	31
2.1.3 Chemikalien	32
2.1.4 Enzyme, Nukleotide und Reaktionspuffer	32
2.1.5 Zugehörige Reaktionspuffer	33
2.2 Methoden	35
2.2.1 DNA-Extraktion aus Gewebe	35
2.2.2 Polymerase Chain Reaction	37
2.2.3 Restriktionsanalyse	40
2.2.4 Gelelektrophorese	41
2.2.5 Computergestützte Datenverwertung	43
2.2.6 Statistik	43
3 Ergebnisse	44
3.1 Patientenkollektiv	44
3.2 Verteilung der Diagnosen	45
3.3 Geschlechtsabhängigkeit der Diagnosen	45
3.4 Genotyp-Verteilung für <i>GNB3</i>	46
3.5 Assoziation zwischen <i>GNB3</i> -Genotyp und Diagnosen	47
3.6 Verteilung der <i>GNB3</i> -Genotypen bei den Patienten mit DCM	49

3.7 DCM versus “nicht”-DCM	50
3.8 Normalkollektiv für <i>GNB3</i>	51
3.9 HTX-Proben für <i>GNB3</i>	52
3.10 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht des Normalkollektivs für <i>GNB3</i>	52
3.11 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht der HTX-Proben für <i>GNB3</i>	54
3.12 Korrelation zwischen BMI und <i>GNB3</i> -Genotyp	55
3.13 Abhängigkeit der Krankheitsdauer vom Genotyp	55
3.14 Abhängigkeit des Pulmonalarteriendrucks vom Genotyp	56
3.15 Therapie mit Glykosiden	57
3.16 Therapie mit Diuretika	57
3.17 Therapie mit Amiodaron	58
3.18 Therapie mit Ca ²⁺ -Antagonisten	59
4 Diskussion	60
4.1 Epidemiologie und Ätiologie der DCM	60
4.2 Genetik der dilatativen CM	61
4.3 Zusammenhang zwischen Genotyp und DCM	63
4.4 Korrelation BMI - Genotyp	63
4.5 Korrelation Krankheitsdauer - Genotyp	63
4.6 Korrelation PAP - Genotyp	64
4.7 Korrelation Glykoside - Genotyp	64
4.8 Korrelation Diuretika - Genotyp	65

4.9 Korrelation Antiarrhythmika - Genotyp	65
4.10 Korrelation Kalziumantagonisten - Genotyp	66
4.11 Studienlimitation	66
4.12 Ausblick	67
5 Zusammenfassung	69
6 Literaturverzeichnis	70
7 Abkürzungsverzeichnis	79
8 Danksagung	81
9 Lebenslauf	82

1 Einleitung

1.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Heterotrimeren, Guaninnukleotid-bindende Proteine (G-Proteine) sind eine Familie von rezeptorgekoppelten Proteinen, denen eine Schlüsselrolle bei der Transduktion von extrazellulären Signalen zu intrazellulären Effektoren zukommt. Als Vermittler zwischen aktivierten Membranrezeptoren und Zytoplasma regulieren sie eine Vielzahl von intrazellulären Effektorenzymen (z.B. Adenylcyclasen, Phospholipasen, c-GMP-spezifische Phosphodiesterasen) und Ionenkanäle. Durch Konzentrationsänderung von "second messengern" wie Calcium, Diacylglycerol, Inositol-(1,4,5)-trisphosphat oder cAMP wird die Umsetzung des extrazellulären Signals in Zellantworten bewirkt.

G-Proteine werden nach ihrer Funktion in 4 größere Gruppen (Gs, Gi, Gq und G₁₂) unterteilt. Sie bestehen aus 3 verschiedenen Untereinheiten, welche als α -, β - und γ -Untereinheiten bezeichnet werden.

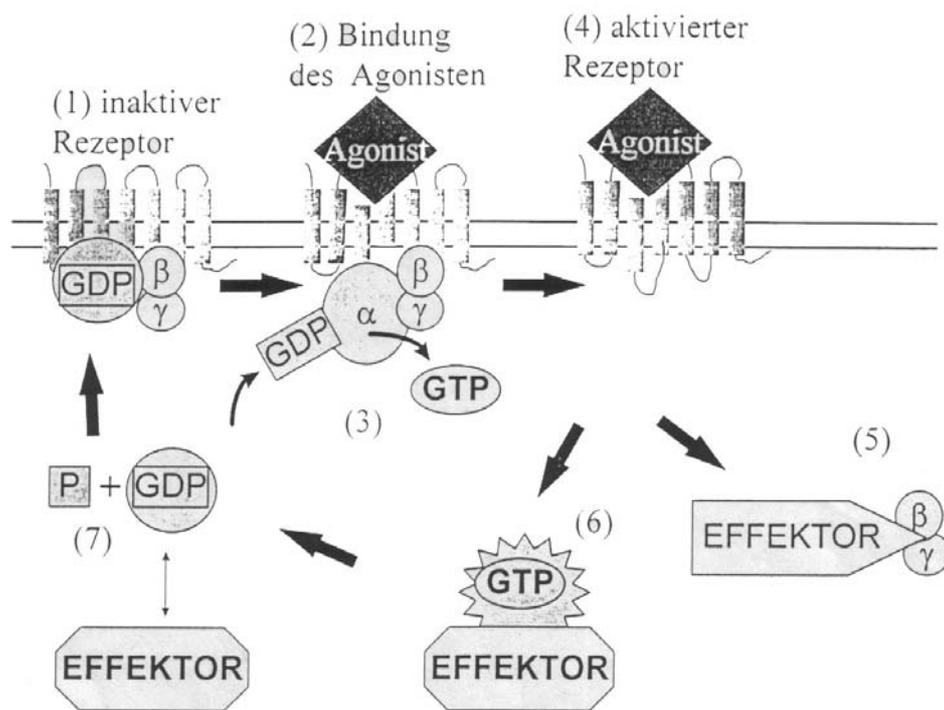
Bislang wurden 21 unterschiedliche α -, 5 unterschiedliche β - sowie 10 unterschiedliche γ -Untereinheiten kloniert. Sie unterscheiden sich in ihrem zellspezifischen Expressionsmuster und der unterschiedlichen Aktivierung durch verschiedene Rezeptoren. Die Hypertrophie von Kardiomyozyten wird durch unterschiedliche G-Proteine, nämlich Gq und G₁₁ (Yamazaki, T., Yazaki, Y., 2000, Adams, J.W., 1998 und Offermann, S., 2001) vermittelt. Untersuchungen an transgenen Tieren zeigten, dass die kardiale Überexpression von G α q zu einer kardialen Hypertrophie führt. Die Hypertrophie der Kardiomyozyten war dabei charakterisiert durch eine Zellvergrößerung, Neuorganisation von Myofilamenten und Ausschüttung von atrialem natriuretischem Faktor (ANF) und sie konnte zu einer beschleunigten Apoptose der Kardiomyozyten führen.

Der Ablauf des G-Protein-Zyklus vom aktivierten Membranrezeptor bis zum Anstieg der Konzentration intrazellulärer "second messenger" vollzieht sich im einzelnen wie folgt (s. Abb. 1): Nach Kopplung des Agonisten (2) erfährt der membrangebundene Rezeptor eine Konformationsänderung, was zur Aktivierung des heterotrimeren G-Proteins führt.

Die α -Untereinheit des G-Proteins setzt das im Ruhezustand gebundene GDP frei und bindet GTP (3). Das G-Protein befindet sich nun im aktiven Zustand (4). Es kommt zur Dissoziation der β/γ -Untereinheiten (5).

Sowohl α - als auch β/γ -Untereinheiten können nun mit unterschiedlichen Effektoren interagieren (6), d.h. diese wirken entweder stimulatorisch (G_s) oder inhibitorisch (G_i) auf die Adenylcyclase. Beendet wird die G-Protein-Aktivierung durch die intrinsische GTPase-Aktivität der α -Untereinheit, die das gebundene GTP zu GDP hydrolysiert (7). Anschließend reassoziieren α - und β/γ -Untereinheiten wieder zum Heterotrimer (1). Dieses kann nun erneut an einen aktivierten Membranrezeptor koppeln und den nächsten Reaktionszyklus durchlaufen.

Abb. 1: Schematische Darstellung des G-Protein-Zyklus



1.2 Der Na^+/H^+ -Austauscher

Zur Charakterisierung definierter Gruppen von Patienten mit essentieller Hypertonie wurden vielfach Abnormalitäten bei Membrantransportsystemen herangezogen (Roskopf et al., 1993a). Dabei stand in den letzten Jahren der Na^+/H^+ -Austauscher (NHE) im Mittelpunkt vieler Untersuchungen.

Dieses Ionentransportsystem vermittelt wichtige zelluläre Funktionen, z.B. die Kontrolle des intrazellulären pH-Wertes, die Regulation des Zellvolumens und den transepithelialen Na^+ -Transport.

Zahlreiche Studien konnten belegen, dass die Aktivität des NHE in Erythrozyten, Thrombozyten, Leukozyten und im Skelettmuskel bei Patienten mit essentieller Hypertonie gesteigert ist. Dieses Phänomen betrifft ca. 50 % aller Patienten mit essentieller Hypertonie.

Diese Befunde warfen die Frage auf, welcher Mechanismus der gesteigerten Aktivität des NHE ursächlich zugrunde lag. Hier kamen drei wesentliche Mechanismen in Frage: 1. Eine Aktivierung des NHE durch ein bei essentieller Hypertonie möglicherweise geändertes neurohumorales Milieu (systemische Faktoren). 2. Mutationen im NHE-Gen oder eine Überexpression des NHE und 3. eine geänderte intrazelluläre Regulation des NHE.

Wenn die erhöhte Aktivität des NHE in kultivierten Zellen von Hypertonikern normalisiert wird, so bedeutet dies, dass dieses Phänomen direkt durch das hypertensive in vivo-Milieu verursacht wird (z.B. durch zirkulierende Hormone), welches unter Zellkulturbedingungen keine Rolle mehr spielen kann. Bleibt die gesteigerte NHE-Aktivität in kultivierten Zellen jedoch fortbestehen, so ist von einer genetisch fixierten Abnormalität auszugehen. In der Tat konnten Siffert et al. 1993 zeigen, dass die Unterschiede der Aktivitäten des NHE in Zellen von Normotonikern und Hypertonikern auch nach längerer Zellkultur fortbestanden. Ferner unterschieden sich normotensive und hypertensive Zell-Linien durch eine weitere interessante Eigenschaft: Letztere wiesen eine verstärkte DNA-Synthese auf und vermehrten sich deutlich schneller.

Inwieweit das NHE-Transportprotein bei Hypertonikern molekular verändert war, zeigte sich nach der Sequenzierung des NHE-Gens. Siffert et al. konnten 1993 eine Mutation definitiv ausschließen und weitere Untersuchungen belegten, dass die gesteigerte Aktivität nicht durch eine vermehrte Expression dieses Proteins zu erklären war. Daher konzentrierten sich Siffert et al. nachfolgend darauf, die intrazelluläre Signaltransduktion normotensiver und hypertensiver Zell-Linien vergleichend zu analysieren.

Es konnte gezeigt werden, dass hypertensive Zell-Linien nach Stimulation mit bestimmten Agonisten deutlich verstärkte Anstiege der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration aufwiesen. Interessanterweise trat dieses Phänomen nur bei Verwendung solcher Agonisten auf, deren Signalübertragung über Rezeptoren vermittelt wurde, die an G-Proteine koppeln.

Bei Stimulation dieser Zellen mit z.B. Anti-IgM-Antikörpern, deren Rezeptoren intrazelluläre Tyrosinkinasen (ohne Beteiligung von G-Proteinen) aktivieren, waren die Ca^{2+} -Anstiege normotensiver und hypertensiver Zell-Linien gleich.

Um herauszufinden, welche G-Proteine für die unterschiedliche Signaltransduktion normotensiver und hypertensiver Zellen verantwortlich waren, wurden die Zellen mit Pertussis-Toxin behandelt. Dieses Toxin hemmt selektiv die Signaltransduktion über G-Proteine des Gi -Typs, daher auch als "PTX-sensitive G-Proteine" bezeichnet. Hierbei kommt es über die Inhibition der Adenylcyclase zu einer reduzierten Bildung von cAMP; die ADP-Ribosylierung verhindert den Austausch von GDP zu GTP (Siffert, W., 1998). Nach diesem Eingriff waren die Unterschiede der Signaltransduktion normotensiver und hypertensiver Zell-Linien vollständig aufgehoben. Somit konnten Siffert et al. in weiteren Experimenten direkt die Stimulierbarkeit PTX-sensitiver G-Proteine untersuchen und konnten tatsächlich nachweisen, dass diese G-Proteine bei allen Zellen von Hypertonikern verstärkt aktivierbar waren.

Die Daten zeigten, dass die gesteigerte Aktivität des NHE bei Patienten mit essentieller Hypertonie durch eine genetisch fixierte, gesteigerte Aktivierbarkeit PTX-sensitiver G-Proteine verursacht wurde. Die identifizierten G-Proteine werden in allen Körperzellen exprimiert, auch in Zellen und Geweben des kardiovaskulären Systems (glatte Gefäßmuskelzellen, Kardiomyozyten, Endothelzellen, Thrombozyten etc.).

Diese Befunde erschienen in zweierlei Hinsicht bedeutsam: Einerseits schien es möglich, mittels des von Siffert et al. entwickelten Zellkulturmodells einen Primärdefekt bei essentieller Hypertonie aufzuklären. Andererseits erlaubten die Befunde die Etablierung neuer Hypothesen zur Pathogenese der essentiellen Hypertonie. Es war lange Zeit umstritten, ob der Blutdruck der Ausdruck einer gesteigerten Vasokonstriktion ist, oder ob eine gesteigerte Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen im Bereich der Widerstandsgefäße eine bedeutsame Rolle spielt.

Das "G-Protein-Konzept der Hypertonie" (s. Abb. 4) war in idealer Weise geeignet, die beiden genannten Hypothesen zu vereinen, da PTX-sensitive G-Proteine nicht nur vasokonstriktorische Reize vermitteln, sondern auch direkt an der Zellproliferation beteiligt sind.

Daneben würde dieses Konzept es erlauben, die bei vielen Hypertonikern beobachtete Linksherzhypertrophie (Assoziation zwischen gesteigerter NHE-Aktivität und linksventrikulärer Hypertrophie) teilweise als Ausdruck einer genetisch fixierten Hypertrophiebereitschaft zu deuten.

Weiterhin könnten die Ergebnisse von Siffert et al. einen wichtigen Beitrag zur Diskussion leisten, welche Anteile genetische Faktoren bzw. Umweltfaktoren bei der Pathogenese der essentiellen Hypertonie einnehmen. Eine hereditär gesteigerte Aktivierbarkeit PTX-sensitiver G-Proteine könnte hier die primäre genetische Basis darstellen.

Es ist jedoch vorhersagbar, dass diese genetische Anlage besonders dann relevant wird, wenn solche G-Proteine bzw. die an sie koppelnden Rezeptoren besonders häufig benutzt werden. Umweltfaktoren (Stress) und Noxen (z.B. Nikotin) könnten die Benutzungshäufigkeit dieser G-Proteine drastisch steigern und damit den Zeitpunkt des Auftretens der essentiellen Hypertonie und/ oder ihren Schweregrad entscheidend beeinflussen.

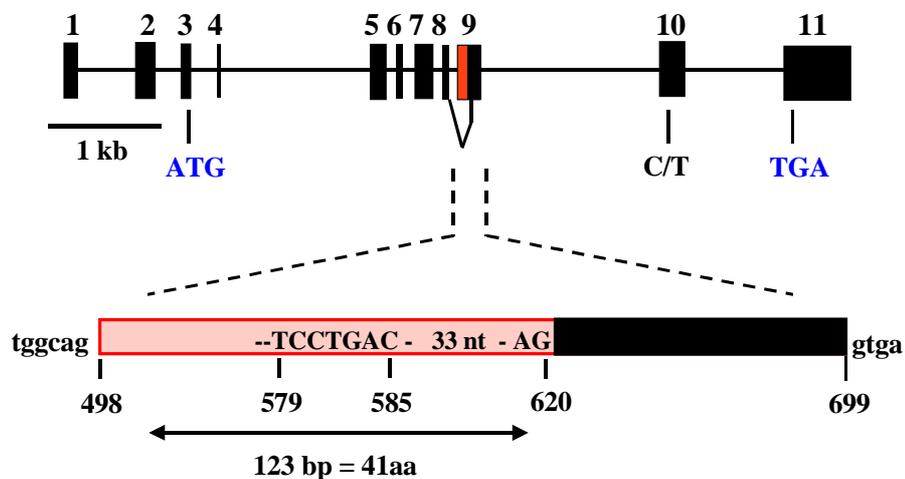
1.3 Genetischer Polymorphismus in der G-Protein-β3-Untereinheit

Siffert et al. konnten 1998 einen C825T-Polymorphismus im Exon 10 des Gens *GNB3* (Nukleotid-Position 825) nachweisen, das für die β3-Untereinheit heterotrimerer G-Proteine kodiert. Das kodierende Gen (*GNB3*) ist auf Chromosom 12p13 lokalisiert. Das Gen besteht aus 11 Exons mit dem Start-Codon ATG im Exon 3 und dem Stop-Codon TGA im Exon 11 (s. Abb. 2).

Siffert et al. fanden in ihren Zell-Linien mit gesteigerter G-Protein Aktivität das Nukleotid T an Position 825 der cDNA, obwohl in den veröffentlichten cDNA-Sequenzen das Nukleotid C sich an dieser Position befand. Alle Zell-Linien mit geringer G-Protein-Reaktivität stammten von homozygoten C825 Allel-Trägern ab.

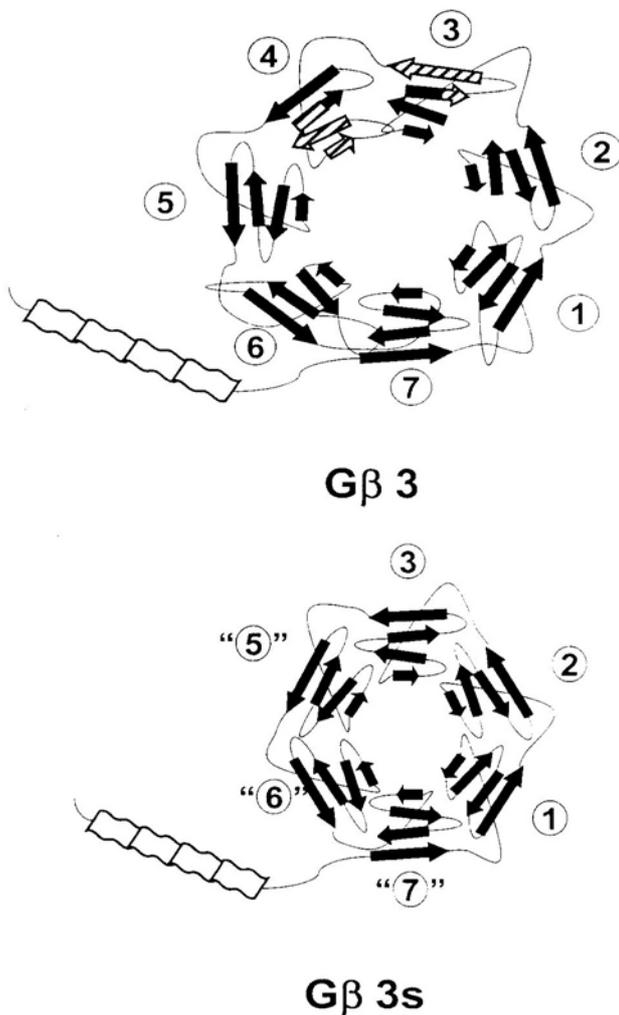
Der Austausch von C825T ändert die zu kodierende Aminosäure (Serin) nicht, allerdings verursacht das 825T-Allel ein alternatives Spleißen des Gens und die Expression einer funktionell aktiven Deletionsvariante (Deletion der Nucleotide 498-620 im Exon 9) von β_3 , welche als β_{3s} bezeichnet wird. Diese “in-frame-Deletion” führt zum Verlust von 41 Aminosäuren.

Abb. 2: Struktur von *GNB3*



In der Struktur von $G\beta_3$ und $G\beta_{3s}$ gibt es folgenden Unterschied: Die G-Protein β -Untereinheit gehört zur Familie der sogenannten WD-repeat Proteine, die eine propellerartige Struktur aufweisen. Das N-terminale Ende des Proteins interagiert mit der $G\gamma$ -Untereinheit. Die WD-repeats der $G\beta$ -Untereinheit tragen zur Formation eines β -Propellers mit 7 “Blättern” bei. Die oben erwähnte in-frame-Deletion in $G\beta_3$ führt zum Verlust eines Propeller-Blattes und zum Entstehen eines neuen Proteins ($G\beta_{3s}$) mit nur noch 6 Blättern (s. Abb. 3). Auch diese Deletionsvariante ist funktionstüchtig in G-Proteinen, wie Ko-Transfektionsversuche mit Gai_2 und Gy_5 zeigten (Siffert, W., 1998).

Abb. 3: Struktur von Gβ3 und Gβ3s



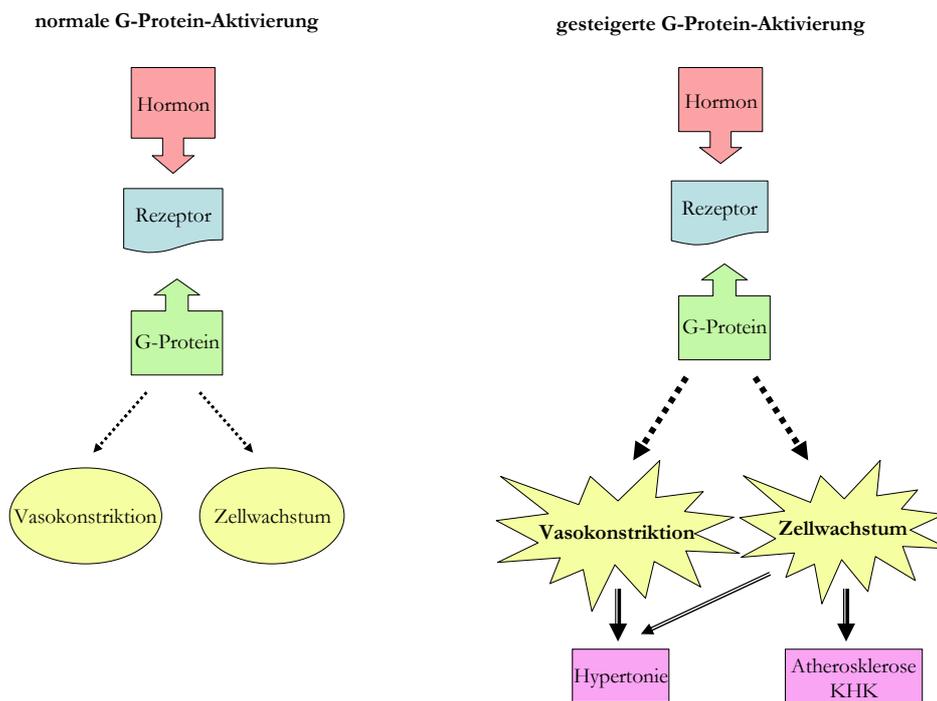
Eine Genotypisierung bezüglich des C825T-Polymorphismus ermöglicht nun eine Vorhersage über die Stärke der Aktivierbarkeit von G-Proteinen und nachgeschalteter Zellfunktionen (s. Abb. 4, Siffert, W., 2000).

Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie Bluthochdruck, koronare Herzkrankheit, Myokardinfarkt und Schlaganfall werden teilweise durch genetische Faktoren mitbestimmt. Der Nachweis solcher Risikomarker dient der Prophylaxe beim Gesunden, z.B. durch konsequente Behandlung nicht-genetischer Faktoren (Adipositas, metabolisches Syndrom, Fettstoffwechselstörung, Rauchen, Bewegungsmangel etc.). Bei Hypertonikern kann der Nachweis therapieentscheidend sein (Nachweis einer positiven Familienanamnese).

Das T-Allel korreliert mit erhöhter zellulärer Aktivierbarkeit und führt zu einem erhöhten Risiko für arterielle Hypertonie, Adipositas, metabolisches Syndrom (Siffert et al., 1999), Myokardinfarkt, Apoplex (Siffert, W., 2001) sowie periphere Insulinresistenz (Wascher et al., 2003).

Bei Vorliegen des TC- oder TT-Genotyps findet man ein gutes Ansprechen auf Thiazid-Diuretika, Clonidin und Moxonidin (Schäfers et al., 1998).

Abb. 4: G-Protein-Konzept der essentiellen Hypertonie



1.4 Assoziation des Polymorphismus mit der sog. “low-renin hypertension”

1998 konnten Schunkert et al. in einer Studie zeigen, dass Personen mit dem TT-Genotyp im Vergleich zu Personen mit dem CC-Genotyp ein etwa 1,8-fach erhöhtes Risiko für Bluthochdruck tragen. Interessanterweise fand man bei den Bluthochdruckpatienten mit dem TT-Genotyp auch ein dreifach erhöhtes Risiko, zwei oder mehr Medikamente für die Blutdrucknormalisierung zu benötigen.

Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass dieser Polymorphismus mit einer schwer einstellbaren Form des Bluthochdrucks assoziiert ist.

Schunkert et al. machten 1998 bei den Untersuchungen noch eine weitere wichtige Entdeckung: Die betroffenen 825T-Allelträger zeigten deutlich erniedrigte Konzentrationen des Hormons Renin. Diese Form der sogenannten "low-renin hypertension" könnte ein Hinweis darauf sein, dass betroffene Genträger vermehrt Kochsalz zurückhalten. Das T-Allel ging signifikant mit einem erhöhten diastolischen Blutdruck, einem erniedrigten Renin- sowie Prorenin-Spiegel und einer höheren Aldosteron-/ Renin-Ratio einher.

1.5 Ethnische Verteilung des 825T-Allels

Ein Normalkollektiv gesunder kaukasischer Blutspender zeigt folgende Verteilung der Genotypen des *GNB3*-Gens (s. Tabelle 3): den Genotypen CC, also ohne Mutation, zeigen 46,2 % der Bevölkerung. Bei Vorliegen des TC-Genotyps (43,7 % der Bevölkerung) besteht ein leicht erhöhtes und bei Vorliegen des TT-Genotyps (10,1 % der Bevölkerung) besteht ein deutlich erhöhtes Risiko für arterielle Hypertonie, Adipositas, Myokardinfarkt etc.

Unsere Vorfahren benötigten Erbanlagen, die das Überleben in schlechten Zeiten sicherten. Solche Gene verhinderten einen raschen Abbau von Körperfett bei Nahrungsmangel. In der heutigen Zeit, die durch einen Überfluss an Nahrung und durch Bewegungsmangel gekennzeichnet ist, führen solche Gene zu Übergewicht und Bluthochdruck. In einer weltweit angelegten Studie wurden unterschiedliche ethnische Gruppen auf diese Genveränderungen hin untersucht (Siffert et al., 1999).

Die höchste Frequenz des 825T-Allels (81,4-84,1 %) findet man bei Schwarzafrikanern, Afroamerikanern, Buschmännern und bei australischen Ureinwohnern. Somit könnte eine gesteigerte Aktivierbarkeit von G-Proteinen in Urzeiten ein Überlebensvorteil gewesen sein.

Die Frequenzen des 825T-Allels waren dagegen bei Asiaten (47,7 %) und bei Kaukasiern (31,9 %) deutlich niedriger. Gleichzeitig konnte bei gesunden, jungen Männern aus Deutschland, China, Südafrika und Zimbabwe gezeigt werden, dass Träger des Gens ein 2-3 fach gesteigertes Risiko für Übergewicht ($BMI > 25 \text{ kg/ m}^2$) haben. Die systolischen Blutdruckwerte waren nicht signifikant unterschiedlich, jedoch signifikant erhöht in der Gruppe der Übergewichtigen. Der diastolische Blutdruck war vom Genotyp unabhängig.

Damit könnte diese Genveränderung zunächst für Übergewicht prädisponieren, wodurch sich im Verlauf mehrerer Jahre das Risiko für Bluthochdruck erhöht (Siffert et al., 1999). Die intrazelluläre Signaltransduktion via PTX-sensitiver G-Proteine spielt somit eine wichtige Rolle bei der Genese der Adipositas (signifikante Korrelation des BMI mit dem Genotyp TT).

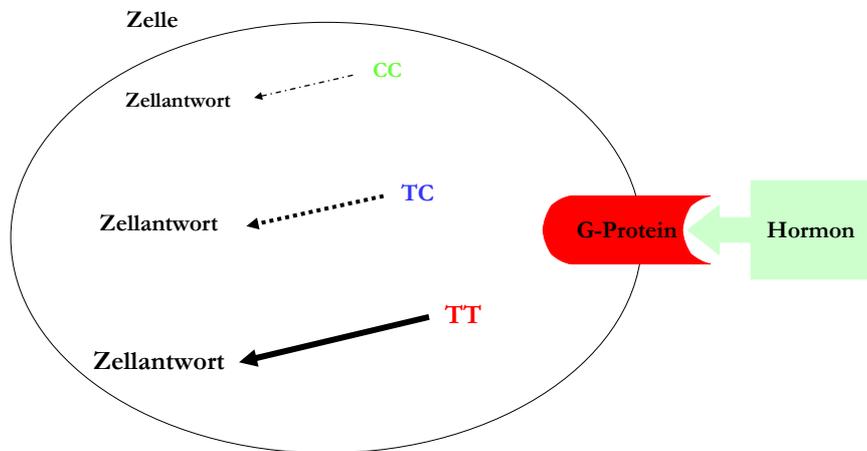
Somit ist eine Genotypisierung des *GNB3*-Locus möglicherweise für die Präventivmedizin geeignet, um Risikopatienten frühzeitig zu identifizieren, die dann durch Lebensstiländerung dieser genetischen Prädisposition gezielt entgegenwirken können. Bei Grenzwerthypertonie kann der Nachweis einer genetischen Prädisposition die Entscheidung für eine medikamentöse antihypertensive Therapie begünstigen.

1.6 Gβ3-s und verstärkte Chemotaxis neutrophiler Granulozyten

Untersuchungen an weißen Blutzellen (neutrophile Granulozyten) von Genträgern des 825T-Allels belegten, dass diese Zellen auf einen Reiz mit Chemokinen (Interleukin-8) stärker reagierten. So wanderten diese Abwehrzellen schneller in Richtung auf einen Krankheitserreger und die Chemotaxis war ausgeprägter als bei Zellen von Menschen, die das veränderte Gen nicht tragen (s. Abb. 5).

Lindemann et al. (2001) beobachteten eine 2-4 fach signifikant gesteigerte T-Zellproliferation bei Individuen, die homozygot für das 825T-Allel waren. Zudem war auch die Zellantwort auf IL-2 und IL-8 (Virchow et al., 1999) signifikant um den Faktor 2,5 verstärkt. 825T-Allel-Träger hatten im Vergleich zu homozygoten C825-Trägern außerdem signifikant höhere Konzentrationen an CD3⁺- und CD4⁺-Zellen. Auch diese Eigenschaften könnten bei unseren Vorfahren sehr wichtig gewesen sein, da durch Verletzungen eingedrungene Bakterien schneller und wirkungsvoller bekämpft werden konnten. Ein signifikanter Unterschied konnte für CD8⁺-, CD14⁺- und CD18⁺- Zellen nicht gezeigt werden.

Abb. 5: Genotyp-abhängige Chemotaxis



1.7 *GNB3* C825T-Polymorphismus und Körpergewicht nach der Entbindung

Gutersohn et al. (2000) untersuchten den Einfluss des 825T-Allels auf das Körpergewicht von Frauen ein Jahr nach der Geburt ihres ersten Kindes und zeigten, dass Trägerinnen des 825T-Allels nach der Geburt ihres Kindes erheblich mehr wogen als vor der Schwangerschaft, wenn sie nicht regelmäßig körperlich aktiv waren (1 Stunde körperliche Aktivität pro Woche). Das 825T-Allel ging bei Schwangeren postpartal mit einem erhöhten BMI einher, hingegen war der BMI bei Frauen mit Nullipara signifikant niedriger.

Bei Frauen mit dem homozygoten TT-Genotyp betrug der BMI im Durchschnitt 4,2 kg/m² mehr als bei Frauen mit dem TC- bzw. CC-Genotyp. Jedoch können wiederum homozygote 825T-Allel-Trägerinnen, die regelmäßig wöchentlich zwei Stunden Sport treiben, das Körpergewicht normalisieren und profitieren somit von körperlicher Aktivität.

Erwähnenswert in diesem Zusammenhang ist auch, dass 825T-Allel-Trägerinnen gehäuft hypotrophe Neugeborene zur Welt bringen. Diese Beobachtung ist von besonderer Bedeutung, da ein niedriges Geburtsgewicht im späteren Leben das kardiovaskuläre Risiko erhöht (Hoche et al., 2000).

1.8 C825T-Polymorphismus und Aktivität kardialer K⁺-Kanäle

In einer Fall-Kontroll-Studie von Dobrev et al. (2000) wurde eine signifikante Assoziation zwischen elektrophysiologischen Parametern von K⁺-Kanälen im menschlichen Vorhof und dem Genotypstatus des *GNB3* C825T-Polymorphismus gefunden. Es wurde die Ursache für die veränderte K⁺-Kanalaktivität von I_{K1} und I_{K, ACh} bei homozygoten 825T-Allel-Trägern mit Hilfe von molekular-biologischen (kompetitive RT-PCR zum Nachweis der beteiligten Kanal-Subtypen auf mRNA-Ebene) Methoden untersucht.

Chronisches Vorhofflimmern verkürzt die Aktionspotentialdauer und die Refraktärzeit. Zahlreiche klinisch eingesetzte Antiarrhythmika hemmen K⁺-Kanäle und verlängern die Aktionspotentialdauer und somit auch die Refraktärzeit. In dieser offenen Fall-Kontroll-Studie sollte deshalb die Aktivität ausgewählter repolarisierender K⁺-Ströme (I_{K1}, I_{K, ACh}) an atrialen Myozyten aus Patienten mit chronischem Vorhofflimmern untersucht werden. Es wurde mit Hilfe der Patch-clamp-Technik in vitro geprüft, ob bei Vorhofflimmern im Vergleich zum Sinusrhythmus Veränderungen bei diesen Strömen vorliegen und ob diese zu einer Veränderung der Form des atrialen Aktionspotentials führen.

Dobrev et al. fanden, dass chronisches Vorhofflimmern mit einer erhöhten Dichte des I_{K1}-Stroms bzw. einer verminderten Stimulierbarkeit des I_{K, ACh} mit Carbachol assoziiert war. Die Aktionspotentialdauer war bei Vorhofflimmern signifikant verringert, die Verkürzung der Aktionspotentialdauer nach Aktivierung von muskarinartigen Rezeptoren mit Carbachol bei Vorhofflimmern abgeschwächt.

Im Weiteren wurde geprüft, ob Vorhofflimmern die Expression der K⁺-Kanäle auf mRNA-Ebene verändert. Es wurde schließlich untersucht, ob die beobachteten Veränderungen bei I_{K1} und I_{K, ACh} vom G-Protein β3-Untereinheit 825T-Allelstatus der Patienten abhing.

Hierbei kam man zu folgenden Ergebnissen: Die Dichte der oben genannten Ströme war vom 825T-Allelstatus abhängig - die Dichte von I_{K1} war signifikant assoziiert nur mit dem Gβ3 825T-Allel, wohingegen die Dichte von $I_{K, ACh}$ zusätzlich zum Gβ3 825T-Allel auch signifikant assoziiert war mit dem BMI und den Rauchgewohnheiten des Probanden. Hinzu kam, dass eine Langzeittherapie mit Ca^{2+} -Antagonisten bzw. mit Digitalis-Präparaten die Dichte bei I_{K1} beeinflusste, aber keinen Einfluss auf $I_{K, ACh}$ hatte. In Myozyten der Patienten mit dem Genotyp CC war I_{K1} erniedrigt, hingegen bei Patienten mit dem Genotyp TT signifikant erhöht. Ein gegensätzliches Verhalten wurde bei $I_{K, ACh}$ beobachtet.

Das Hauptergebnis der Untersuchungen von Dobrev et al. war eine signifikante Assoziation zwischen dem 825T-Allel und der Aktivität des K^+ -Ionenflusses. Die Amplitude des I_{K1} war in den Myozyten der Patienten mit dem Genotyp TT im Vergleich zum Genotyp CC und TC verstärkt. Zusätzlich fanden Dobrev et al., dass der Anstieg des Ionenstroms - ausgelöst durch Stimulation mit Carbachol - bei homozygoten 825T-Allelträgern erniedrigt war.

Da I_{K1} das Ruhemembranpotential bestimmt, führte eine erhöhte Dichte von I_{K1} in Vorhofmyozyten der Patienten mit dem TT-Genotyp zu einem negativeren Membranpotential und zur beschleunigten Repolarisation.

1.9 Kardiomyopathie - historischer Hintergrund

Bereits vor etwa 100 Jahren beschrieben W.H. Walshe und O. Bollinger unabhängig voneinander ein Krankheitsbild, das heute als alkoholtoxische Kardiomyopathie und im Volksmund auch als "Münchener Bierherz" bezeichnet wird. Im Jahre 1907 berichtete der Würzburger Pathologe A. Schmincke über 2 Fälle einer "Hypertrophia ventriculi sinistri cordis" mit extremer Einengung der linksventrikulären Ausflussbahn, die er "linksseitige Conusstenosen" nannte. Als Ursache diskutierte er eine kongenitale Hyperplasie. Er lieferte damit die erste pathologisch-anatomische Beschreibung der Kardiomyopathie (Hopf, R. et al., 1990).

Gezielte und systematische Untersuchungen wurden jedoch erst nach Einführung der selektiven Koronarangiographie durch F.M. Sones im Jahre 1959 sowie der Myokardbiopsie durch S. Sakakibara und S. Konno im Jahre 1962 durchgeführt.

Erst durch diese Technik wurde es möglich, Kardiomyopathien sicher von anderen organischen Herzkrankheiten abzugrenzen bzw. exakt die Diagnose “Kardiomyopathie” zu stellen.

1.10 Einteilung der Kardiomyopathien

Neben der KHK, der hypertensiven Herzkrankheit und den Herzklappenerkrankungen stellt die dilatative Kardiomyopathie eine der häufigsten Ursachen für eine Herzinsuffizienz dar (Olbrich, H.-G., 2001). Bei Patienten unter 40 Jahren ist sie nach der ischämischen Herzerkrankung der Hauptgrund einer Herztransplantation (Montserrat, L. et al., 2002 und Mestroni, L. et al., 1999).

Unter Berücksichtigung der zugrundeliegenden Pathophysiologie sowie wesentlicher ätiologischer und pathologischer Faktoren modifizierte die WHO 1995 die Einteilung der Kardiomyopathien und definierte sie als “Erkrankungen des Myokards assoziiert mit kardialer Dysfunktion”.

Die Kardiomyopathien werden demzufolge in die folgenden 4 Formen unterteilt, von denen jede durch unterschiedliche Erkrankungen verursacht sein kann:

- die dilatative Kardiomyopathie (DCM),
- die hypertrophische Kardiomyopathie,
- die restriktive Kardiomyopathie und
- die arrhythmogene, rechtsventrikuläre Kardiomyopathie.

Daneben steht der Begriff “nicht klassifizierte Kardiomyopathien” für jene seltenen Fälle, die nicht durch die genannte Einteilung charakterisiert werden können.

Unterschieden von den Kardiomyopathien werden in dem Bericht der WHO die spezifischen Kardiomyopathien, denen Herzmuskelerkrankungen im Zusammenhang mit spezifischen kardialen oder systemischen Erkrankungen zugrunde liegen, wie ischämische, valvuläre, hypertensive, entzündliche und metabolische Kardiomyopathien (Schoppet, M., Maisch, B., 2001). Es liegt nahe, dass auch bei dieser pragmatischen

Einteilung die Grenzen zwischen primärer und spezifischer Kardiomyopathie mitunter verwischen.

1.11 Epidemiologie der Kardiomyopathie

Die DCM stellt die häufigste Form der Kardiomyopathien dar. Sie ist charakterisiert durch eine Dilatation und eingeschränkte Kontraktilität eines oder beider Ventrikel. Die jährliche Inzidenz variiert in den westlichen Industrieländern zwischen 5 und 8 Fällen auf 100.000 Einwohner, die Prävalenz beträgt ca. 36/ 100.000 Einwohner. Obwohl keine genauen epidemiologischen Daten vorliegen, ist anzunehmen, dass die Häufigkeit der DCM in der Bundesrepublik Deutschland ähnlich ist (Osterziel, K.J. et al., 2001).

Männer sind gegenüber Frauen von der Erkrankung im Verhältnis von fast 3:1 wesentlich häufiger betroffen. Die Erstdiagnose wird häufig im mittleren bis höheren Lebensalter gestellt; es erkranken jedoch auch Jugendliche. Das Durchschnittsalter bei Diagnosestellung liegt bei ca. $43,2 \pm 11$ Jahren. Vom Zeitpunkt der Diagnosestellung bis zur Herztransplantation vergehen im Durchschnitt $5,6 \pm 4,5$ Jahre (Montserrat, L. et al., 2002).

1.12 Ätiologie der Kardiomyopathie

Patienten mit einer DCM bilden eine sehr heterogene Gruppe hinsichtlich der vielfältigen Krankheitsursachen einerseits und der diagnostischen Schwierigkeiten, die häufig multifaktorielle Ätiologie zu ermitteln, andererseits. Die Mehrzahl der Fälle von DCM ist in ihrem Ursprung als idiopathisch zu bezeichnen.

Untersuchungen zur Ursache der DCM unter Einschluss von Rechts- und Linksherzkatheterisierung, Koronarangiographie und Endomyokardbiopsie zeigen als Enddiagnose bei etwa der Hälfte der Fälle von zunächst unerklärlicher DCM eine idiopathische DCM; die andere Hälfte der Enddiagnosen verteilt sich auf ein breites Spektrum primär und sekundär kardialer Erkrankungen, wobei 9-12 % der DCM auf dem Boden einer Myokarditis (= entzündliche CM), 7-11 % durch eine KHK (= ischämische CM), 2-4 % durch eine hypertensive Herzkrankheit und 1,5 % durch eine

Herzklappenerkrankung (= valvuläre CM) entstehen - und somit nach der Definition der WHO den spezifischen Kardiomyopathien zuzurechnen sind.

Tab. 1: Ätiologie der DCM (nach Ausschluss von Patienten mit arterieller Hypertonie, KHK, Herzklappenerkrankungen und restriktiver Kardiomyopathie)

1.	idiopathisch	40 %
2.	familiär	25 %
3.	infektiös	
	Myokarditis	11 %
	HIV	4 %
4.	toxisch	
	Alkohol	3 %
	Anthrazykline	1 %
	Kokain	1 %
5.	infiltrativ	6 %
	Amyloidose	
	Sarkoidose	
	Hämochromatose	
6.	peripartale DCM	5 %
7.	Kollagenose	4 %
8.	endokrine Ursachen	1 %

1.13 Klinik und Therapie der Kardiomyopathie

Klinische Symptome treten erst relativ spät im Verlauf der Erkrankung auf, d.h. häufig erst bei bereits über Monate bis Jahre bestehender linksventrikulärer Dilatation.

Bei über 70 % der Fälle manifestiert sich die DCM durch Symptome und Zeichen einer Herzinsuffizienz. Nach dem Auftreten klinischer Symptome einer Herzinsuffizienz ist die Prognose der DCM allerdings ernst. Die durchschnittliche 5-Jahres-Mortalität symptomatischer Patienten wird in neueren Untersuchungen mit 20 % angegeben.

Die Überlebenskurve der dilatativen Kardiomyopathie zeigt in den meisten Untersuchungen einen exponentiellen Verlauf mit einer hohen anfänglichen Sterblichkeit in den ersten 2-3 Jahren (Schannwell, C.M. et al., 2001). Der Verlauf der DCM ist jedoch sehr variabel.

Die Mehrzahl der Patienten erhält eine Basistherapie mit Digitalis, β -Blocker, einem Diuretikum (Aldosteronantagonist) und einem ACE-Hemmer. Trotz der Einführung neuer Therapiekonzepte ist die Prognose der Patienten mit DCM weiterhin schlecht. Annähernd die Hälfte stirbt plötzlich, zumeist aufgrund ventrikulärer Tachyarrhythmien.

Die primäre Risikostratifizierung von Patienten mit DCM stellt ein bislang ungelöstes Problem dar. Ein Ungleichgewicht des autonomen Nervensystems mit einer Überaktivierung des sympathischen Anteils und einer reduzierten Aktivität des Parasympathikus spielt bei der Genese des plötzlichen Herztodes eine entscheidende Rolle, wobei insbesondere ein verminderter Parasympathikotonus für das Auftreten ventrikulärer Tachyarrhythmien prädisponiert (Hoffmann, J. et al., 2000). Die einzige kausale Therapie besteht derzeit in einer Herztransplantation.

1.14 Definition und Diagnose der familiären DCM

Für einen nicht unerheblichen Teil der idiopathischen DCM wird mittlerweile eine erbliche Genese angenommen. Aufgrund epidemiologischer Untersuchungen kann bei 20-30 % der Erkrankten eine familiäre DCM nachgewiesen werden. Die tatsächliche Häufigkeit der familiären DCM wird dabei wahrscheinlich noch unterschätzt, da frühe Marker der Erkrankung fehlen und klinische sowie morphologische Kriterien zur Diagnosestellung einer genetisch determinierten DCM nicht aussagekräftig sind. 1981 wurde in einer retrospektiven Studie der Mayo Klinik die Anzahl familiärer Fälle mit nur 2 % angegeben (Mestroni, L. et al., 1999). Die Diagnose muss sich daher auf die Familienanamnese sowie Kopplungs- und Kandidatengenanalysen stützen.

Bereits 1961 wurde eine familiäre Häufigkeit der DCM beschrieben. Die erste systematische Analyse von Familienangehörigen wurde jedoch erst 1992 von Michels et al. durchgeführt. Sie konnte zeigen, dass 20 % der untersuchten Patienten mit DCM eine familiäre Form der DCM aufwiesen. Die Prävalenz einer familiär bedingten DCM ist besonders hoch bei Patienten, die einer Herztransplantation zugeführt wurden (Monserrat, L. et al., 2002).

Weitere Untersuchungen bestätigten, dass bei ca. 25 % aller DCM-Fälle eine familiäre Erkrankung zugrunde liegt. Bei bis zu 29 % aller asymptomatischen Verwandten von DCM-Patienten kann ein vergrößerter linker Ventrikel (20 %, durch Ablagerung von

Kollagen-Typ I- und III, Latif, N. et al., 1999), eine eingeschränkte systolische Funktion (6 %) oder beides (3 %) festgestellt werden. 27 % der Verwandten von DCM-Patienten mit vergrößertem linken Ventrikel entwickelten innerhalb von ca. 3 Jahren eine DCM (Mahon, N.G. et al., 2005).

Eine geringe Vergrößerung des linken Ventrikels oder eine gering verminderte systolische Funktion könnten demnach frühe Stadien einer sich später klinisch manifestierenden DCM darstellen.

Der Vererbungsmodus ist heterogen. So wurden sowohl autosomal dominante als auch autosomal rezessive, X-chromosomal rezessive (z.B. bei Duchenne Muskeldystrophie, Hunter, J.J., Chien, K.R., 1999) sowie mitochondriale Vererbungsmodi aufgezeigt.

Bei der Mehrzahl der Fälle verläuft der Vererbungsmodus autosomal dominant mit inkompletter und altersmodifizierter Penetranz. Jüngsten Daten zufolge entfallen auf den autosomal dominanten Modus 56 %, auf den autosomal rezessiven 16 % (diese Patienten sind meist jünger und haben eine schlechtere Prognose) auf die X-chromosomale Form 10 % (i.d.R. junge Männer betroffen, DCM verläuft rapide) und 7,7 % sind nicht klassifizierbar (Mestroni, L. et al., 1999 und Burkett, E.L. et al., 2005). Aufgrund der ausgeprägten Variabilität des Krankheitsbildes, der häufig erst nach dem 30. Lebensjahr erkennbaren Manifestation der DCM und aufgrund der kleinen Familien in Europa kann in Einzelfällen einer genetisch bedingten DCM der Nachweis der Vererbung der Erkrankung nicht erkennbar sein. Selbst Individuen mit demselben Genotyp zeigen unterschiedliche Ausprägungsgrade im Phänotyp sowie unterschiedliche Krankheitsverläufe. Bei einigen Patienten verläuft die Erkrankung progredient und macht eine Herztransplantation notwendig, bei anderen hingegen bleibt sie jahrelang stabil (Monserrat, L. et al., 2002).

Entsprechend der Funktion der von den Genen kodierten Proteine (s. Tab. 2, Osterziel, K.J. et al., 2005) liegt die Annahme nahe, dass der Erkrankung eine fehlerhafte Kraftentwicklung oder Kraftübertragung zugrunde liegt.

Tab. 2: DCM - Krankheitsgene

Protein	Gen	Chromosom	Lokalisation	Funktion	Erbgang
β -Myosin-Schwerkette	MYH7	14q11	Sarkomer	Muskelkontraktion	autosomal-dominant
Lamin A/C	LMNA	1q22	Zellkernmembran	Genexpression	autosomal-dominant
Troponin T	TNNT2	1q32	Sarkomer	Muskelkontraktion	autosomal-dominant
α -Actinin 2	ACTN2	1q43	Z-Scheibe	Interaktion Titin/ Actin	autosomal-dominant
α -Myosin-Schwerkette	MYH6	14q11	Sarkomer	Muskelkontraktion	autosomal-dominant
α -Tropomyosin	TPM1	15q22	Sarkomer	Muskelkontraktion	autosomal-dominant
ATP-sensitiver K ⁺ -Kanal	ABCC9	12p12	Zellmembran	regulat. Untereinheit K ⁺ -Kanals	autosomal-dominant
kardiales α -Actin	ACTC	15q14	Sarkomer	Muskelkontraktion	autosomal-dominant
kardialer Na ⁺ -Kanal α 5 A	SCN5A	3p22	Zellmembran	α -Untereinheit d. Na ⁺ -Kanals	autosomal-dominant
Cypher/ ZASP	LDB3	10q23	Zytoskelett	Aufbau von Membranprotein	autosomal-dominant
δ -Sarkoglycan	SGCD	15q33	Zytoskelett	Transduktion kontrakt. Kraft	autosomal-dominant
Desmin	DES	2q35	Zytoskelett	Transduktion kontrakt. Kraft	autosomal-dominant
Eye absent homolog 4	EYA4	6q23	Zellkern	Transkriptionsfaktor Myogenese	autosomal-dominant
Metavinculin	VCL	10q22	Zell-Zell-Kontakt	Verankerung von F-Actin	autosomal-dominant
Muscle LIM protein	CSRP3	11p15	Z-Scheibe	Spannungssensor	autosomal-dominant
Myosin-binding protein C	MYBPC3	11p11	Sarkomer	Muskelkontraktion	autosomal-dominant
Phospholamban	PLN	6q22	Sarkoplasmat. Retikul.	Regulation Ca ²⁺ -Homöostase	autosomal-dominant
Telethonin/ Titin-cap	TCAP	17q12	Z-Scheibe	Sarkomeraufbau	autosomal-dominant
Titin	TTN	2q31	Sarkomer	Fkt. als elastisches Element	autosomal-dominant
Troponin C	TNNC1	3p21	Sarkomer	Muskelkontraktion	autosomal-dominant
Desmoplakin	DSP	6q24	Desmosom	Zell-Zell-Verbindung	autosomal-rezessiv
Troponin I	TNNI3	19q13	Sarkomer	Muskelkontraktion	autosomal-rezessiv
Dystrophin	DMD	Xq21	Zytoskelett	Kraftübertragung	X-chrom.-dominant
Tafazzin	TAZ/ G4.5	Xq28	Mitochondrien	unbekannt	X-chrom.-dominant

Nach den Empfehlungen der Europäischen Arbeitsgruppe über familiäre dilatative Kardiomyopathien (Collaborative Research Group of the European Human and Capital Mobility Project on Familial Dilated Cardiomyopathy) ist die Erkrankung familiär, wenn

1. es in einer Familie zwei oder mehr Betroffene gibt oder
2. ein Verwandter ersten Grades eines Patienten mit DCM vor dem 35. Lebensjahr einen unerklärten plötzlichen Herztod erlitten hat.

Liegen bei Familienangehörigen eines Patienten mit DCM nur geringe kardiale Auffälligkeiten vor, so kann die Diagnose "familiäre DCM" oft nicht sicher gestellt werden. Um die Einordnung von Familienangehörigen eines Patienten mit DCM zu verbessern, hat die Europäische Arbeitsgruppe Kriterien zur Diagnose der familiären DCM vorgeschlagen:

Die Diagnose DCM ist sicher, wenn eine Dilatation des linken Ventrikels über 117 % des für das Alter und die Körperoberfläche liegenden Normwertes besteht und wenn eine Ejektionsfraktion unter 45 % und/ oder eine reduzierte fraktionelle Faserverkürzung unter 25 % vorliegt. Obwohl diese Kriterien noch nicht validiert sind, bieten sie bei Familienuntersuchungen eine Hilfe für die Phänotypisierung von Personen mit nur gering ausgeprägten kardialen Auffälligkeiten.

1.15 Bedeutung von G-Proteinen für die Myokardhypertrophie

Die G-Protein-vermittelte Signaltransduktion ist im Säugerorganismus der häufigste Mechanismus der transmembranären Signalweiterleitung und ist bei nahezu allen physiologischen und pathologischen Prozessen involviert. Gq und G₁₁ stellen die beiden Hauptmitglieder der Familie dar, die in nahezu allen Zellen des Säugerorganismus exprimiert sind (Offermanns, S., 2001).

Bei den Untersuchungen von Offermanns sollten neuere Erkenntnisse über die zentrale Rolle Gq/ G₁₁-vermittelter Signaltransduktionsvorgänge bei der Myokardhypertrophie dargestellt werden.

Die myokardiale Hypertrophie stellt einen entscheidenden Schritt bei der Pathogenese der Myokardinsuffizienz dar. Während das Myokardwachstum im Verlauf der

Herzentwicklung auf einer proliferativen Zellvermehrung basiert, erfolgt eine Massenzunahme des adulten Myokards durch Wachstum der Einzelzelle. Diese Hypertrophie des adulten Myokards stellt in den meisten Fällen eine adaptive Reaktion des Herzens auf eine erhöhte hämodynamische Belastung dar. Bei der Hypertrophie im Rahmen einer arteriellen Hypertonie handelt es sich um einen pathologischen Prozess.

Diese pathologische Hypertrophie stellt als frühes Stadium im klinischen Verlauf der Herzinsuffizienz einen wichtigen Risikofaktor für eine erhöhte kardiale Morbidität und Mortalität dar. Der Übergang einer zunächst adaptiven Hypertrophie in eine pathologische Hypertrophie und klinisch apparente Myokardinsuffizienz ist fließend.

In den letzten Jahren konnten einige basale Vorstellungen von den molekularen Vorgängen im Rahmen der myokardialen Hypertrophie entwickelt werden. Weitgehend unklar ist zurzeit, wie eine erhöhte mechanische Belastung des Myokards unter pathologischen Bedingungen in ein Wachstumssignal umgesetzt wird, das in einer myokardialen Hypertrophie resultiert. An dieser Mechanotransduktion könnten Integrine, transmembranäre Tyrosinkinase oder mechanosensitive Ionenkanäle beteiligt sein. Eine wichtige Rolle spielen offenbar verschiedene auto- und parakrine Hormone des Myokards, wie Endothelin-1, Angiotensin II und andere, sowie möglicherweise noch nicht identifizierte Mediatoren, die im mechanisch belasteten Herzen gebildet werden und zu einem Kardiomyozytenwachstum führen.

Da all diese Agonisten über Rezeptoren wirken, die zu einer Gq/ G₁₁-vermittelten Aktivierung der Phospholipase C führen, wird angenommen, dass dieser Signaltransduktionsweg eine wichtige Rolle im Rahmen eines zur kardialen Hypertrophie führenden, pathologischen Kardiomyozytenwachstums spielt.

Die Daten von Offermanns (2001) zeigten, dass eine chronische Aktivierung des G-Proteins Gq ausreicht, um eine myokardiale Hypertrophie auszulösen. Einige Befunde konnten mittlerweile zeigen, dass der Gq/ G₁₁-vermittelte Signaltransduktionsweg tatsächlich auch maßgeblich an der physiologischen Hypertrophie-Reaktion des Myokards auf eine erhöhte hämodynamische Belastung beteiligt ist.

So zeigten Mäuse, die ein C-terminales Fragment von Gq in Kardiomyozyten transgen exprimieren, eine um 60 % reduzierte Massenzunahme des linken Ventrikels nach Erhöhung der Nachlast durch Konstriktion der Aorta. Offensichtlich führte dabei das C-

terminale Gq-Fragment in einer dominant-negativen Weise zu einer partiellen Hemmung der durch Gq/ G₁₁-gekoppelte Rezeptoren induzierten Signaltransduktion.

Der Arbeitsgruppe um Wettchreck et al. (2001) gelang die Generierung einer Mauslinie, in der mittels konditionaler Gen-Inaktivierung eine kardiomyozytäre Gq/ G₁₁-Doppeldefizienz erzeugt wurde.

Der völlige Ausfall des Gq/ G₁₁-vermittelten Signalweges in den Kardiomyozyten dieser Mäuse führte zum vollständigen Fehlen einer myokardialen Hypertrophieantwort auf eine Nachlasterrhöhung durch Aortenkonstriktion.

1.16 Zielsetzung der Arbeit

1998 fanden Siffert et al. bei einigen Patienten mit Bluthochdruck eine Genveränderung im Gen *GNB3*. Aufgrund dieser Genveränderung wird die hormonelle Signalübertragung in die Zellen des menschlichen Körpers deutlich verstärkt. Eine Genotypisierung bezüglich des C825T-Polymorphismus ermöglicht die Vorhersage über die Effizienz der Aktivierbarkeit von G-Proteinen und nachgeschalteter Zellfunktionen. Das T-Allel korreliert hierbei mit einer erhöhten zellulären Aktivierbarkeit und führt zu einem erhöhten Risiko für arterielle Hypertonie, Adipositas, metabolisches Syndrom, Myokardinfarkt, Apoplex sowie Insulinresistenz.

Neben der KHK, der hypertensiven Herzkrankheit und den Herzklappenerkrankungen stellt die dilatative Kardiomyopathie eine der häufigsten Ursachen für Herzinsuffizienz dar (Olbrich, H.-G., 2001). Sie ist charakterisiert durch eine Dilatation und eingeschränkte Kontraktilität eines oder beider Ventrikel. In über 70 % der Fälle manifestiert sich die DCM durch Symptome und Zeichen einer Herzinsuffizienz.

G-Proteine werden in allen Körperzellen exprimiert, auch in Zellen und Geweben des kardiovaskulären Systems (glatte Gefäßmuskelzellen, Kardiomyozyten, Endothelzellen, Thrombozyten etc.). Veränderungen im *GNB3*-Gen wirken sich nicht nur auf den Blutdruck aus, sondern, wie oben bereits erwähnt, auch auf andere wichtige Funktionen des Körpers.

Das Screening von Patienten und ihrer Angehörigen mit dilatativer Kardiomyopathie auf Genmutationen wird limitiert durch den hohen Zeitaufwand, den man mit aktuellen Methoden noch hat sowie durch die Größe der codierenden Genabschnitte (Baig, M.K. et al., 1998). Zudem wird die klinische Untersuchung erschwert durch die geographische Verteilung der betroffenen Patienten bzw. ihrer Angehörigen (Mahon, N.G. et al., 2005). Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit die Frage geklärt werden, ob Genotypen des *GNB3* C825T-Polymorphismus das Risiko für eine dilatative Kardiomyopathie mit nachfolgender Herztransplantation erhöhen.

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchungsmaterial

2.1.1 Patienten

Die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen (DNA-Extraktion, PCR-Reaktion, Restriktionsanalyse und Gelelektrophorese) wurden an insgesamt 89 Herzmuskelpräparaten aus explantierten Herzen von Patienten mit DCM durchgeführt, die freundlicherweise von Herrn Professor Dr. med. T. Wieland aus dem Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf zur Verfügung gestellt wurden. Die Lagerung der Präparate erfolgte bei -20 °C. Nach der Bestimmung des Genotypen für *GNB3* wurden sämtliche Patientendaten, die im Herzkatheterbericht dokumentiert waren, in eine Datenbank eingegeben und ausgewertet (s. Punkt 2.2.5 und 2.2.6). Leider waren hierbei familienanamnestische oder genetische Daten zu den Patienten nicht vorhanden.

2.1.2 Geräte

Name	Hersteller
Cellstar Brutschrank	Nunc GmbH, Wiesbaden
PCR-Maschine Biometra T-Gradient	Biometra, Göttingen
PCR-Maschine Biometra Uno-Thermoblock	Biometra, Göttingen
QIAamp Spinsäule	Qiagen, Hilden
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
steriles Skalpell	AESCU LAP
Thermoblock	Biotron, Göttingen
Vortex	Biotron, Göttingen

Wärmebad	Köttermann Labortechnik
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus Sepatech GmbH

2.1.3 Chemikalien

Name	Hersteller
Agarose Gel 2,5 %	Life Technologies, Eggenstein
Bromphenolblau 0,5 %	Merck, Darmstadt
Ethanol (96-100 %)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg

2.1.4 Enzyme, Nukleotide und Reaktionspuffer

Name	Hersteller
Auftragspuffer	Qiagen, Hilden
BSE 1-Primer	Invitrogen
BSE 2-Primer	Invitrogen
<i>BseDI</i> (SecI)	MBI Fermentas, Lot: 1522
Buffer AE	Qiagen, Hilden
Buffer AL	Qiagen, Hilden, Lab. No. 10918445
Buffer ATL	Qiagen, Hilden, Cat. No. 19076
Buffer AW 1	Qiagen, Hilden
Buffer AW 2	Qiagen, Hilden
Buffer Y+ / Tango TM (with BSA)	MBI Fermentas, Lot: 6110

Eppendorf MasterMix (2.5x)

Eppendorf AG, Hamburg, Lot: MB 116 A

Proteinase K

Qiagen, Hilden, Cat. No. 19133

Taq DNA-Polymerase

Life Technologies, Eggenstein

TBE-Puffer 0,5x

Qiagen, Hilden

2.1.5 Zugehörige Reaktionspuffer

2.1.5.1 Reaktionspuffer für die Taq DNA-Polymerase

KCL 50 mM

BSA 0,1mg/ ml

Tris-HCl 20 mM

pH 8,4

2.1.5.2 TBE-Puffer

Tris-HCl 89 mM

Borsäure 89 mM

EDTA 2 mM

pH 8,0

2.1.5.3 Buffer Y+/ Tango TM

Tris-HCL 33 mM

Magnesiumacetat 10 mM

Natriumacetat 66 mM

BSA 0,1mg/ ml

pH 7,9

2.1.5.4 PCR-Fertigmix

Der Eppendorf MasterMix (2.5x) ist ein PCR-Fertigmix. Dieser “ready-to-use” Mix verringert die Zahl zeitraubender Pipettierschritte, da nur Primer und Template (= DNA) in den Fertigmix gegeben werden müssen. Dies reduziert nicht nur die Wahrscheinlichkeit von Pipettierfehlern und das Kontaminationsrisiko, sondern steigert auch die Präzision und den Probendurchsatz.

Neben der Taq DNA-Polymerase, Nukleotiden, Standard MgCl₂-Konzentration und Reaktionspuffer enthält der PCR-MasterMix spezielle Stabilisatoren, die eine hohe Ausbeute und exzellente Stabilität der Reaktionskomponenten garantieren.

Inhalt des MasterMix:

Taq DNA-Polymerase (0,06 U/ µl), 2.5x Taq (entspricht 0,05 units/ µl),

Reaktionspuffer (mit 125 mM KCl, 75 mM Tris-HCl pH 8.4, 3.75 mM MgCl₂, 0,025 % Triton® X 100), 500 µM of each dNTP und Stabilisatoren

sowie 25 mM separate MgCl₂-Lösung

Der Mix muss zur Lagerung nicht eingefroren werden, wodurch die Komponenten geschont werden und der zeitraubende Auftauschritt entfällt. Die Aufbewahrung erfolgte bei 2-8 °C im Kühlschrank. Das Fertigmedium, das alle Supplemente enthält, wurde regelmäßig frisch angesetzt und maximal 1 Woche bei 4 °C gelagert.

2.1.5.5 PCR-Ansatz für 1 Probe

12 µl Eppendorf MasterMix

2 µl Primer BSE 1 (20 pmol): TGA CCC ACT TGC CAC CCG TGC (sense)

2 µl Primer BSE 2 (20 pmol): GCA GCA GCC AGG GCT GGC (anti-sense)

14 µl Aqua dest. →

Zu den 30 µl PCR-Mix gibt man jeweils 1 µl DNA hinzu und führt die PCR-Reaktion, wie unten beschrieben, durch.

Bei der Auswahl der Primer wurde darauf geachtet, dass das resultierende PCR-Produkt jeweils eine einzige Schnittstelle für das Restriktionsenzym *BseDI* enthielt.

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Extraktion aus Gewebe

- Das Herzmuskelgewebe wird auf Raumtemperatur (20 °C bis 25 °C) erwärmt.
- Es werden 2 unterschiedlich temperierte Wasserbäder vorbereitet: 56 °C für Schritt 2, 70 °C für Schritt 3.
- Für die Elution in Schritt 8 wird “Buffer AE” auf Raumtemperatur erwärmt.
- Falls sich im “Buffer AL” ein Niederschlag bildet, wird dieser durch Erwärmen auf 70 °C gelöst.
- Alle Zentrifugationsschritte werden bei Raumtemperatur durchgeführt.
- Ein mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Gewebeproben sollte vermieden werden, da dieses zu einer verminderten DNA-Ausbeute führt.
- Mit den QIAamp Spinsäulen werden DNA und RNA parallel gereinigt, falls beide Nukleinsäuren in der Probe vorhanden sind. RNA kann enzymatische Reaktionen hemmen, nicht jedoch die PCR. Wenn RNA-freie genomische DNA benötigt wird, sollten vor der Zugabe des “Buffer AL” 20 µl einer RNase Stammlösung (20 mg/ ml) zur Probe gegeben werden.

Ein ca. 1 cm³ großes Herzmuskelgewebestück wird mit einem sterilen Skalpell abgetrennt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend werden 500 µl “Buffer ATL” hinzugegeben.

Nun pipettiert man 25 µl Proteinase K hinzu, durchmischt den Ansatz auf einem Vortex und inkubiert die Probe im Wärmebad bei 56 °C, bis sich das Gewebe vollständig aufgelöst hat.

Für eine effiziente Lyse ist sofortiges und kräftiges Mischen besonders wichtig. Die Probe wird solange auf dem Vortex gemischt, bis eine homogene Lösung entsteht. Die Dauer der Lyse hängt vom Gewebetyp ab. Normalerweise ist eine Lyse nach 1-3 Stunden erfolgt.

Aus dem Ansatz werden 200 µl entnommen und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Nun gibt man 200 µl "Buffer AL" hinzu und "vortex" das Gemisch für 15 sec. Danach findet eine Inkubation für 10 min. bei 70 °C statt.

Es ist essentiell, dass das Gewebe und der "Buffer AL" vollständig vermischt sind und eine homogene Lösung ergeben. Gelegentlich entstehen helle Präzipitate, ausgelöst durch "Buffer AL". Diese lösen sich wieder während einer Inkubation bei 70 °C.

Danach gibt man 200 µl Ethanol (96-100 %) zur Probe und mischt sie kräftig auf dem Vortex.

Nachfolgend stellt man eine QIAamp Spinsäule in ein 2 ml Auffanggefäß (Collection Tube, im Kit enthalten). Dieser gesamte Ansatz aus Schritt 4 wird vorsichtig auf die QIAamp Spinsäule gegeben, ohne den Rand zu benetzen. Danach erfolgt eine Zentrifugation für 1 min. bei 13000 rpm. Anschließend stellt man die QIAamp Spinsäule in ein sauberes 2 ml Auffanggefäß und verwirft das benutzte Gefäß mitsamt Filtrat.

Die QIAamp Spinsäule wird vorsichtig geöffnet und es werden 500 µl "Buffer AW 1" hinzugegeben. Hinterher wird erneut bei 13000 rpm für 1 min. zentrifugiert. Im Anschluss werden die QIAamp Spinsäulen in ein sauberes 2 ml Auffanggefäß gestellt und das benutzte Gefäß mitsamt Filtrat verworfen.

Nachdem die QIAamp Spinsäule wieder vorsichtig geöffnet wurde, gibt man diesmal 500 µl "Buffer AW 2" im neuen Auffanggefäß hinzu. Nun wird für 3 min. bei 13000 rpm zentrifugiert. Ethanolreste in der Säule werden vor der Elution durch Zentrifugation mit maximaler Geschwindigkeit entfernt.

Die QIAamp Spinsäule wird in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt und das benutzte Auffanggefäß mitsamt Filtrat verworfen.

Es erfolgt ein erneutes, vorsichtiges Öffnen der QIAamp Spinsäule. Zur Elution der DNA gibt man 75 µl 56 °C warmen "Buffer AE" auf die Säule. Nach einer Inkubationszeit von 5 min. bei 70 °C im Thermoblock zentrifugiert man die Säule 1 min. lang bei 13000 rpm.

Die DNA-Ausbeute wird bei der eben genannten Inkubation erhöht. Die Elution mit 75 µl stellt ein optimales Verhältnis von DNA-Ausbeute und Konzentration sicher.

Eine wiederholte Elution des DNA-haltigen Eluats mit 75 µl "Buffer AE" erhöht die Ausbeute bis zu 15 %. Es wird nochmals bei 70 °C für 5 min. inkubiert, jedoch für 3 min. bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Elution mit Puffern, deren pH niedriger ist als 9,0, kann die DNA-Ausbeute verringern. Da DNA bei längerer Lagerung in Wasser hydrolysiert, sollte die langfristige Aufbewahrung in "Buffer AE" bei -20 °C erfolgen.

Die fertigen Proben mit der DNA können nun für weitere Zwecke benutzt werden (→ PCR, s. Punkt 2.2.2). Die Lagerung der Proben erfolgt bei 4 °C.

2.2.2 Polymerase Chain Reaction

Die PCR-Reaktion ermöglicht die Anreicherung von DNA-Abschnitten definierter Sequenz und Länge in einem sich mehrfach wiederholenden Prozess. Für diese Reaktion kommen hitzestabile DNA-Polymerasen aus thermophilen Bakterien zum Einsatz, z.B. die Taq-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus*. Diese Polymerasen bleiben auch nach mehrfachem Erhitzen auf 94 °C aktiv. Der zu amplifizierende Abschnitt wird von zwei Oligonukleotiden (Primern) im Überschuss flankiert, die jeweils an einen der beiden DNA-Stränge binden.

Im ersten Schritt (Denaturierung) wird die doppelsträngige Ausgangs-DNA (dsDNA) durch Erhitzen auf 94 °C in Einzelstrang-DNA (ssDNA) überführt. Im nächsten Schritt (Annealing) wird die Temperatur auf 64 °C gesenkt, wobei die Annealingtemperatur von der Schmelztemperatur sowie der Homologie der Oligonukleotide zum Template abhängig ist. Bei niedrigeren Temperaturen lagern sich Oligonukleotide an die komplementären Sequenzen auf der ssDNA an.

Die spezifischen Oligonukleotide, die in sehr hohen Konzentrationen vorhanden sind, hybridisieren mit ihren komplementären Sequenzen in der genomischen DNA. Sie dienen

nun als Starter für die Synthese eines neuen DNA-Stranges, die nach Zugabe der Oligonukleotide und der temperaturresistenten DNA-Polymerase beginnt.

Im dritten Schritt (Elongation) findet die Kettenverlängerung, d.h. Vervielfältigung der zwischen den Primern liegenden DNA-Sequenz an den 3'-OH-Enden der Primer durch die thermostabile Polymerase bei 72 °C statt. Die Elongationszeit sollte dabei ca. 1 min. pro kb betragen.

Nach Beendigung der Synthese wird das gesamte Gemisch erneut auf 95 °C erhitzt, um die neu gebildeten DNA-Doppelstränge zu schmelzen. Wird die Temperatur wieder verringert, so findet eine neue Syntheserunde statt. In jeder Runde wird also die Anzahl der Kopien von der zwischen den Startermolekülen synthetisierten Sequenz exponentiell vermehrt.

Bei der Durchführung der PCR wurden alle Vorsichtsmaßnahmen ergriffen (Arbeiten im dafür vorgesehenen PCR-Raum), um Kontaminationen zu vermeiden. In einem Gesamtvolumen von 30 µl wurde 1 µl der DNA eingesetzt und wie folgt amplifiziert:

1. Schritt : 94 °C => 3 min.

2. Schritt : 93 °C => 30 sec.

3. Schritt : 64 °C => 30 sec.

4. Schritt : 72 °C => 45 sec.

5. Schritt : 72 °C => 7 min.

6. Schritt : 4 °C => ~

→ Schritte 2, 3 und 4 durchlaufen 35 Zyklen

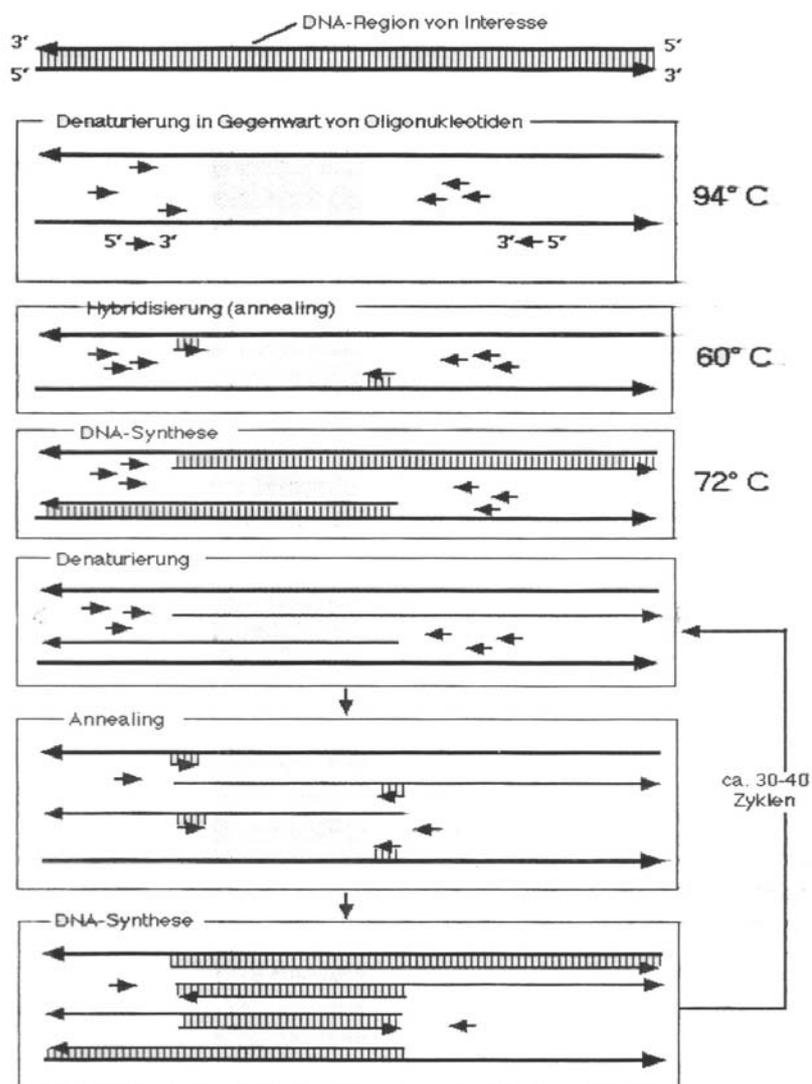
Für den amplifizierte Bereich des *GNB3*-Gens erhält man ein 256 bp großes PCR-Produkt.

Bei der Auswahl der Oligonukleotide sollten folgende Kriterien beachtet werden:

- GC-Gehalt (Guanin-Cytosin) ca. 50 %,

- ideale Länge 18-28 bp, längere Primer müssen HPLC-gereinigt sein,
- palindromische Sequenzen vermeiden,
- Homologien der Primer zueinander vermeiden und
- G oder C am 3'-OH-Ende zur Stabilisierung des in der PCR-Reaktion entstehenden Hybrids, längere GC-Abfolgen jedoch vermeiden

Abb. 6: Ablauf der PCR (schematisch dargestellt)



2.2.3 Restriktionsanalyse

2.2.3.1 Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme schneiden DNA an definierten Stellen, wobei sie eine spezifische Abfolge von Basen erkennen; sie gehören zu den wichtigsten Enzymen für gentechnische Experimente. Es gibt 3 Arten von Restriktionsenzymen (I, II und III).

Heute werden meist Typ-II-Enzyme eingesetzt, die auf sehr einfache Weise wirken. Diese gehören zur Gruppe der Endonucleasen, da sie die DNA nicht von einem Ende her abbauen, sondern innerhalb eines Stranges schneiden. Die exakte Bezeichnung lautet Restriktionsendonucleasen vom Typ II; oft werden sie jedoch einfach Restriktionsenzyme genannt. Der Wert der Restriktionsendonucleasen liegt in ihrer großen Spezifität: jedes Enzym erkennt eine andere DNA-Sequenz, meist von 4 bis 6 Basenpaaren-Länge.

Die Enzymaktivität wird in Einheiten angegeben: Eine Einheit ist die Enzymmenge, die in 1 Stunde bei 37 °C 1 µg DNA verdaut. Bei den meisten Experimenten soll die DNA vollständig geschnitten werden. Das in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Restriktionsenzym *BseDI* (Sec I) erzeugt DNA-Fragmente mit glatten Schnittstellen.

2.2.3.2 Restriktionsansatz

16,8 µl Aqua dest.

3 µl Buffer Y+/ Tango

0,2 µl *BseDI* (Sec I)

→ d.h. es entsteht ein Gesamt-Verdaumix von 20,0 µl pro Ansatz. Auf 2 Teile Verdaumix kommt 1 Teil PCR-Produkt (also 20 µl Verdaumix + 10 µl PCR-Produkt). Nachdem man beide Komponenten zusammenpipettiert hat, verdaut man den Ansatz für 1 ¼ Stunden im Wärmebad bei 56 °C. Anschließend gibt man 5 µl Auftragspuffer in den Ansatz. Danach kann die Gelelektrophorese durchgeführt werden. Zusätzlich zu einer Positivkontrolle (DNA mit bekanntem Genotyp) wurde auch immer eine Wasserkontrolle (Negativkontrolle ohne DNA) mitgeführt, d.h. anstatt eines DNA-Templates wird Wasser in den Reaktionsansatz gegeben.

Hier darf auf dem Gel keine Bande zu sehen sein. Ist dies dennoch der Fall, so spricht dies für eine Kontamination von Reagenzien (vergleiche Abb. 8).

2.2.4 Gelelektrophorese

Mittels Gelelektrophorese werden Nukleinsäurefragmente sichtbar gemacht. Sie basiert darauf, dass Nukleinsäuren bei einem neutralen pH polyanionisch sind, das heißt an ihren Phosphatgruppen im Phosphodiesterückgrat viele negative Ladungen tragen. Deshalb wandern die Moleküle im elektrischen Feld auf die positive Elektrode zu. Man verwendet dafür eine Gelmatrix, die Nukleinsäuremoleküle entsprechend ihrer Größe auftrennt. Abbildung 7 zeigt den typischen Aufbau einer Gelelektrophorese für Nucleinsäuren.

Die Trennschärfe einer Elektrophorese hängt von der Porosität der eingesetzten Matrix ab. Gebräuchlich ist z.B. Agarosegel. Das Trockenpulver, von dem man eine geeignete Konzentration - üblicherweise etwa 0,3 bis 2,5 Prozent (w/v) - benötigt, bringt man in einem Puffer (TBE-Puffer) zum Schmelzen. Es erfolgt die umgehende, luftblasenfreie Überführung des Trenngels in die Gießvorrichtung. Beim Abkühlen geliert die Agarose nach ca. 30 min. In die frisch überschichtete Sammelgelmischung wird zur Formung der Probestaschen ein 25-zähliger Plastikamm gesteckt, welcher nach Aushärtung des Gels entfernt wird. Danach montiert man das fertige Gel in die Gelkammer, wie in Abbildung 7 illustriert wird.

Bei der Elektrophorese trägt man 10 µl der Nukleinsäureproben auf das Gel auf, füllt das System mit Elektrophoresepuffer, legt eine elektrische Spannung an und lässt die Proben durch das Gel laufen, bis ein Farbmarker (in der Regel Bromphenolblau) das Ende des Gels erreicht hat. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA wurde mit einer Spannung von 170 Volt durchgeführt. Nach ca. 1 ½ Stunden hatte die Lauffront das Ende des Gels erreicht, so dass die Elektrophorese beendet werden konnte. Nach der Auftrennung werden die Nukleinsäuren im Gel unter UV-Licht sichtbar gemacht (s. Abb. 8). Anschließend wurde die Größe des PCR-Produktes und die Größe der geschnittenen Fragmente bestimmt.

2.2.5 Computergestützte Datenverwertung

Sämtliche Patientendaten (Diagnose, Erkrankungsdauer, NYHA-Stadium, Alter, Geschlecht, Gewicht, Größe, BMI, Genotyp für *GNB3*, medikamentöse Therapie und Parameter der Herzkatheteruntersuchung) wurden mittels einer Access Datenbank ausgewertet.

2.2.6 Statistik

Soweit nicht gesondert aufgeführt, werden alle Daten als Einzelwerte oder als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Der zweiseitige t-Test diene als Grundlage für Vergleiche zwischen den verschiedenen Gruppen. Die Genotyp-Verteilung zwischen den Gruppen und die Allelfrequenzen wurden mit Hilfe des Chi²-Tests miteinander verglichen. Unterschiede galten bei einem p-Wert $< 0,05$ als statistisch signifikant. Der Chi²-Test wird für den Vergleich qualitativer Merkmale eingesetzt. Er dient zur Analyse, ob die unterschiedlichen Häufigkeiten einer Merkmalsausprägung zufällig sind. Voraussetzung für die Anwendung des Chi²-Tests ist jedoch ein hinreichend großer Stichprobenumfang. Wenn der Stichprobenumfang zu gering ist, so findet der "Fishers exact test" Anwendung.

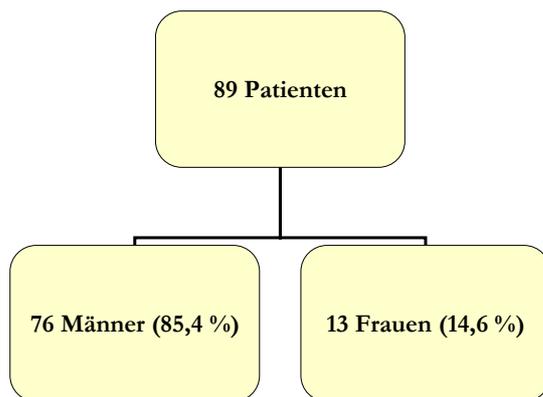
Alle Berechnungen wurden mit dem Computerprogramm "GraphPad Prism TM"-Version 2.0 für Windows (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 89 Herzmuskelpräparate aus explantierten Herzen von Patienten mit Kardiomyopathie genotypisiert. Die Explantation der Herzen fand am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf statt. Die Patienten wurden im Zeitraum von März 2001 bis März 2002 rekrutiert. 76 der 89 Patienten waren männlich und 13 weiblich.

Abb. 9: Patientenkollektiv

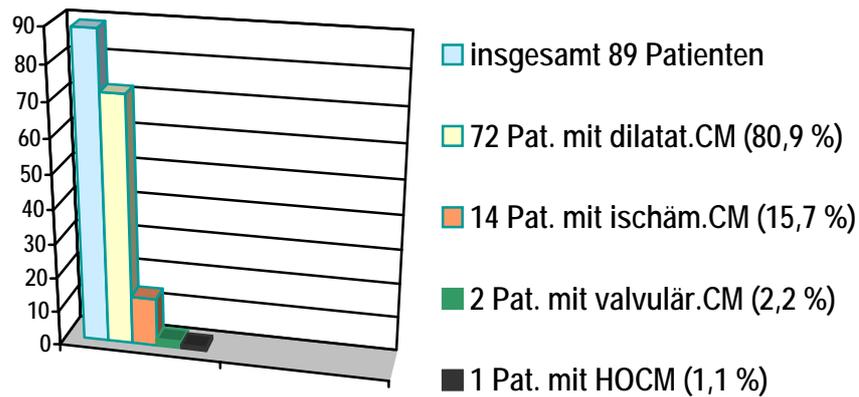


In der folgenden Abbildung sind die wesentlichen Diagnosen unseres Patientenkollektivs dargestellt.

3.2 Verteilung der Diagnosen

Abb. 10: Verteilung der Diagnosen

Anzahl der Patienten



Wie Abbildung 10 zeigt, lag bei den meisten Patienten (ca. 81 %) die Diagnose “dilata-tive Kardiomyopathie” vor, gefolgt von der Diagnose ischämische Kardiomyopathie. Zwei der Patienten waren an einer valvulär bedingten Form der Kardiomyopathie erkrankt. Insgesamt ist die Verteilung in unserem Kollektiv repräsentativ für die Verteilung in der Bevölkerung.

3.3 Geschlechtsabhängigkeit der Diagnosen

In den Abbildungen 11 und 12 sind die Grunddiagnosen geschlechtsabhängig dargestellt. Bei Männern und Frauen waren die Diagnosen gleich verteilt.

Abb. 11: Diagnosen bei Männern

Anzahl der Patienten

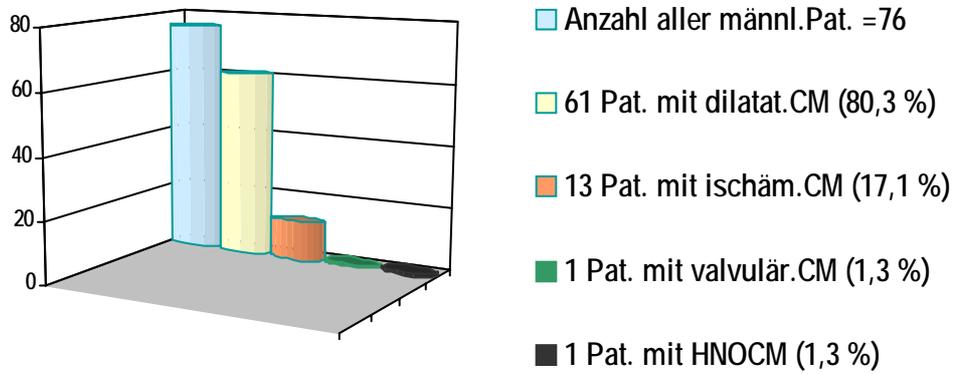
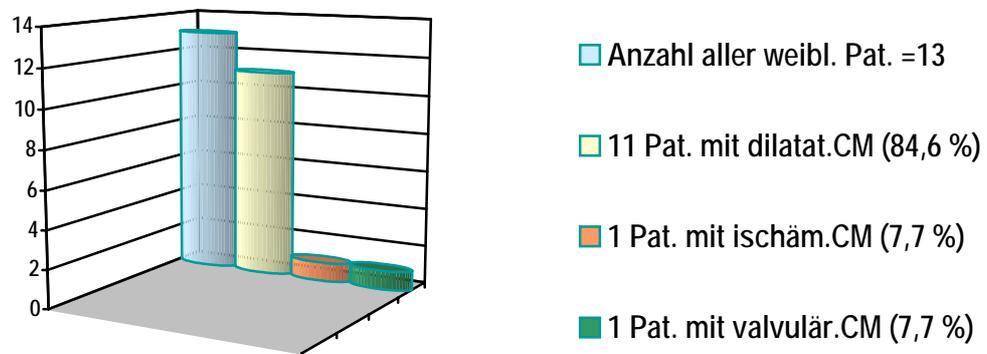


Abb. 12: Diagnosen bei Frauen

Anzahl der Patienten



3.4 Genotyp-Verteilung für *GNB3*

Tabelle 3 fasst die Genotyp-Verteilung unseres Patientenkollektivs zusammen.

Tab. 3: Verteilung des *GNB3*-Genotyps

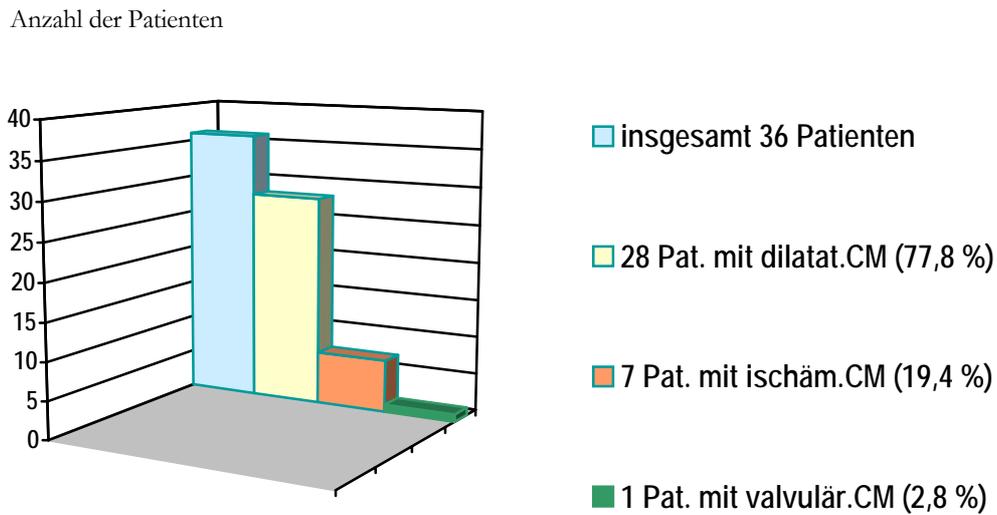
	alle	m	w	%
TT	7	7	0	7,9
TC	46	35	11	51,7
CC	36	34	2	40,5
Σ	89	76	13	100

Mehr als die Hälfte der Patienten (51,7 %) hatten den TC-Genotyp. Darunter waren 35 männlichen und 11 weiblichen Geschlechts. Der CC-Genotyp trat bei 40,5 % der Patienten auf; nur 7,9 % hatten den TT-Genotyp.

3.5 Assoziation zwischen *GNB3*-Genotyp und Diagnosen

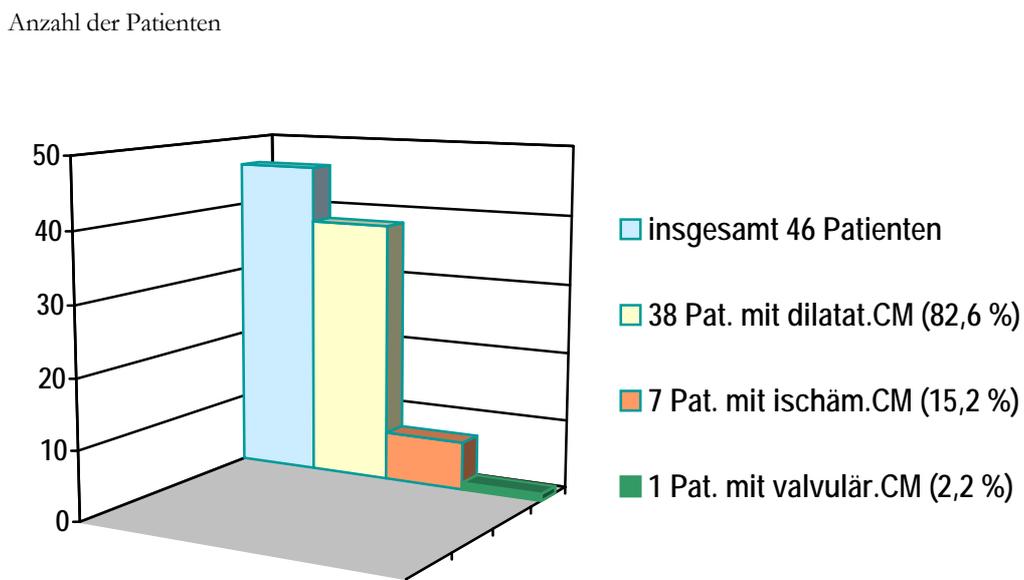
Im nächsten Schritt wurden die *GNB3*-Genotypen mit den unterschiedlichen Kardiomyopathie-Formen korreliert. Die Verteilung der Diagnosen auf den CC-Genotyp ist in Abbildung 13 dargestellt.

Abb. 13: Verteilung der Diagnosen für den CC-Genotyp



Von den insgesamt 36 Patienten mit dem Genotyp CC hatten 28 eine dilatative Form der Kardiomyopathie. Die restlichen Patienten mit Genotyp CC verteilten sich auf die ischämischen und valvulären Kardiomyopathien.

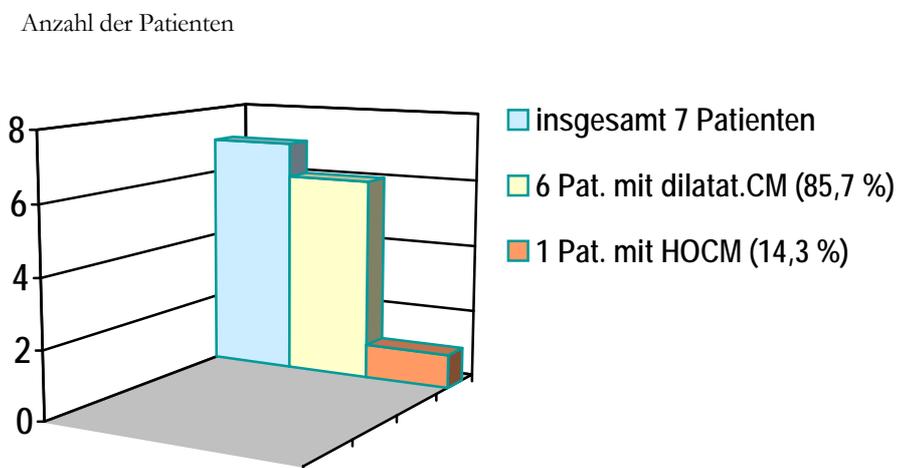
Abb. 14: Verteilung der Diagnosen für den TC-Genotyp



Von den insgesamt 46 Patienten mit Genotyp TC hatten 38 eine DCM. An 2. Stelle kam die ischämische CM mit 7 Patienten. Eine valvuläre CM lag nur bei einem Patienten mit dem TC-Genotyp vor (s. Abb. 14).

Zum Schluss analysierten wir die Verteilung der Diagnosen bei den Patienten mit dem Genotyp TT (s. Abb. 15).

Abb. 15: Verteilung der Diagnosen für den TT-Genotyp



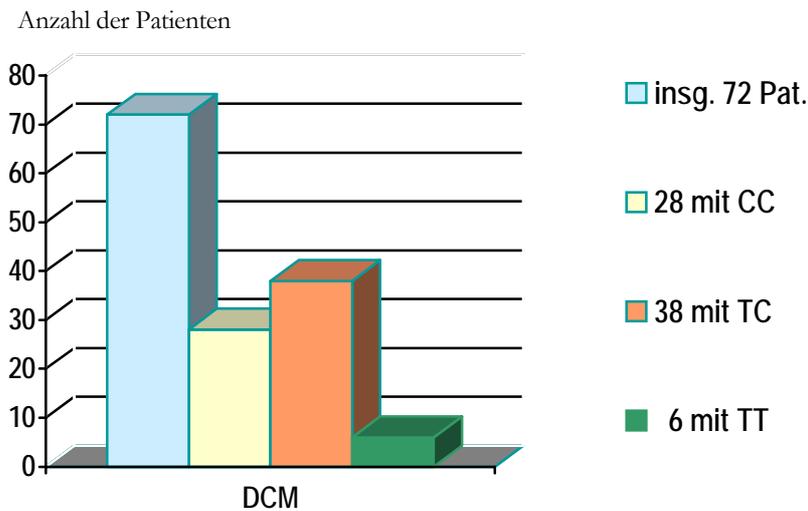
Bei den insgesamt 7 Patienten des Genotyps TT hatten 6 eine dilatative CM und nur einer eine hypertrophe, nicht-obstruktive CM (HOCM).

Im Folgenden wird die Gruppe der dilatativen CM näher betrachtet.

3.6 Verteilung der *GNB3*-Genotypen bei den Patienten mit DCM

Die Verteilung der einzelnen Genotypen auf die DCM zeigt die Abbildung 16.

Abb. 16: Verteilung der *GNB3*-Genotypen bei den Pat. mit DCM



Das Ausgangskollektiv von 89 Patienten reduziert sich nunmehr auf 72 Patienten, die eine dilatative Form der Kardiomyopathie haben. Der Hauptanteil der DCM-Patienten entfällt mit 52,8 % auf den TC-Genotyp. Der Anteil des CC-Genotyps macht 38,9 % aus - der Genotyp TT war bei 6 Patienten (= 8,3 %) vorhanden.

3.7 DCM versus "nicht"- DCM

Nun interessierte uns, wieviele Patienten aus den 3 Gruppen (CC, TC und TT) an einer dilatativen CM erkrankt waren. Bei der Auswertung zeigte sich, dass 77,8 % des CC-Genotyps, 82,6 % des TC- und 85,7 % des TT-Genotyps von einer DCM betroffen waren - d.h. der Genotyp TT war am stärksten betroffen (s. Tab. 4).

Tab. 2: DCM versus "nicht"- DCM

Genotyp	DCM	%	nicht DCM	%
TT	6	8,3	1	5,9
TC	38	52,8	8	47,1
CC	28	38,9	8	47,1
Σ	72	100	17	100
f(T) = 34,7 %	p = 0,18		f(T) = 29,4 %	p = 0,57

3.8 Normalkollektiv für *GNB3*

Tabelle 3 zeigt die Genotypverteilung für ein Normalkollektiv gesunder Blutspender, das im Institut für Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Essen rekrutiert wurde. Die Genotyp-Frequenz für CC beträgt 46,2 %, die für TC 43,7 % und die für TT 10,1 %.

Tab. 5: Normalkollektiv für *GNB3*

Genotyp	Anzahl	Genotyp-Frequenz	Allel	Allel-Frequenz
homozygot-negativ (TT)	28	Q = 10,1 %	q	q = Q + 1/2 H = 31,9 %
heterozygot (TC)	121	H = 43,7 %		
homozygot-positiv (CC)	128	P = 46,2 %	p	p = P + 1/2 H = 68,1 %
Σ	277	P + H + Q = 100 %		p + q = 100 %

3.9 HTX-Proben für *GNB3*

Tabelle 6 zeigt die Genotyp- und Allelfrequenzen der HTX-Proben für *GNB3*. Hier beträgt die Genotyp-Frequenz des CC-Genotyps 40,5 %, die des TC-Genotyps 51,7 % und die des TT-Genotyps 7,9 %.

Tab. 6: HTX-Proben für *GNB3*

Genotyp	Anzahl	Genotyp-Frequenz	Allel	Allel-Frequenz
TT	7	Q = 7,9 %	T	$q = Q + \frac{1}{2} H = 33,7 \%$
TC	46	H = 51,7 %		
CC	36	P = 40,5 %	C	$p = P + \frac{1}{2} H = 66,3 \%$
Σ	89	$P + H + Q = 100 \%$		$p + q = 100 \%$

3.10 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht des Normalkollektivs für *GNB3*

Für das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, welches den Zusammenhang zwischen Allel- und Genotypfrequenzen beschreibt, gilt:

- Genotypfrequenzen einer zufallspaarenden Population sind konstant, solange sich die Allelfrequenzen nicht ändern.
- Konstante Zusammensetzung einer Population wird bereits durch eine einzige Generation Zufallspaarung erreicht.
- Im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht haben die Genotypen AA, Aa und aa die Frequenzen p^2 , $2 pq$ und q^2 .

Voraussetzungen für die Gültigkeit des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts:

- Die Organismen sind diploid.
- Die Organismen pflanzen sich sexuell fort.
- Keine Überlappung von Generationen, keine Mutation, keine Selektion, keine Ein- oder Abwanderung.
- Die Populationsgröße ist unendlich groß (kein genetischer Drift).
- Alle Verpaarungen sind gleich wahrscheinlich (random mating).

Tabelle 7 zeigt die Berechnung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts des Normalkollektivs für *GNB3*. Homozygot positiv (= CC) waren 128 Probanden, heterozygot (= TC) 121 Probanden und homozygot negativ (= TT) 28 Probanden. Das Normalkollektiv bestand somit aus insgesamt 277 Probanden.

Tab. 7: Hardy-Weinberg-Gleichgewicht des Normalkollektivs für *GNB3*

Allel	beobachtet	erwartet	Genotyp
1. Allel	28 (10,1 %)	28,3 (10,2 %)	TT
2. Allel	121 (43,7 %)	120,5 (43,5 %)	TC
3. Allel	128 (46,2 %)	128,3 (46,3 %)	CC

T-Allelfrequenz: 0,3

Pearson. Chi-Quadrat-Stat.: 0,006

p-Wert: 0,9

Somit kann gefolgert werden, dass die Genotypverteilung im Normalkollektiv dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht entspricht.

3.11 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht der HTX-Proben für *GNB3*

Tabelle 8 zeigt die Berechnung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts der HTX-Proben für *GNB3*. In unserem Patientenkollektiv waren 36 homozygot positiv, 46 heterozygot und 7 homozygot negativ. Die Genotyp-Verteilung des *GNB3*-Allels war auch hier im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Tab. 8: Hardy-Weinberg-Gleichgewicht der HTX-Proben für *GNB3*

Allel	beobachtet	erwartet	Genotyp
1. Allel	7 (7,9 %)	10,1 (11,4 %)	TT
2. Allel	46 (51,7 %)	39,8 (44,7 %)	TC
3. Allel	36 (40,4 %)	39,1 (43,9 %)	CC

T-Allelfrequenz: 0,3

Pearson. Chi-Quadrat-Stat.: 2,2

p-Wert: 0,1

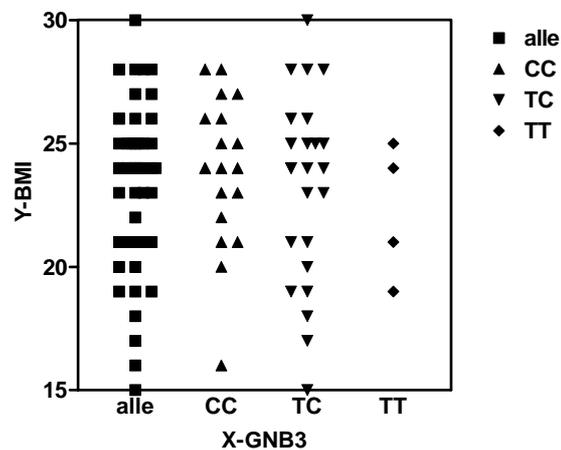
Allerdings beobachtet man gegenüber den erwarteten Werten eine leichte Anreicherung des TC-Genotyps und ein relatives Fehlen des TT-Genotyps.

Zwar befindet sich die Genotypverteilung noch in Übereinstimmung mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, doch lassen sich die Abweichungen möglicherweise im Sinne einer Selektion deuten (siehe Diskussion).

3.12 Korrelation zwischen BMI und *GNB3*-Genotyp

Nachfolgend wurde untersucht, ob weitere klinische Parameter mit Genotypen des *GNB3*-Polymorphismus assoziiert sind. Zunächst wurde ein möglicher Zusammenhang mit dem BMI untersucht (s. Abb. 17).

Abb. 17: Abhängigkeit des BMI vom Genotyp

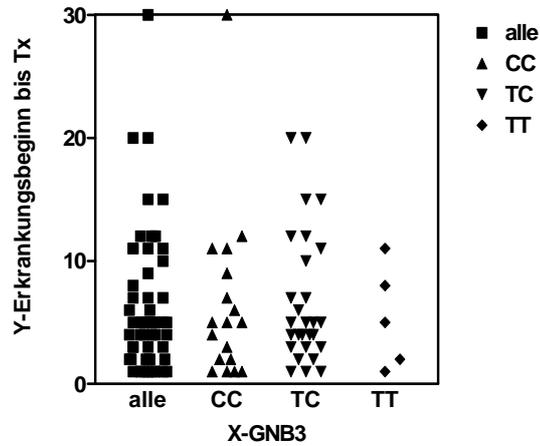


Insgesamt lagen dazu Daten von 47 Patienten vor (4 TT, 24 TC, 19 CC). Die mittleren BMI-Werte (TT: 22,3 kg/ m²; TC: 23,3 kg/ m²; CC: 23,9 kg/ m²) waren nicht signifikant unterschiedlich.

3.13 Abhängigkeit der Krankheitsdauer vom Genotyp

Nachfolgend wurde der Zeitraum von der Diagnosestellung bis zur Herztransplantation mit den Genotypen assoziiert. Der Beobachtungszeitraum des Gesamtkollektivs betrug im Mittel 6,5 Jahre. Bei Patienten mit dem Genotyp CC betrug der Beobachtungszeitraum 6,4 Jahre, bei 28 TC-Patienten 6,8 Jahre. Bei Patienten mit dem Genotyp TT dauerte es im Durchschnitt 5,4 Jahre bis zur Transplantation (s. Abb. 18).

Abb. 18: Abhängigkeit des Beobachtungszeitraums vom Genotyp

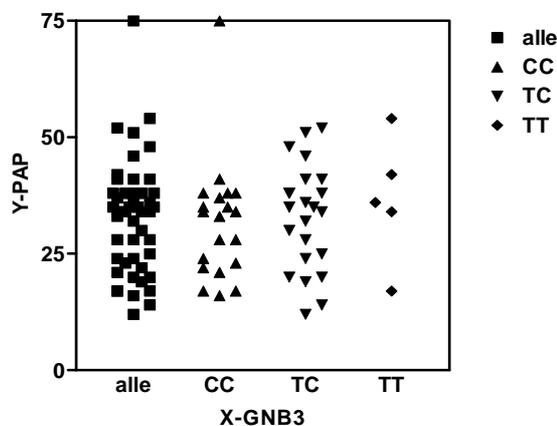


Somit war der mittlere Beobachtungszeitraum bei allen Genotypen weitgehend gleich und es gab keinen Anhalt für eine genotypabhängige, beschleunigte Transplantation.

3.14 Abhängigkeit des Pulmonalarteriendrucks vom Genotyp

Hierzu standen Daten von insgesamt 48 Patienten zur Verfügung. Der mittlere Druck in den Pulmonalarterien aller 48 Patienten betrug 32,8 mmHg. Im Vergleich dazu hatten unsere 20 CC-Patienten im Durchschnitt einen PAP von 31,7 mmHg; die 23 Patienten mit dem Genotyp TC ebenfalls einen von 31,7 mmHg und die 5 Patienten vom Genotyp TT einen von 36,6 mmHg (s. Abb. 19).

Abb. 19: Abhängigkeit des PAP vom Genotyp



Tendenziell zeigten demnach Patienten mit dem TT-Genotyp den höchsten PAP. Die Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant.

3.15 Therapie mit Glykosiden

Im letzten Abschnitt des Kapitels "Ergebnisse" wurde die medikamentöse Therapie der DCM-Patienten analysiert.

Hierbei zeigte sich, dass 72,2 % der insgesamt 36 Patienten mit dem Genotyp CC bis zur HTX Glykoside erhielten. Beim Genotyp TC waren es 67,4 % der 46 Patienten. Die Gruppe mit dem Genotyp TT hingegen wurde häufiger mit Glykosiden therapiert - hier waren es 85,7 % (s. Tab. 9).

Tabelle 9: Therapie mit Glykosiden

Genotyp	ja n/ (%)	nein n/ (%)
TT	6 (85,7 %)	1 (14,3 %)
TC	31 (67,4 %)	15 (32,6 %)
CC	26 (72,2 %)	10 (27,8 %)
Σ	63 (70,8 %)	26 (29,2 %)

3.16 Therapie mit Diuretika

Bei der diuretischen Therapie konnten Daten von insgesamt 36 CC-Patienten ausgewertet werden. Hiervon erhielten 29, d.h. 80,6 % eine Therapie mit Diuretika. Patienten mit dem Genotyp TC wurden zu 84,8 % mit Diuretika behandelt. Interessanterweise haben sämtliche der ausgewerteten Patienten vom Genotyp TT bis zur HTX Diuretika als Dauermedikation gehabt, was die nächste Tabelle zeigt.

Tabelle 10: Therapie mit Diuretika

Genotyp	ja n/ (%)	nein n/ (%)
TT	7 (100 %)	0 (0 %)
TC	39 (84,8 %)	7 (15,2 %)
CC	29 (80,6 %)	7 (19,4 %)
Σ	75 (84,3 %)	14 (15,7 %)

3.17 Therapie mit Amiodaron

Eine antiarrhythmische Therapie mit Amiodaron erfolgte bei 1/3 der Patienten vom Genotyp CC. Der Genotyp TC war zu 28,3 % mit Amiodaron behandelt worden. 4 der 7 TT-Patienten, d.h. 57,1 %, benötigten bis zur Transplantation aufgrund maligner Herzrhythmusstörungen eine Amiodaron-Therapie.

Tabelle 11: Therapie mit Amiodaron

Genotyp	ja n/ (%)	nein n/ (%)
TT	4 (57,1 %)	3 (42,9 %)
TC	13 (28,3 %)	33 (71,7 %)
CC	12 (33,3 %)	24 (66,7 %)
Σ	29 (32,6 %)	60 (67,4 %)

3.18 Therapie mit Ca²⁺-Antagonisten

Abschließend wurde die Medikation mit Ca²⁺-Antagonisten analysiert. Mit Ca²⁺-Blockern waren 22,2 % der Patienten vom Genotyp CC bis zur Herztransplantation therapiert. Die Gruppe mit dem Genotyp TC benötigte zahlenmäßig weniger Ca²⁺-Blocker, hier waren es 15,2 %. Patienten mit dem Genotyp TT hingegen erhielten zu 28,6 % einen Ca²⁺-Antagonisten (s. Tab. 12).

Tabelle 12: Therapie mit Ca²⁺-Antagonisten

Genotyp	ja n/ (%)	nein n/ (%)
TT	2 (28,6 %)	5 (71,4 %)
TC	7 (15,2 %)	39 (84,8 %)
CC	8 (22,2 %)	28 (77,8 %)
Σ	17 (19,1 %)	72 (80,9 %)

4 Diskussion

4.1 Epidemiologie und Ätiologie der DCM

Neben der koronaren Herzerkrankung, der hypertensiven Herzkrankheit und den Herzklappenerkrankungen stellt die dilatative Kardiomyopathie eine der häufigsten Ursachen für Herzinsuffizienz dar.

Die DCM ist von der WHO als eine Herzmuskelerkrankung definiert, die zur Dilatation und eingeschränkten systolischen Funktion des linken Ventrikels oder beider Ventrikel führt. Die jährliche Inzidenz der DCM in westlichen Industriestaaten liegt bei ca. 6-8/100.000 Einwohnern, die Prävalenz beträgt ca. 36/100.000 Einwohner (Osterziel et al., 2001). Obwohl keine genauen epidemiologischen Daten vorliegen, ist anzunehmen, dass die Häufigkeit der DCM in der Bundesrepublik Deutschland ähnlich ist. Die dilatative CM stellt die häufigste Form der Kardiomyopathie dar. Männer sind von der Erkrankung im Verhältnis von fast 3:1 wesentlich häufiger betroffen als Frauen (Felker et al., 2000). Unser Patientenkollektiv bestand zu 85 % aus Männern und zu 15 % aus Frauen.

Die Erstdiagnose wird häufig im mittleren bis höheren Lebensalter gestellt. Klinische Symptome treten erst relativ spät im Verlauf der Erkrankung auf, d.h. häufig erst bei bereits über Monate bis Jahre bestehender linksventrikulärer Dilatation. Nach dem Auftreten klinischer Symptome einer Herzinsuffizienz ist die Prognose der DCM allerdings ernst. Die einzig kausale Therapie besteht derzeit in einer Herztransplantation. Die mittlere Lebenserwartung bei symptomatischen Patienten liegt bei ca. 5 Jahren (Osterziel et al., 2001). Unsere Patienten mussten im Durchschnitt 6,5 Jahre auf ein Spenderherz warten.

Patienten mit einer DCM bilden eine sehr heterogene Gruppe hinsichtlich der vielfältigen Krankheitsursachen einerseits und der diagnostischen Schwierigkeiten, die häufig multifaktorielle Ätiologie zu ermitteln, andererseits.

Untersuchungen zur Ursache der DCM unter Einschluss von Rechts- und Linksherzkatheterisierung, Koronarangiographie und Endomyokardbiopsie zeigen als Enddiagnose in etwa der Hälfte der Fälle von zunächst unerklärlicher DCM eine idiopathische DCM; die andere Hälfte der Enddiagnosen verteilt sich auf ein breites Spektrum primär und sekundär kardialer Erkrankungen, wobei 7-11 % der DCM auf dem Boden einer KHK (= ischämische CM), 2-4 % durch eine hypertensive Herzkrankheit und 1,5 % der DCM durch eine Herzklappenerkrankungen (= valvuläre CM) entstehen. Neben der idiopathischen und der ischämischen Genese wird die Myokarditis (= entzündliche CM) mit 9-12 % als eine der Hauptursachen der DCM angesehen (Felker et al., 2000).

Wenn wir uns nun erneut der Abbildung 10 aus dem Kapitel "Ergebnisse" zuwenden, sehen wir, dass fast 81 % unserer Patienten an einer idiopathischen DCM erkrankt waren. Bei weiteren 15 % war die CM ischämisch bedingt und 2 % der Patienten zeigten eine valvulär bedingte Form der CM. Somit ist unser Patientenkollektiv bezüglich der Ätiologie (Felker et al., 2000) als repräsentativ zu betrachten.

4.2 Genetik der dilatativen CM

Bereits 1961 wurde eine familiäre Häufung der DCM beschrieben. Die erste systematische Analyse von Familienangehörigen wurde jedoch erst 1992 von Michels et al. durchgeführt. Sie konnte zeigen, dass 20 % der untersuchten Patienten mit DCM eine familiäre Form der DCM aufwiesen. In der Mehrzahl der Fälle verläuft der Vererbungsweg autosomal dominant mit inkompletter und altersentsprechender Penetranz. Seltener wird die DCM autosomal rezessiv oder X-chromosomal vererbt. Jüngsten Daten zufolge entfallen auf den autosomal dominanten Modus 56 %, auf den autosomal rezessiven 16 %, auf die X-chromosomale Form 10 %. Sehr selten sind maternal vererbte Formen der DCM durch Mutation der mitochondrialen DNA (Olbrich, 2001).

Die ausgeprägte Variabilität des Krankheitsbildes, die häufig erst nach dem 30. Lebensjahr erkennbare Manifestation der DCM und die kleinen Familien in Europa können in Einzelfällen den Nachweis einer genetisch bedingten DCM sehr erschweren.

In einigen Familien sind Angehörige beschrieben, die zwar die krankheitsverursachende Mutation aufweisen, aber keine DCM entwickelt haben. Man nimmt an, dass in diesen Fällen protektive modifizierende Faktoren die Entwicklung der DCM verhindert haben. Diese sog. verminderte Penetranz erschwert die klinische Einordnung von Familienangehörigen und somit auch die wissenschaftliche Untersuchung von Krankheitsgenen. Selbst innerhalb einer Familie gibt es eine sehr große Schwankungsbreite in Bezug auf Manifestationsalter, Schweregrad und Verlauf der Erkrankung.

Bisher wurden 24 Gene beschrieben, die einer dilatativen Kardiomyopathie zugrunde liegen können. Ein systematisches Screening aller bekannten Gene würde nur etwa 20 % der Fälle aufklären und ist derzeit noch zu aufwendig. Es ist zu hoffen, dass weitere Gene identifiziert und effizientere Screeningmethoden entwickelt werden (Osterziel, K.J. et al., 2005). Bei der autosomal-dominant vererbten DCM, die sich klinisch oft nicht von einer idiopathischen DCM unterscheiden lässt, werden Mutationen in zahlreichen weiteren und noch unbekannt Genen vermutet.

Abgeleitet von der Funktion der betroffenen Proteine (s. Tab. 2) kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die familiäre DCM entweder durch eine verminderte Produktion oder Transmission der kontraktilen Kraft bedingt ist (Osterziel, K.J. et al., 2001). Das Lamin A/ C-Gen z.B. ist ein relativ häufiges Gen für familiäre DCM und für ca. 8 % der familiären DCM verantwortlich. Es wird angenommen, dass die Mutationen in Lamin A/ C zu einer mechanischen Instabilität des Zellkerns, einer Verklumpung des Chromatins und einer Veränderung der Transkription (\rightarrow *GNB3*) führen. Ferner gibt es Krankheitsgene, die im Bereich von Ionenkanälen zur Störungen des Calciumstoffwechsels führen.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit hatten zum Ziel, neue Erkenntnisse zur genetischen Prädisposition für die dilatative Kardiomyopathie zu erhalten. Wir untersuchten 89 Patienten mit Kardiomyopathie auf ihren Genotyp für *GNB3* und wollten klären, ob dieses Gen für eine dilatative CM mit nachfolgender Herztransplantation prädisponiert.

4.3 Zusammenhang zwischen Genotyp und DCM

Aus der Abbildung 16 geht hervor, dass 28 unserer 36 CC-Patienten, also 77,8 %, an einer DCM erkrankt waren. Patienten mit dem Genotyp TC waren mit 82,6 % (38 von 46 Patienten) häufiger von der DCM betroffen. Der Genotyp TT war zu 85,7 % an einer dilatativen CM erkrankt. Hier hatten 6 der insgesamt 7 Patienten die Diagnose einer DCM.

Es ist naheliegend zu vermuten, dass das Risiko für eine DCM beim Genotyp TT leicht erhöht ist im Vergleich zu den Genotypen CC und TC. Ein Vergleich mit gesunden Kontrollproben ergab jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der Genotypverteilung.

4.4 Korrelation BMI - Genotyp

Abbildung 17 zeigt das Verhältnis zwischen BMI und Genotyp. Insgesamt konnten Angaben von 47 Patienten ausgewertet werden. Sie zeigten einen durchschnittlichen BMI von 23,4 kg/ m². Im Einzelnen zeigte sich folgendes Bild: Patienten mit dem Genotyp CC (19 Patienten) hatten einen BMI von 23,9 kg/ m²; für die TC-Gruppe (24 Patienten) berechneten wir einen BMI von 23,3 kg/ m² und unsere 4 TT-Patienten kamen auf einen BMI von 22,3 kg/ m².

Man könnte aus diesen Zahlen schlussfolgern, dass unsere TT-Patienten sich in einem schlechteren körperlichen Zustand befanden als die beiden anderen Gruppen. Jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant. Außerdem sind zwei weitere Punkte zu diskutieren: Zum einen hatten wir für die Berechnung des BMI der TT-Gruppe nur 4 Patienten zur Verfügung. Ferner befinden sich Patienten mit einer chronischen Herzerkrankung bzw. Herzinsuffizienz naturgemäß in einer schlechten körperlichen Verfassung.

4.5 Korrelation Krankheitsdauer - Genotyp

Für die Berechnung der Krankheitsdauer standen uns Angaben von insgesamt 51 Patienten zur Verfügung. Die Krankheitsdauer aller Patienten betrug im Durchschnitt 6,5 Jahre, d.h. nach 6,5 Jahren wurde eine HTX durchgeführt. Die 18 CC-Patienten

überlebten im Schnitt 6,4 Jahre bis zur Transplantation. Die Gruppe mit dem Genotyp TC (28 Patienten) kam auf 6,8 Jahre, wohingegen die 5 TT-Patienten bereits nach 5,4 Jahren transplantiert wurden.

Es ist naheliegend zu vermuten, dass die DCM bei der TT-Gruppe im Vergleich zu der Gruppe der CC- und TC-Patienten schneller progredient war. Es kam bei den TT-Patienten früher zur Durchführung der HTX; die medikamentös-konservative Therapie war bei ihnen schneller ausgereizt. Aber auch hier waren die Unterschiede statistisch nicht signifikant.

4.6 Korrelation PAP - Genotyp

Der mittlere Pulmonalarteriendruck beträgt in der Regel < 20 mmHg. Von einer pulmonalen Hypertonie spricht man ab Werten von > 20 mmHg. Die insgesamt 48 ausgewerteten Patienten hatten einen mittleren PAP von 32,8 mmHg. Die Gruppe der CC-Patienten, die aus 20 Patienten bestand, erreichte einen PAP von 31,7 mmHg. Die TC-Gruppe, die 23 Patienten zählte, kam auf einen durchschnittlichen PAP von 32,9 mmHg. Die wenigen TT-Patienten (insgesamt 5) zeigten einen PAP von 36,6 mmHg.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass alle 3 Gruppen eine leichtgradige pulmonale Hypertonie aufwiesen, wobei diese bei den TT-Patienten tendenziell am stärksten ausgeprägt war. Eine statistische Signifikanz wurde nicht erreicht. Auch hier stellt sich die Frage, ob der Genotyp TT mit einer stärkeren pulmonalen Hypertonie einhergeht. Bei Patienten mit dem Genotyp TT scheinen Zeichen der Rechtsherzbelastung ausgeprägter zu sein als bei Patienten mit dem Genotyp CC oder TC.

4.7 Korrelation Glykoside - Genotyp

Herzglykoside sind die klassischen oral wirksamen, positiv inotropen Substanzen. Sie finden immer noch breite Anwendung bei der Therapie der Herzinsuffizienz (Hopf et al., 1990). Eine Glykosid-Therapie mit Digitalis erhielten 26 der insgesamt 36 Patienten mit dem Genotyp CC. Die restlichen 10 Patienten hatten in ihrem Therapie-Regime keine Glykoside. Somit kamen die CC-Patienten auf einen prozentualen Wert von 72,2 %. Beim Genotyp TC existierten 46 Patientendaten zur Auswertung, wobei 31 von ihnen

(also 67,4 %) Glykoside in ihrer Medikation hatten und 15 (32,6 %) nicht. Die Gruppe der TT-Patienten wiederum war diejenige Gruppe, die am häufigsten mit Glykosiden behandelt wurde. Hier bekamen 6 der insgesamt 7 Patienten, also 85,7 % die o.g. Therapie.

Somit scheint der Genotyp TT mit einer nach der NHYA-Klassifikation stärker ausgeprägten bzw. schneller dekompenzierenden Herzinsuffizienz einherzugehen als die anderen Genotypen. Auch hier war das Ergebnis statistisch nicht signifikant.

4.8 Korrelation Diuretika - Genotyp

Diuretika gehören zu den wichtigsten Medikamenten in der Therapie der chronischen Herzinsuffizienz. Sie bewirken eine Volumenentlastung, die sich günstig auf die Hämodynamik auswirkt (Hopf et al., 1990).

Bei unserem Patientenkollektiv haben 80,6 % (29 Patienten von insgesamt 36) der CC-Patienten Diuretika erhalten. Die Gruppe der TC-Patienten hat zu 84,8 % eine diuretische Therapie bekommen. Bemerkenswert die Tatsache, dass alle 7 TT-Patienten mit Diuretika behandelt wurden. Dies lässt die Hypothese zu, dass die TT-Gruppe häufiger kardial-bedingte Ödeme ausbilden als die CC- bzw. die TC-Gruppe, die mit Diuretika ausgeschwemmt werden.

4.9 Korrelation Antiarrhythmika - Genotyp

Nahezu alle Kardiomyopathie-Patienten haben supraventrikuläre und insbesondere auch ventrikuläre Herzrhythmusstörungen.

Je geschädigter der linke Ventrikel, je stärker seine Auswurfraction also reduziert ist, umso mehr ist ein Patient durch Rhythmusstörungen bedroht (Hoffmann et al., 2000).

Tabelle 11 hatte gezeigt, dass jeder 3. CC-Patient antiarrhythmisch behandelt worden war. Patienten mit dem Genotyp TC wurden nur zu 28,3 % zusätzlich antiarrhythmisch eingestellt. Die TT-Gruppe hingegen erhielt zu 57,1 % eine antiarrhythmische Therapie mit Amiodaron. Möglicherweise muss man bei dem Genotyp TT häufiger mit dem Auftreten maligner Herzrhythmusstörungen rechnen als bei den anderen Genotypen.

4.10 Korrelation Kalziumantagonisten - Genotyp

Kalziumionen sind wesentlich an der Erregung und Kontraktilität der Herzmuskelfasern beteiligt. Kalziumantagonisten, chemisch heterogene Substanzen, verringern dosisabhängig den Ca^{2+} -Einstrom in die Herzmuskelfasern. Die kardiale Wirksamkeit der Ca^{2+} -Antagonisten wird insbesondere auf drei Mechanismen zurückgeführt:

1. Reduktion des myokardialen Sauerstoffverbrauchs.
2. Blutdrucksenkung aufgrund einer peripheren Vasodilatation und
3. Verbesserung des O_2 -Angebots an das Myokard durch Dilatation epikardialer Kranzgefäße (Hopf et al., 1990).

Wie Tabelle 12 bereits gezeigt hatte, wurden von den 36 CC-Patienten nur 8 mit Ca^{2+} -Blockern behandelt. Das entspricht 22,2 %. Im Vergleich hierzu erhielten 15,2 % der TC-Gruppe eine Therapie mit der o.g. Substanz. Die Gruppe der TT-Patienten wurde zu 28,6 % mit Ca^{2+} -Antagonisten behandelt. Der p-Wert lieferte uns in diesem Fall einen Wert von 0,7. Somit war auch dieses Ergebnis statistisch nicht signifikant. Man kann vermuten, dass Patienten mit dem Genotyp TT einen höheren Bedarf an Nachlastsenkung haben als andere; vielleicht gibt es in dieser Gruppe mehr Patienten mit einer manifesten KHK.

4.11 Studienlimitation

Als Studienlimitation dieser Arbeit sind folgende Punkte zu diskutieren:

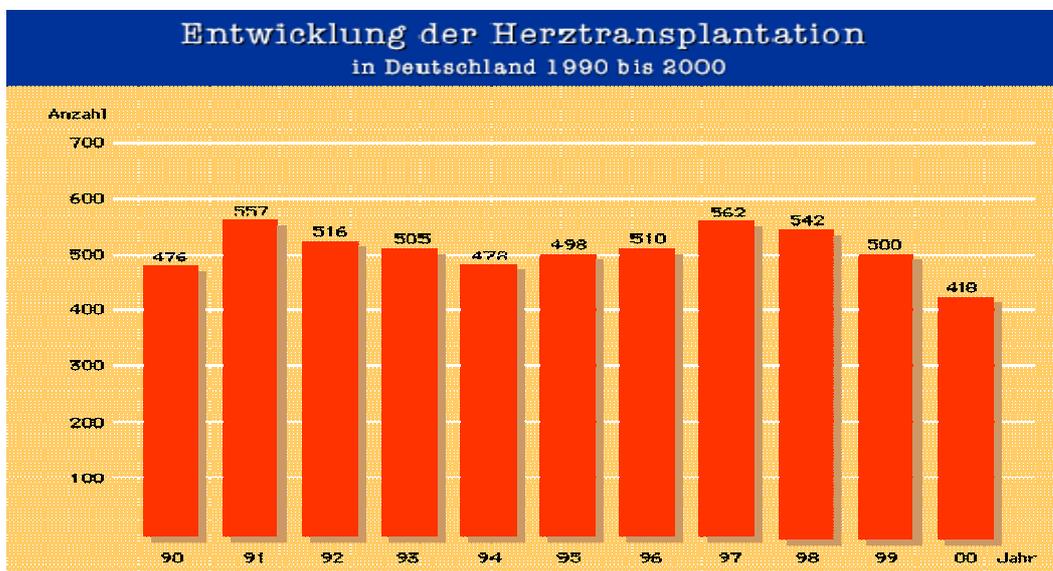
1. Ein Unterschied oder Zusammenhang zwischen dem *GNB3* C825T-Polymorphismus und der dilatativen Kardiomyopathie konnte nicht gefunden werden. Zu klären gilt, ob eine genetische Variation am *GNB3*-Gen überhaupt die phänotypische Manifestation starker CMD-Genmutationen modifizieren kann. Üblicherweise würde man dafür eine genetisch homogene Patientengruppe untersuchen, d.h. nur Patienten mit derselben Mutation im selben CMD-Gen.

2. Des Weiteren standen für die vorliegende Arbeit Daten eines kleinen Patientenkollektivs (89 Patienten) zur Verfügung. Mit Sicherheit sind in Zukunft Studien mit größeren Patientenzahlen möglich.

3. Ein weiterer Faktor ist die niedrige Frequenz des TT-Genotyps. Der Genotyp TT ist, wie uns Tabelle 3 gezeigt hatte, selten. Das TT-Allel wird in 10,1 % beobachtet, die Allelfrequenz $f(T)$ beträgt 0,32.

4. Hinzu kommt die geringe Anzahl von Herztransplantationen in Deutschland. Zwar wurden im Jahre 2000 418 Herzen in Deutschland transplantiert (s. Abb. 22), jedoch gibt es eine Vielzahl von Erkrankungen, die eine Herztransplantation notwendig machen. In der vorliegenden Arbeit waren es insgesamt nur 72 Patienten, die aufgrund einer DCM transplantiert werden mussten.

Abb. 22: Entwicklung der HTX in Deutschland



4.12: Ausblick

Die dilatative CM weist trotz Erweiterung der medikamentösen Therapiestrategien eine schlechte Prognose mit einer nach neuerer Studie jährlichen Mortalität von ca. 15 % infolge plötzlichen Herztodes oder einer therapeutisch nicht beherrschbaren, progredienten Herzinsuffizienz auf.

Die Überlebenskurve der DCM zeigt in den meisten Untersuchungen einen exponentiellen Verlauf mit einer hohen anfänglichen Sterblichkeit in den ersten 2-3 Jahren und einer nach 5 Jahren günstigen Langzeitprognose. Der klinische Verlauf der ätiologisch heterogenen dilatativen CM ist interindividuell hochvariabel. Die chronische

Herzinsuffizienz stellt aufgrund ihrer ungünstigen Prognose häufig eine Indikation zur Herztransplantation dar (Schannwell et al., 2001).

Die Kenntnis der Krankheitsursachen und ein besseres Verständnis der Pathophysiologie ist allerdings Voraussetzung für die Entwicklung neuer spezifischer diagnostischer und therapeutischer Maßnahmen. Darüber hinaus ist zu hoffen, dass in Zukunft neue auf der Kenntnis der ursächlichen Gendefekte basierende Therapien die Symptomatik und die schlechte Prognose der DCM signifikant verbessern werden.

5 Zusammenfassung

1998 konnten Siffert et al. einen C825T-Polymorphismus im Gen *GNB3* nachweisen, das für die *GNB3*-Untereinheit heterotrimerer G-Proteine kodiert. Das 825T-Allel verursacht ein alternatives Spleißen des Gens und die Expression einer funktionell aktiven Deletionsvariante von *GNB3*, welche als Gβ3s bezeichnet wird. Das 825T-Allel ist mit einem erhöhten Risiko für arterielle Hypertonie bei Weißen assoziiert, vermutlich mit der sogenannten Form der "low-Renin-hypertension", und es akkumuliert besonders bei Hypertonikern mit positiver Familienanamnese. Dabei scheint diese Abnormalität ferner mit einer peripheren Insulinresistenz, einem erhöhten Body-Mass-Index, einer Linksherzhypertrophie, einer gesteigerten Nephropathieneigung bei Typ-1-Diabetes, einer verstärkten Chemotaxis neutrophiler Granulozyten und einer veränderten Kaliumkanal-Aktivität im Vorhof zu korrelieren.

Die dilatative Kardiomyopathie stellt die häufigste Form der Kardiomyopathien dar. Für einen nicht unerheblichen Teil wird mittlerweile eine erbliche Genese angenommen. Die einzige kausale Therapie besteht derzeit in einer Herztransplantation. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Klärung der Frage, ob eine genetische Disposition - im Hinblick auf den oben genannten Polymorphismus - für eine dilatative Kardiomyopathie mit nachfolgender Herztransplantation besteht. Wir extrahierten hierfür DNA aus insgesamt 89 explantierten Herzen von Patienten mit Kardiomyopathie und amplifizierten *GNB3*-spezifische Abschnitte mittels PCR. Das PCR-Produkt wurde mittels Restriktionsanalyse auf den Genotyp hin überprüft. Durch die im Anschluss durchgeführte Gelelektrophorese konnten wir anhand der Bandenmuster den Genotyp der Patienten für *GNB3* identifizieren. Diese Daten wurden zum Schluss in eine Access Datenbank eingegeben und statistisch ausgewertet. Wir kamen zu folgenden Ergebnissen: Patienten mit dem TT-Genotyp waren im Vergleich zu normalen C825-Allelträgern tendenziell häufiger von einer dilatativen Kardiomyopathie betroffen, hatten ein schnelleres Fortschreiten der Erkrankung, einen höheren Pulmonalarteriendruck und einen häufigeren Bedarf an Glykosiden, Diuretika, Antiarrhythmika und Kalzium-Antagonisten. Diese Ergebnisse waren statistisch jedoch nicht signifikant.

Als Gründe für das Nichterreichen der statistischen Signifikanz sind folgende Punkte zu nennen, die unsere Studie limitierten: 1. das zu kleine Kollektiv von 89 Patienten. 2. die niedrige Frequenz des TT-Genotyps und 3. die geringe Zahl von Herztransplantationen (im Jahr 2000 nur 418 Herzen).

6 Literaturverzeichnis

1. Adams, J.W., Sakata, Y., Davis, M.G., Sah, V.P., Wang, Y., Liggett, S.B., Chien, K.R., Brown, J.H., Dorn, G.W. (1998):

Enhanced $G\alpha_q$ signaling: A common pathway mediates cardiac hypertrophy and apoptotic heart failure.

PNAS 95 (17), 10140-10145

2. Arbustini, E., Morbini, P., Pilotto, A., Gavazzi, A., Tavazzi, L. (2000):

Genetik der idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie.

Herz 25, 156-160

3. Baig, M.K., Goldman, J.H., Caforio, A.L.P., Coonar, A.S., Keeling, P.J., McKenna, W.J. (1998):

Familial dilated cardiomyopathy: Abnormalities are common in asymptomatic relatives and may represent early disease.

J. Am. Coll. Cardiol. 31, 195-201

4. Burkett, E.L., Hershberger, R.E. (2005):

Clinical and genetic issues in familial dilated cardiomyopathy.

J. Am. Coll. Cardiol. 45, 969-981

5. Busch, S., Burckhardt, B.-C., Siffert, W. (1995):

Expression of the human sodium-proton exchanger NHE-1 in *Xenopus laevis* oocytes enhances sodium-lithium countertransport.

Pflügers Arch. 429, 859-869

6. Canessa, M., Morgan, K., Goldszer, R., Moore, T.J., Spalvins, A. (1991):

Kinetic abnormalities of the red blood cell sodium-proton exchange in hypertensive patients.

Hypertension 17, 340-344

7. Dobrev, D., Wettwer, E., Himmel, H.M., Kortner, A., Kuhlisch, E., Schüler, S., Siffert, W., Ravens, U. (2000):

G-protein β_3 subunit 825T allele is associated with enhanced human atrial inward rectifier potassium currents.

Circulation 102, 692-697

8. Felker, GM., Thompson, RE., Hare, JM., Hruban, RH., Clemetson, DE., Howard, DL., Baughman, KL., Kasper, EK. (2000):

Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy.

N. Engl. J. Med. 342 (15), 1077-1084

9. Gibbons, G.H., Pratt, V.J. (1992):

Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia: autocrine transforming growth factor- β_1 expression determines growth response to angiotensin 2.

J. Clin. Invest. 90, 456-461

10. Grusko, S., Ihrke, R., Stolper, S., Kraatz, G., Siffert, W. (1997):

Prevalence of increased intracellular signal transduction in immortalized lymphoblasts from patients with essential hypertension and normotensive subjects.

J. Hypertension 15, No.1, 29-33

11. Gutersohn, A., Naber, C., Müller, N., Erbel, R., Siffert, W. (2000):

G-protein β_3 subunit 825 TT genotype and post-pregnancy weight retention.

The Lancet Vol. 355, 1240-1241

12. Hocher, B., Slowinski, T., Stolze, T., Pleschka, A., Neumayer, H.-N., Halle, H. (2000):

Association of maternal G protein $\beta 3$ subunit 825T allele with low birthweight.

The Lancet Vol. 355, 1241-1242

13. Hoffmann, J., Grimm, W., Menz, V., Maisch, B. (2000):

Zusammenhang zwischen kardialer autonomer Aktivität und linksventrikulärer Funktionseinschränkung bei dilatativer Kardiomyopathie.

Z. Kardiol. 89, 84-92

14. Hopf, R., Kunkel, B., Sievert, H. (1990):

Kardiomyopathien - Klinik, Diagnostik, Therapie.

Hoechst, Reihe Herz - Kreislauf, 1-111

15. Hunter, J.J., Chien, K.R. (1999):

Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure.

N. Engl. J. Med. Vol. 341, Nr.17, 1276-1283

16. Latif, N., Taylor, P.M., Khan, M.A., Yacoub, M.H., Dunn, M.J. (1999):

The expression of heat shock protein 60 in patients with dilated cardiomyopathy.

Basic Res. Cardiol. 94, 112-119

17. Lifton, R.P., Hunt, S.C., Williams, R.R., Pouyssegur, J., Lalouel, J.-M. (1991):

Exclusion of the Na^+/H^+ -Antiporter as a candidate gene in human essential hypertension.

Hypertension 17, 8-14

18. Lindemann, M., Virchow, S., Ramann, F., Barsegian, V., Kreufelder, E., Siffert, W., Müller, N., Grosse-Wilde, H. (2001):

The G-protein $\beta 3$ subunit 825T allele is a genetic marker for enhanced T cell response.

FEBS Letters 495, 82-86

19. Mahon, N.G., Murphy, R.T., MacRae, C.A., Caforio, A.L.P., Elliott, P.M., McKenna, W.J. (2005):

Echocardiographic evaluation in asymptomatic relatives of patients with dilated cardiomyopathy reveals preclinical disease.

Ann Intern Med. 143, 108-115

20. Mestroni, L., Maisch, B., McKenna, W.J., Schwartz, K., Charron, P., Rocco, C., Tesson, F., Richter, A., Wilke, A., Komajda, M. (1999):

Guidelines for the study of familial dilated cardiomyopathies.

European Heart Journal 20, 93-102

21. Mestroni, L., Rocco, C., Gregori, D., Di Lenarda, A., Miocic, F., Caforio, A.L., McKenna, W.J., Falaschi, A., Giacca, M., Camerini, T. (1999):

Familial dilated cardiomyopathy: evidence for genetic and phenotypic heterogeneity.

J. Am. Coll. Cardiol. 34, 181-190

22. Michels, V.V., Moll, P.P., Miller, F.A., Tajik, J., Chu, J.S., Driscoll, D.J., Burnett, J.C., Rodeheffer, R.J., Chesebro, J.H., Tazelaar, H. (1992):

The frequency of familial dilated cardiomyopathy in a series of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy.

N. Engl. J. Med. 326, 77-82

23. Monserrat, L., Hermida, M., Bouzas, B., Mosquera, I., Mahon, N., Peteiro, J., Alvarez, N., Penas-Lado, M., Crespo, M., Castro-Beiras, A. (2002):

Familial dilated cardiomyopathy in patients transplanted for idiopathic dilated cardiomyopathy.

Rev. Esp. Cardiol. 55, 725-732

24. Motulsky, H. (1999):

Analyzing data with GraphPad Prism.

GraphPad Software, Inc., 2-62

25. Offermanns, S. (2001):

Der Gq/ G₁₁-vermittelte zelluläre Signalweg und seine Bedeutung für kardiale Erkrankungen.

Z. Kardiol. 90, 601-606

26. Olbrich, H.-G. (2001):

Epidemiologie - Ätiologie der dilatativen Kardiomyopathie.

Z. Kardiol. 90, Suppl. 1, I/2-I/9

27. Osterziel, K.J., Haßfeld, S., Geier, C., Perrot, A. (2005):

Familiäre dilatative Kardiomyopathie.

Herz 30, 529-534

28. Osterziel, K.J., Scheffold, T., Perrot, A., Dietz, R. (2001):

Genetik der dilatativen Kardiomyopathie.

Z. Kardiol. 90, 461-469

29. Pietruck, F., Moritz, A., Montemurro, M. (1996):

Selectively enhanced cellular signaling by Gi proteins in essential hypertension. G α i2, G α i3, G β 1, G β 2 are not mutated.

Circ. Res. 79, 974-983

30. Qiagen GmbH Germany (1999):

QIAamp DNA mini kit and QIAamp DNA blood mini kit handbook.

Qiagen handbook, 28-31

31. Rosskopf, D., Düsing, R., Siffert, W. (1993):

Membrane sodium-proton exchange and primary hypertension.

Hypertension 21, 607-617

32. Rosskopf, D., Frömter, E., Siffert, W. (1993):

Hypertensive sodium-proton exchanger phenotype persists in immortalized lymphoblasts from essential hypertensive patients - a cell culture model for human hypertension.

J. Clin. Investigation 92, 2553-2559

33. Sack, S. (1996):

Genetik bei Kardiomyopathie und Hypertonie.

Ärzteblatt 93, A, 532-536

34. Schannwell, C.M., Schoebel, F.C., Marx, R., Plehn, G., Leschke, M., Strauer, B.E. (2001):

Prognostische Relevanz linksventrikulärer diastolischer Funktionsparameter bei dilatativer Kardiomyopathie.

Z. Kardiol. 90, 269-279

35. Schäfers, R.F., Nürnberger, J., Siffert, W., Wenzel, R.R., Philipp, T., Michel, M.C. (1998):

Haemodynamic characterisation of healthy subjects carrying the 825T allele of the G protein β_3 subunit.

Arch. Pharmacol. 358: R650

36. Schoppet, M., Maisch, B. (2001):

Alcohol and the heart.

Herz 26, Nr. 5, 345-352

37. Schunkert, H., Hense, H.-W., Döring, A., Riegger, G.A.J., Siffert, W. (1998):

Association between a polymorphism in the G-protein β_3 subunit gene and lower Renin and elevated diastolic blood pressure levels.

Hypertension 32, 510-513

38. Semplicini, A., Siffert, W., Sartori, M., Monari, A., Naber, C., Frigo, G., Santonastaso, M., Cozzutti, E., Winnicki, M., Palatini, P. (2001):

G-protein $\beta 3$ subunit gene 825T allele is associated with increased left ventricular mass in young subjects with mild hypertension.

AJH 14, 1191-1195

39. Siffert, W. (1995):

Hypertonie in Zellkultur.

Physiologie (Forschung/ Lehre/ Öffentlichkeit) 5, 14-20

40. Siffert, W. (1998):

G proteins and hypertension: An alternative candidate gene approach.

Kidney Internat. Vol. 53, 1466-1470

41. Siffert, W. (2000):

G-protein $\beta 3$ subunit 825T allele, hypertension, obesity and diabetic nephropathy.

Nephrol. Dial. Transplant. 15, 1298-1306

42. Siffert, W. (2001):

Molecular genetics of G-proteins and atherosclerosis risk.

Basic Res. Cardiol. 96, 606-611

43. Siffert, W., Düsing, R. (1995):

Sodium-proton exchange and primary hypertension; an update.

Hypertension 26 Nr. 4, 649-654

44. Siffert, W., Düsing, R. (1996):

Na^+ / H^+ -exchange in hypertension and in diabetes mellitus - facts and hypothesis.

Basic. Res. Cardiol. 1996, 91(3), 179-190

45. Siffert, W., Forster, P., Jöckel, K.-H., Mvere, D.A., Brinkmann, B., Naber, C., Crookes, R., Heyns, A. du P., Epplen, J.T., Fridley, J., Freedman, B., Müller, N., Stolke, D., Sharma, A., Mouttaery, K., Grosse-Wilde, H., Buerbaum, B., Ehrlich, T., Ahmad, H., Horsthemke, B., Du Toit, E., Tilikainen, A., Ge, J., Wang, Y., Yang, D., Hüsing, J., Rosskopf, D. (1999):

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. 10, 1921-1930

46. Siffert, W., Naber, C., Walla, M., Ritz, E. (1999):

G-protein $\beta 3$ subunit 825T allele and its potential association with obesity in hypertensive individuals.

Journal of Hypertension Nr. 17, 1095-1098

47. Siffert, W., Rosskopf, D., Erbel, R. (2000):

Genetischer Polymorphismus in der G-Protein-3-Untereinheit, Adipositas und essentielle Hypertonie.

Herz 25, 26-33

48. Siffert, W., Rosskopf, D., Moritz, A., Wieland, T., Kaldenberg-Stasch, S., Kettler, N., Hartung, K., Beckmann, S., Jakobs, K.H. (1995):

Enhanced G-protein activation in immortalized lymphoblasts from patients with essential hypertension.

J. Clin. Investigation 96, 759-766

49. Siffert, W., Rosskopf, D., Siffert, G., Busch, S., Moriz, A., Erbel, R., Sharma, A.M., Ritz, E., Wichmann, H.-E., Jakobs, K.H., Horsthemke, B. (1998):

Association of a human G-protein $\beta 3$ subunit variant with hypertension.

Nature genetics Vol. 18, 45-48

50. Suryaprabha, P., Padma, T., Brahmaji Rao, U. (1984):

Increased IgG levels in essential hypertension.

Immunol. Lett. 8, 143-145

51. Virchow, S., Ansorge, N., Rosskopf, D., Rübber, H., Siffert, W. (1999):

The G-protein β_3 subunit splice variant G β_3 -s causes enhanced chemotaxis of human neutrophils in response to interleukin-8.

Arch. Pharmacol. 360, 27-32

52. Wascher, T.C., Paulweber, B., Malairmare, L., Stadlmayr, A., Iglseder, B., Schmoelzer, I., Renner, W. (2003):

Association of a human G-protein β_3 subunit dimorphism with insulin resistance and carotid atherosclerosis.

Stroke 34 (3), 605-609

53. Wettschureck, N., Rütten, H., Zywiets, A., Gehring, D., Wilkie, T.M., Chen, J., Kenneth, R., Offermanns, S. (2001):

Absence of pressure overload induced myocardial hypertrophy after conditional inactivation of *Gaq/ G α_{11}* in cardiomyocytes.

Nature Medicine Vol. 7, Nr. 11, 1236-1240

54. Yamazaki, T., Yazaki, Y. (2000):

Molecular basis of cardiac hypertrophy.

Z. Kardiol. 89, 1-6

55. Yanbin, D. (2000):

The G-protein β_3 subunit polymorphism in human hypertension.

Int. Journal of Cardiology 93, 197-198

7 Abkürzungsverzeichnis

Bp	Basenpaare
BMI	Body Mass Index (kg/ m ²)
cDNA	komplementäre DNA
CM	Kardiomyopathie
CMD	Cardiomyopathy Disease
DCM	dilatative Kardiomyopathie
DNA	Desoxyribonucleic acid
EBV	Epstein-Barr-Virus
g	Erdbeschleunigung
GDP	Guanosin-diphosphat
G-Protein	GTP-bindendes Protein
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HRST	Herzrhythmusstörung
HT	Hypertoniker
HTX	Herztransplantation
IDMM	Insulin-dependent Diabetes mellitus
KHK	koronare Herzkrankheit
LPA	Lysophosphatidsäure
M	Mol/ l
NHE	Na ⁺ / H ⁺ -Austauscher

NT	Normotoniker
PAP	Pulmonalarteriendruck
PBS	Phosphate-buffered Saline (physiologisch gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction
PTX	Pertussis-Toxin
Rpm	Umdrehungen/ Min.
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
Taq-Polymerase	DNA-Polymerase von <i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris-buffered Saline
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminoethan

8 Danksagung

Herrn Professor W. Siffert danke ich für die freundliche Überlassung des Themas dieser Arbeit, seine positiven Anregungen und seinen sachkundigen Rat bei der Umsetzung.

In besonderem Maße bedanken möchte ich mich auch bei Dr. med. Ulrich Frey, ohne ihn ich viele Probleme nicht so gut hätte meistern können. Dies gilt insbesondere für die Phase der schriftlichen Zusammenfassung.

Besonders möchte ich mich bei Frau Gerlinde Siffert bedanken - sie hatte die technische Betreuung dieser Arbeit inne. Ich erlernte von ihr die Durchführung von experimentellen Arbeiten und die Interpretation von Ergebnissen.

Des Weiteren möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern und Doktoranden unserer Arbeitsgruppe bedanken, die jederzeit bereitwillig ihr Wissen und ihre Zeit einsetzten, um mir bei offenen Fragen zu helfen. Die anregende, humorvolle Arbeitsatmosphäre und die Pausen in gutgelaunter Gesellschaft haben den Laboralltag immer wieder erleichtert.

Darüber hinaus danke ich meinen Freunden Dres. med. Koluacik A., Arslan D., Ince I., Akdemir M. und Canbay A., die mir oft mit hilfreichen Ratschlägen weitergeholfen haben und für viel ausgleichende Ablenkung vom Laborgeschehen gesorgt haben.

Ein extra großes Dankeschön geht natürlich an meine Familie. Sie haben mir während aller Phasen dieser Dissertation liebevoll und mit viel Verständnis und Geduld zur Seite gestanden.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Alisan Kahraman

Wohnort: Bergkamen

Geburtsdatum/ -ort: 29. Januar 1972 in Erzincan/ Türkei

Familienstand: ledig

Nationalität: deutsch

Schulischer Werdegang

07.1978 - 06.1983: Schiller-Grundschule Bergkamen

07.1983 - 06.1992: Städt. Gymnasium Bergkamen/ Abitur

Studium

10.1994 - 03.1997: Vorkl. Studienabschnitt an der Ruhr-Universität Bochum

04.1997 - 09.2000: Klin. Studienabschnitt am Universitätsklinikum Essen

10.2000 - 09.2001: Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Essen

Dissertation

01.2002 - 01.2006 *GNB3* C825T-Polymorphismus bei dilatativer Kardiomyopathie

Betreuer: Prof. Siffert, Institut für Pharmakogenetik/ Essen

Arbeitsstelle

07.2002 - 12.2003 AiP im Zentrum für Innere Medizin der Uniklinik Essen

seit 01.2004 wiss. Mitarbeiter der Klinik für Gastroenterologie an der Uniklinik Essen

Bergkamen, den 20.03.2006