

**Aus dem Bereich Humangenetik  
Theoretische Medizin und Biowissenschaften  
bzw. Klinische Medizin der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar**

**Bedeutung genetischer Polymorphismen für eine  
sportbedingte Anpassung des Herzens  
(Das Sportherz)**

*Dissertation*

**zur Erlangung des Grades  
eines Doktors der Naturwissenschaften  
der Medizinischen Fakultät der  
UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

**2008**

vorgelegt von

Dipl. Biol. Ruth-Jessica Wild

geboren am 29.08.1979

in Saarbrücken

*für*  
***Christian und meine Eltern***

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung (deutsch/englisch)</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Summary</b> .....	<b>3</b>
<b>2. Einleitung</b> .....	<b>5</b>
<b>2.1 Das Sportherz</b> .....	<b>5</b>
<b>2.2 Signalwege bei einer Myokardhypertrophie</b> .....	<b>9</b>
2.2.1 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS).....	10
2.2.2 Der IGF1-Signalweg.....	18
2.2.3 Assoziierte Faktoren und Signalwege.....	25
2.2.3.1 Der Androgen-Rezeptor (AR) .....	25
2.2.3.2 Das B-Typ natriuretische Peptid (BNP) .....	26
2.2.3.3 Der $\beta_1$ -adrenerge Rezeptor ( $\beta_1$ AR).....	27
2.2.3.4 Das Troponin T (TNNT2) .....	28
<b>2.3 Ziele dieser Arbeit</b> .....	<b>29</b>
<b>3. Material und Methodik</b> .....	<b>31</b>
<b>3.1 Material</b> .....	<b>31</b>
3.1.1 Lösungen und Puffer.....	31
3.1.2 Kits und Standards.....	33
3.1.3 Enzyme .....	33
3.1.4 Primer .....	33
3.1.5 Geräte und Software .....	36
3.1.6 Auswahl und Beschreibung des Untersuchungskollektivs .....	37
3.1.6.1 Athletengruppe .....	37
3.1.6.2 Kontrollgruppe .....	39
<b>3.2 Methodik</b> .....	<b>39</b>
3.2.1 Sportmedizinische bzw. kardiologische Untersuchungen.....	39
3.2.2 Molekulargenetische Untersuchungen.....	40
3.2.2.1 DNA-Isolierung aus EDTA-Blut.....	40
3.2.2.2 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration .....	42
3.2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	43
3.2.2.4 RFLP (Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus)-Analyse .....	46
3.2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese .....	47
3.2.2.6 DHPLC (WAVE-Analyse).....	49
3.2.2.7 Fragmentlängenbestimmung mittels Kapillarelektrophorese .....	54
3.2.2.8 DNA-Sequenzierung .....	57
3.2.3 Statistische Auswertung.....	60
3.2.3.1 Überprüfung der Genotyp- bzw. Allelfrequenzen .....	60

---

3.2.3.2 Einfluss der Polymorphismen auf die Herzparameter .....	62
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>66</b>
<b>4.1 Polymorphismus-Analysen mit unterschiedlichen Methoden.....</b>	<b>66</b>
4.1.1 Suche nach neuen Polymorphismen .....	66
4.1.1.1 Das Myostatin-Gen (GDF8-Screen).....	66
4.1.1.2 Das BNP-Gen (BNP-Screen) .....	69
4.1.2 Analyse bereits bekannter Polymorphismen.....	74
4.1.2.1 Fragmentlängen-Analyse mittels Agarosegel-Gelelektrophorese .....	74
4.1.2.2 RFLP (Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus)-Analyse .....	75
4.1.2.3 DHPLC-Analyse .....	78
4.1.2.4 Fragmentlängenbestimmung mittels Kapillarelektrophorese .....	82
<b>4.2 Zusammenhang der einzelnen Polymorphismen mit einer physiologischen Herzhypertrophie .....</b>	<b>87</b>
4.2.1 Echokardiographische Ergebnisse .....	87
4.2.2 Polymorphismen im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) .....	93
4.2.2.1 Die Genotyp- und Allelverteilungen .....	93
4.2.2.2 Zusammenhang zwischen den einzelnen RAAS-Polymorphismen und den Herzparametern .....	97
4.2.3 Polymorphismen im IGF1-Signalweg .....	99
4.2.3.1 Der IGF1(CA)n-Repeatpolymorphismus .....	99
4.2.3.2 Der IGF1R 3174G/A-Polymorphismus.....	104
4.2.3.3 Der Deletions-Polymorphismus im Myostatin-Gen (GDF8).....	107
4.2.4 Polymorphismen in assoziierten Signalwegen.....	111
4.2.4.1 Die Polymorphismen im X-chromosmalen Androgen-Rezeptor-Gen (AR).....	111
4.2.4.2 Die Polymorphismen im Gen des B-Typ natriuretischen Peptids (BNP).....	114
4.2.4.3 Der G389R-Polymorphismus im $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor (ADRB1).....	116
4.2.4.4 Der 5bpI/D-Polymorphismus im Troponin T-Gen (TNNT2).....	116
<b>4.3 Zusammenhang zwischen der Kombination von Polymorphismen und einer physiologischen Herzhypertrophie .....</b>	<b>118</b>
4.3.1 Kombinationen von Polymorphismen innerhalb des RAAS .....	118
4.3.2 Kombinationen von Polymorphismen innerhalb des IGF1-Signalwegs .....	119
4.3.3 Kombinationen von Polymorphismen unabhängig vom Signalweg .....	120
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>122</b>
<b>5.1. Allgemeine Zusammenhänge .....</b>	<b>123</b>
<b>5.2 Zusammenhänge zwischen den einzelnen genetischen Polymorphismen und dem Sportherz .....</b>	<b>124</b>
5.2.1 Die RAAS-Polymorphismen .....	124
5.2.2 Die Polymorphismen im IGF1-Signalweg.....	134
5.2.3 Polymorphismen in assoziierten Genen.....	142

---

<b>5.3 Zusammenhänge zwischen Polymorphismen-Kombinationen und dem Sportherz.....</b>	<b>146</b>
<b>5.4 Kritische Aspekte der Arbeit.....</b>	<b>151</b>
5.4.1 Methodik.....	151
5.4.1.1 Gemeinsame Analyse der Trinukleotidpolymorphismen im Androgen-Rezeptor-Gen...	151
5.4.1.2 Probleme der DHPLC-Analyse .....	152
5.4.2 Grenzen der Studie .....	153
<b>5.5 Ausblick.....</b>	<b>156</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>158</b>
<b>7. Publikationen/Danksagung .....</b>	<b>175</b>
7.1 Publikationen.....	175
7.2 Danksagung.....	176
<b>8. Lebenslauf.....</b>	<b>177</b>

## Verwendete Abkürzungen

<b>A</b>	A	Adenin	
	Abb.	Abbildung	
	AC	Adenylatzyklase	
	ACE	Angiotensin-Konversionsenzym	
	ActRIIb	Activin-TypIIB-Rezeptor	
	adj	adjustiert	
	AGT	Angiotensinogen	
	Akt	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog	
	AngI	AngiotensinI	
	AngII	AngiotensinII	
	AngIII	AngiotensinIII	
	AngIV	AngiotensinIV	
	Ang1-7	Angiotensin1-7	
	ANOVA	analysis of variance	
	ANP	atriales natriuretisches Peptid	
	AR	Androgen-Rezeptor	
	ARA70	Androgen-Rezeptor-assoziiertes Protein 70	
	AT	Ausdauertraining	
	AT <sub>1</sub> R	AngiotensinII-Rezeptor TypI	
	AT <sub>2</sub> R	AngiotensinII-Rezeptor TypII	
	<b>B</b>	(b)	beobachtete Häufigkeit
		β <sub>1</sub> AR bzw. ADRB1	β <sub>1</sub> -adrenerger Rezeptor
		BKR	Bradykinin-Rezeptor
B2BKR		Bradykinin-Rezeptor TypII	
BNP		zerebrales bzw. B-Typ natriuretisches Peptid	
bp		Basenpaare	
BMP1		bone morphogenetic protein 1	
bzw.		beziehungsweise	
<b>C</b>		C	Cytosin
		cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
	cdk2	cyclin-dependent-kinase 2	
	cGMP	Guanosinmonophosphat	
	cm	Zentimeter	
	CMA	Chymase A	
	CNP	C-Typ natriuretisches Peptid	

---

	cTnT	cardiale Troponin T-Isoform
	CYP11B2	Aldosteron-Synthase
<b>D</b>	D bzw. del	Deletion
	dATP	Desoxyadenosintriphosphat
	DCM	dilatative Kardiomyopathie
	dCTP	Desoxycytidintriphosphat
	dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
	ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
	dest.	destilliert
	dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
	d.h.	das heißt
	DHPLC	denaturierende Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
	DHT	Dihydrotestosteron
	DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonucleinsäure)
	DNase	Desoxyribonuclease
	dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<b>E</b>	(e)	erwartete Häufigkeit
	EDD	enddiastolischer Innendurchmesser des linken Ventrikels
	EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
	Egr	early growth response
	et al.	et alia (lat.: „und andere“)
	EtBr	Ethidiumbromid
	evtl.	eventuell
	Ex	Exon
<b>F</b>	FLRG	Follistatin-related gene
	for	forward
	Foxo1	forkhead box-containing protein O1
<b>G</b>	g	Gramm
	G	Glycin (Aminosäure) bzw. Guanin (Base)
	GATA 4	GATA binding protein 4
	GDF8	growth differentiation factor 8
	GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
	GS	Genescan
	GTP	Guanosintriphosphat
<b>H</b>	h	Stunde
	HCM	hypertrophe Kardiomyopathie

---

	HOCM	hypertroph obstruktive Kardiomyopathie
	HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
	HWG	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht
<b>I</b>	I	Insertion
	IGF1	Insulin-like growth factor 1
	IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor
	IGFBP	Insulin-like growth factor 1 binding protein
	inkl.	inklusiv
	IRS1	Insulin-Rezeptor-Substrat 1
	IVS	Septumdicke
<b>K</b>	kb	Kilobase(n)
	KE	Kapillarelektrophorese
	kg	Kilogramm
	KOF	Körperoberfläche
<b>L</b>	lat.	lateinisch
	LV	linksventrikulär
	LVH	linksventrikuläre Hypertrophie
	LVM	linksventrikuläre Muskelmasse
<b>M</b>	M	Methionin bzw. Molarität
	m <sup>2</sup>	Quadratmeter
	mM	Millimolar
	MAPK	Mitogen-activated protein kinase
	MEF2	myogenic enhancer factor 2
	min	Minuten
	ml	Milliliter
	MR	Mineralocorticoid-Rezeptor
	Mst	Myostatin
	mTOR	mammalian target of rapamycin
	MW	Mittelwert
	MyBP-C	Myosin-bindendes Protein C
<b>N</b>	n	Anzahl
	NaAc	Natrium-Acetat
	NAB	NGFI-A binding protein
	NFAT	nuclear factor of activated T-cells
	ng	Nanogramm
	nm	Nanometer



---

	NP	natriuretisches Peptid
	NO	Stickstoffmonoxid
<b>P</b>	p	kurzer Arm eines Chromosoms
	p21	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
	PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
	PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
	PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
	PKB bzw. Akt	Proteinkinase B
	PKC	Proteinkinase C
	PLC	Phospholipase C
	pmol	Picomol
	PRA	Plasma-Renin-Aktivität
	PW	Hinterwanddicke
<b>Q</b>	q	langer Arm eines Chromosoms
<b>R</b>	R	Arginin
	r <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß
	RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
	rev	reverse
	RFLP	Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus
	RNA	ribonucleic acid (Ribonucleinsäure)
	rpm	Umdrehungen pro Minute („revolutions per minute“)
	R-Smads	rezeptor-regulierte Smads
	RT	Raumtemperatur
<b>S</b>	SCD	sudden cardiac death
	SD	Standardabweichung
	SDS	Natriumdodecylsulfat
	SE	Standardfehler
	sec	Sekunden
	sog.	so genannt
	SF-1	Steroidogenic Factor -1
	SNP	single nucleotide polymorphism
	STR	short tandem repeat
	SRE	steroid-response element
	SRF	serum response factor
<b>T</b>	T	Threonin (Aminosäure) bzw. Thymidin (Base)

---

	Tab.	Tabelle
	TBE	Tris-Borat-EDTA
	TEAA	Triethylammoniumacetat
	TEDD	totaler enddiastolischer Durchmesser des linken Ventrikels
	TGF $\beta$	transforming growth factor- $\beta$
	TL	totale enddiastolische Länge
	TLD	Tolloid
	TLi	enddiastolische Länge
	TNNT2	Troponin T
<b>U</b>	U	Unit(s) (Enzymeinheit)
	u.a.	unter anderem
	UV	ultraviolettes Licht
<b>V</b>	v.a.	vor allem
<b>W</b>	WT	Wildtyp
<b>Z</b>	z.B.	zum Beispiel
<b><math>\mu</math></b>	$\mu$ g	Mikrogramm
	$\mu$ l	Mikroliter

---

## 1. Zusammenfassung (deutsch/englisch)

### 1.1 Zusammenfassung

Das Sportherz ist ein gesundes, vergrößertes Herz, das sich durch Anpassung an die starke Beanspruchung bei langjährigem, regelmäßigem und intensivem Ausdauertraining entwickeln kann. Die vermehrte Volumenbelastung führt zu einer harmonischen Erweiterung aller Herzkammern, mit kompensatorischer Verdickung der Herzmuskulatur, eine so genannte exzentrische Hypertrophie. Allerdings entwickeln nicht alle Ausdauersportler ein Sportherz; auch kann die kardiale Anpassung an ein Ausdauertraining von ähnlichem Umfangs individuell erheblich variieren. Diese Unterschiede scheinen überwiegend auf eine entsprechende genetische Veranlagung zurückführbar zu sein. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Suche nach genetischen Polymorphismen, die eine sportbedingte Anpassungsreaktion des Herzens individuell modifizieren können. Der Schwerpunkt der Untersuchungen betraf zwei kardiologisch wichtige Signalwege:

- das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), und
- der IGF1-Signalweg, einschließlich seines negativen Regulators Myostatin

Ergänzend untersucht wurden Polymorphismen mehrerer assoziierter Faktoren, nämlich des Androgenrezeptors (AR), des zerebralen natriuretischen Peptids (BNP), des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors ( $\beta_1$ AR) und des Troponin T (TNNT2). Durchgeführt wurde die Studie in Zusammenarbeit mit dem Institut für Sport- und Präventivmedizin der Universität des Saarlandes (Dr. J. Scharhag, Prof. Dr. W. Kindermann) und dem Max-Planck-Institut für Informatik (PD Dr. J. Rahnenführer). An der Studie beteiligten sich 110 Ausdauersportler (75 männliche und 35 weibliche Kaderathleten), sowie 27 männliche untrainierte Vergleichspersonen, die kardiologisch unter Einbeziehung bildgebender Verfahren genau untersucht wurden. Der Vergleich der Herzvolumina und der linksventrikulären Masse (LVM) der Probanden mit deren Mustern von 16 Polymorphismen in 14 untersuchten Genen erbrachte neuartige Erkenntnisse bezüglich der Ätiologie eines Sportherzens.

1. Polymorphismen in Genen des RAAS scheinen im Gegensatz zu der Entwicklung einer pathologischen Myokardhypertrophie allgemein keinen signifikanten Einfluss auf eine physiologische Vergrößerung des Herzens zu haben. Eine wichtige Ausnahme bezüglich der LVM stellt ein Polymorphismus im Gen der Aldosteron-Synthase

---

(CYP11B2 -344C/T) dar. Dieser könnte über den Aldosteron-Spiegel die hypertrophische Antwort mit beeinflussen. Der Effekt war allerdings nur bei den männlichen Sportlern zu beobachten.

2. Sowohl der Polymorphismus im IGF1-Gen, ein (CA)<sub>n</sub>-Repeat in der Promotorregion, als auch derjenige im IGF1-Rezeptor-Gen, ein Basenaustausch G → A an Position 3174, scheinen das Ausmaß einer trainingsinduzierten Myokardhypertrophie erheblich zu beeinflussen. Die Befunde sprechen für die Bedeutung des IGF1-Signalwegs bei einer physiologischen Herzvergrößerung.

3. Als besonders interessant hat sich in unserer Studie der Einfluss eines bisher in der Literatur nicht beachteten Polymorphismus im ersten Intron des Myostatin-Gens auf die LVM erwiesen (GDF8 IVS1+88\_90delA). Myostatin wurde ursprünglich dadurch bekannt, dass es ein übermäßiges Skelettmuskelwachstum hemmt. In den letzten Jahren verdichten sich jedoch die Hinweise, dass es auch einer Hypertrophie der Herzmuskelzellen entgegenwirkt. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei dem von uns untersuchten Polymorphismus das Deletions-Allel den hemmenden Effekt von Myostatin auf eine Myokardhypertrophie signifikant verstärkt. Der Wirkmechanismus dieses in einem nicht-transkribierten Bereich liegenden Polymorphismus ist allerdings noch ungeklärt. Auch hier zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang nur bei den Männern.

4. Bemerkenswerterweise waren die in unserer Studie gefundenen Zusammenhänge zwischen LVM, Herzvolumen und den informativen Polymorphismen geschlechtsunterschiedlich. Es ist anzunehmen, dass, wie sich aus Literaturhinweisen ergibt, Geschlechtshormone und deren Rezeptoren regulierend in die untersuchten Signalwege eingreifen. Allerdings müssen die Ergebnisse insbesondere wegen der geringen Zahl untersuchter weiblicher Ausdauersportler mit Zurückhaltung betrachtet und an einer ausreichend großen Population überprüft werden.

5. Die Kombination der Polymorphismen bestimmter Gene zeigte bezüglich der LVM synergistische Wirkungen. Solche Verstärkungen konnten sowohl bei Komponenten innerhalb eines Signalwegs, aber auch unabhängig vom Signalweg beobachtet werden. Dies unterstützt die Annahme, dass die untersuchten Gene in einem Netzwerk interagieren und in ihren jeweiligen allelischen Formen zusammen das Ausmaß der trainingsinduzierten Myokardhypertrophie beeinflussen.

---

Die hier beschriebenen genetischen Profile sind in der Lage, einen Großteil der Variabilität des Sportherzens, insbesondere der linksventrikulären Masse, bei den männlichen Ausdauersportlern zu erklären. Die Kenntnis genetischer Besonderheiten, die die trainingsbedingten kardialen Befunde beeinflussen, könnte in Zukunft dazu beitragen, präventivmedizinisch zuverlässiger als mit den bisher üblichen bildgebenden Methoden allein, physiologische von beginnenden pathologischen Veränderungen zu unterscheiden.

## 1.2 Summary

### *Impact of genetic polymorphisms on a training-induced adaptation of the heart*

#### *(The athlete's heart)*

The athlete's heart is a healthy, enlarged heart, which could develop from adaptation to the strong exposure of long-time, continuous and intensive endurance training. The increased volume overload causes a harmonic chamber enlargement with a compensatory increase of heart musculature, a so called eccentric hypertrophy. But, not all endurance athletes develop an athlete's heart; also, the cardiac adaptation to endurance training of similar amount may vary significantly. These differences seem to be predominantly caused by genetic disposition. The aim of this study was the search of genetic polymorphism which could individually modify a training-induced adaptation of the heart. The main focus was the analysis of two cardiologic important signalling pathways:

- the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS), and
- the IGF1 pathway, inclusive of its negative regulator myostatin.

Additionally analysed were polymorphisms of several associated factors, namely the androgene receptor (AR), the brain natriuretic peptide (BNP), the  $\beta_1$ -adrenergic receptor ( $\beta_1$ AR) and the troponin T (TNNT2). The study was accomplished in collaboration with the Institut für Sport- und Präventivmedizin der Universität des Saarlandes (Dr. J. Scharhag, Prof. Dr. W. Kindermann) and the Max-Planck-Institut für Informatik (PD Dr. J. Rahnenführer). 110 competitive endurance athletes (75 ♂ and 35 ♀) and 27 male controls participated in this study, which were cardiologically exactly examined with imaging methods. The comparison of heart volume and left ventricular mass (LVM) of the subjects with their pattern of 16 polymorphisms in 14 analysed genes delivered novel results as to the aetiology of the athlete's heart.

---

1. Contrary to a pathological hypertrophy, polymorphisms in genes of the RAAS seem to have generally no significant influence on a physiological enlargement of the heart. An important exception as to the LVM was a polymorphism in the aldosterone synthase gene (CYP11B2 -344C/T), that could influence the hypertrophic response via the aldosterone level. However, this effect was only detected in male athletes.

2. The polymorphism in the IGF1 gene, a (CA)<sub>n</sub> repeat polymorphism in the promoter region, as well as the polymorphism in the IGF1 receptor gene, a G → A substitution at position 3174, seem to decisively influence the amount of a training-induced hypertrophy. These results argue for the importance of the IGF1 pathway on a physiological heart enlargement.

3. Notably interesting was the influence of a previously unnoticed polymorphism in the 1. intron of the myostatin gene on the LVM (GDF8 IVS1+88\_90delA). Myostatin became originally known as a suppressor of an excessive skeletal muscle growth. In the last years there is lot of evidence, that it also antagonises the hypertrophic response of cardiac myocytes. Our results are indicating that the deletion allele of the analysed myostatin polymorphism significantly increases the myostatic effect on a cardiac hypertrophy. The underlying mechanism of this polymorphism amidst an untranscribed sequence is unexplained so far.

4. Remarkably, our detected correlations between LVM, heart volume and the informative polymorphisms show gender diversity. That points to the known regulating influence of sex hormones and their receptors on the signalling pathways. Because of the small size of our female group, we have to handle these results with care and to control them on a larger sample size.

5. Combinations of certain polymorphisms showed synergistic effects on the LVM. That could be observed inside one pathway, but also independent of the pathway. That indicates a network of interacting genes which influence in its particular allelic forms the amount of a training-induced cardiac hypertrophy.

The described genetic profiles are appropriate to explain the variability of the male athlete's heart to a large extent. In the future, the knowledge of genetic characteristics, which influence the training-induced cardiac findings, may help to distinguish between a physiological and an incipient pathological cardiac hypertrophy better than with usually used imaging methods only.

---

## 2. Einleitung

### 2.1 Das Sportherz

Ende des 19. Jahrhunderts stellte der finnische Arzt Henschen erstmals durch Perkussion des Brustkorbs eine Vergrößerung des Herzmuskels bei Skilangläufern fest. Dieses Phänomen bezeichnete er als Sportherz bzw. als "athlete's heart" (Henschen, 1899). Seit dieser Zeit gab es viele Diskussionen darüber ob diese Art der Herzvergrößerung einen rein physiologischen Zustand darstellt oder ob sie mit krankhaften Konsequenzen verbunden sein kann.

Aufgrund einer Vielzahl von Untersuchungen an Hochleistungssportlern geht man heute davon aus, dass das Sportherz das Ergebnis einer physiologischen Anpassungsreaktion an eine regelmäßige und intensive körperliche Ausdauerbelastung ist. Deshalb spricht man auch von einer physiologischen Herzhypertrophie. Durch Zunahme des Plasmavolumens durch sportliche Ausdauer-Betätigung kommt es zu einer regulativen harmonischen Erweiterung aller Herzhöhlen (Dilatation) mit kompensatorischer Verdickung der Herzmuskulatur sowie gleichzeitiger Erweiterung der Herzkranzgefäße, um die notwendige Durchblutung und damit Ernährung und Sauerstoffversorgung des Herzmuskels zu gewährleisten. Daraus resultiert ein gesunder und überdurchschnittlich leistungsfähiger Herzmuskel. Dies unterscheidet das gesunde Sportherz von einem krankhaft vergrößerten Herz (pathologische Herzhypertrophie), das von einem pathologischen Stimulus wie z.B. Bluthochdruck oder einer Erkrankung des Klappenapparates herrührt. Während die Herzvergrößerung für das Sportherz eine erhöhte Leistungsreserve bedeutet, stellt sie bei Herzerkrankungen häufig einen Kompensationmechanismus bei erheblich eingeschränkter Leistungsfähigkeit dar (Catalucci et al., 2008; Kindermann et al., 2007; Richey and Brown, 1998).

Histologisch betrachtet besteht das Herz aus Kardiomyozyten (Herzmuskelzellen), Nicht-Myozyten (z.B. Fibroblasten, vaskuläre glatte Muskelzellen, vaskuläre Endothelzellen und Mastzellen) und umgebender extrazellulärer Matrix. Kardiomyozyten sind spezialisierte Muskelzellen, die aus Bündeln sog. Myofibrillen aufgebaut sind. Diese bestehen wiederum aus sich wiederholenden Einheiten, den Sarcomeren, die die Kontraktilität des Herzens bewirken. Bei Säugern verlieren die meisten Kardiomyozyten kurz nach der Geburt die Fähigkeit, sich zu teilen. Deshalb ist eine Herzvergrößerung aufgrund erhöhter Arbeitslast bei Erwachsenen hauptsächlich das Ergebnis einer Hypertrophie, d.h. Vergrößerung der Herzmuskelzellen. Daneben

sind für dieses Wachstum auch die Zunahme von Zahl und Größe der Mitochondrien und eine vermehrte Kapillarisation verantwortlich, sodass eine ausreichende Sauerstoffversorgung gewährleistet ist. Im Gegensatz zu einer krankhaften Herzvergrößerung kommt es bei der Sporthertzentwicklung jedoch weder zu einer interstitiellen Fibrose noch zu einer Vermehrung der extrazellulären Matrix (McMullen and Jennings, 2007). Die am Herzen stattfindenden Umbauprozesse bezeichnet man auch als "Remodeling".

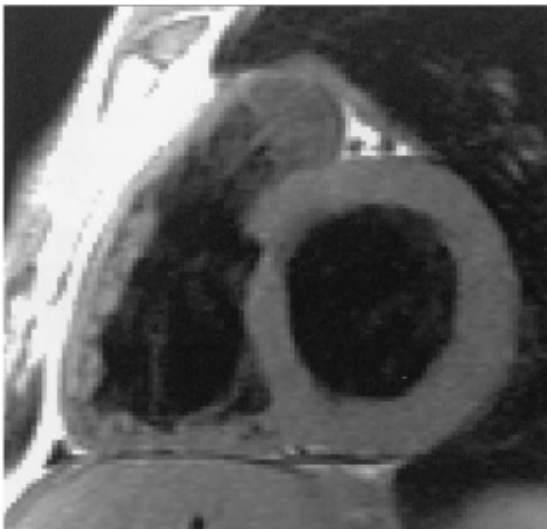
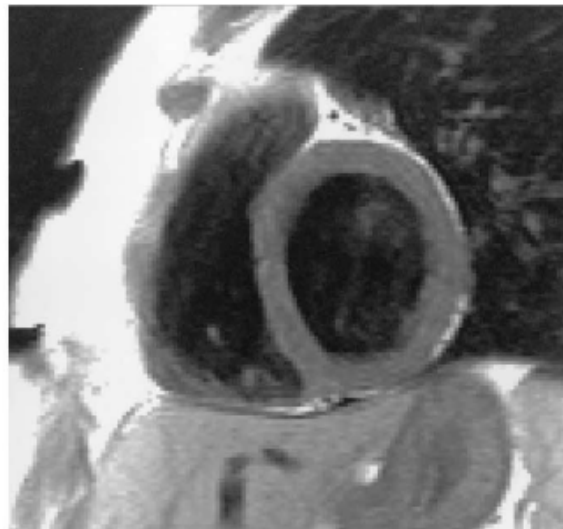
Allgemein wird eine Herzhypertrophie definiert als Vergrößerung der ventrikulären Masse als Anpassungsreaktion des Herzens auf eine erhöhte hämodynamische Last. Anhand ihrer Gestalt kann man eine Hypertrophie in eine konzentrische oder exzentrische Form einteilen. Die Art der Hypertrophie hängt dabei vom Typ der hämodynamischen Belastung ab: eine Druck-Überbelastung bewirkt einen erhöhten systolischen Wand-Druck, der zu einer konzentrischen Hypertrophie mit verdickten Ventrikel-Wänden und relativ kleinem Kammervolumen führt; eine Volumen-Überbelastung verursacht hingegen eine Erhöhung des diastolischen Wand-Drucks, woraus eine exzentrische Hypertrophie mit vergrößertem Kammervolumen und proportionaler Verdickung der Ventrikel-Wände resultiert. Bei dem Sporthertz handelt es sich um eine exzentrische Herzhypertrophie, die allerdings nicht durch eine Überbelastung, sondern durch eine sportlich induzierte erhöhte physiologische Volumenbelastung verursacht wird.

Das Ausmaß der trainings-induzierten Hypertrophie ist abhängig von der Dauer, Intensität und Art der körperlichen Belastung. Entscheidend sind der Ausdaueranteil und die Zahl der beteiligten Muskelgruppen (Dickhuth et al., 2001; Kindermann et al., 2007). Das typische Sporthertz findet man in den klassischen Ausdauersportarten wie z.B. Langstreckenlauf, Radrennfahren, Skilanglauf, Rennrudern oder Triathlon, da Ausdauersport den stärksten Einfluss auf die Kammer-Größe und Wanddicke des Herzmuskels hat (Pelliccia et al., 1991). Bei Kraft- und Schnellkraft(Sprint-)-Sportarten kommt es hingegen nicht zur Ausbildung eines Sporthertzens.

Die gängige Bestimmungsmethode der Herzgröße in der Sportmedizin ist heute die Echokardiographie, bei der die Reflexion von Ultraschallwellen an Grenzflächen des Herzens (Ventrikelwände, Septum, Klappen) erfasst wird. Neben der Herzgröße können so auch die Wanddicke und die myokardiale Funktion beurteilt werden.



Die Herzgröße wird in der Regel als relatives (körpergewichtbezogenes) Herzvolumen angegeben. Das normale Herzvolumen liegt bei Männern zwischen 10-12 (Grauzone bis 13) ml/kg und bei Frauen zwischen 9-11 (Grauzone bis 12) ml/kg; bei einem größeren Herzvolumen spricht man von einem Sportherz. Dabei wird ein oberer Grenzwert von 20ml/kg anscheinend nicht überschritten (Kindermann 2000). Ein besonders wichtiger Parameter für die Beurteilung der kardialen Adaptionenmechanismen ist die linksventrikuläre Muskelmasse (LVM). Sie wird in der Regel auf die Körperoberfläche bezogen (LVM/KOF). Die oberen Grenzwerte für Normalpersonen liegen, nach der linksventrikulären Muskelmassenbestimmung nach Teichholz, bei etwa 110g/m<sup>2</sup> bei Männern (Scharhag et al., 2003; Teichholz et al., 1976). Bei Frauen liegen sie 10-20% darunter, d.h. Frauen besitzen also kleinere Herzen als Männer. Die oberen Grenzwerte für Ausdauersportler liegen deutlich höher: bei Männern bei 20ml/kg bzw. 135g/m<sup>2</sup>; bei Frauen etwa 5% bzw. 10-20% unter den Werten der männlichen Ausdauersportler. Wesentliche geschlechtsspezifische Unterschiede hinsichtlich der trainingsbedingten Herzvergrößerung gibt es nicht (Dickhuth et al., 2001; Kindermann, 2000).

**Ausdauersportler****Untrainierte Kontrollperson**

**Abb.2.1:** Querschnitt durch das Herz eines Ausdauersportlers (links) im Vergleich zu dem einer untrainierten Kontrollperson (rechts).

Im Vergleich zu der Kontrollperson ist das Herz des Ausdauersportlers charakterisiert durch ein vergrößertes Herzvolumen und eine größere myokardiale Masse bei beiden Ventrikeln (aus Scharhag et al., 2002).

Ein Sportherz beginnt, sich im Gegensatz zur pathologischen Herzhypertrophie nach Beenden des regelmäßigen Trainings wieder zurück zu bilden, wobei nicht in allen Fällen die Rückbildung vollständig ist (Pelliccia et al., 2002b).

---

Zu einer Sporthertzentwicklung kommt es sehr viel seltener, als allgemein angenommen. So müssen über mehrere Jahre wöchentlich mindestens 5 Stunden Ausdauersport betrieben werden um eventuell ein Sporthertz zu entwickeln (Kindermann, 2000).

Interessanterweise gibt es Spitzen-Ausdauersportler, die kein Sporthertz entwickeln. Auch kann die individuelle Ausprägung einer physiologischen Herzhypertrophie bei vergleichbarem Trainingsumfang sehr unterschiedlich sein. Für die sportliche Leistungsfähigkeit ist eine Fülle sehr unterschiedlicher, überwiegend genetisch bedingter, Faktoren verantwortlich. Nur einer davon ist die Herzgröße.

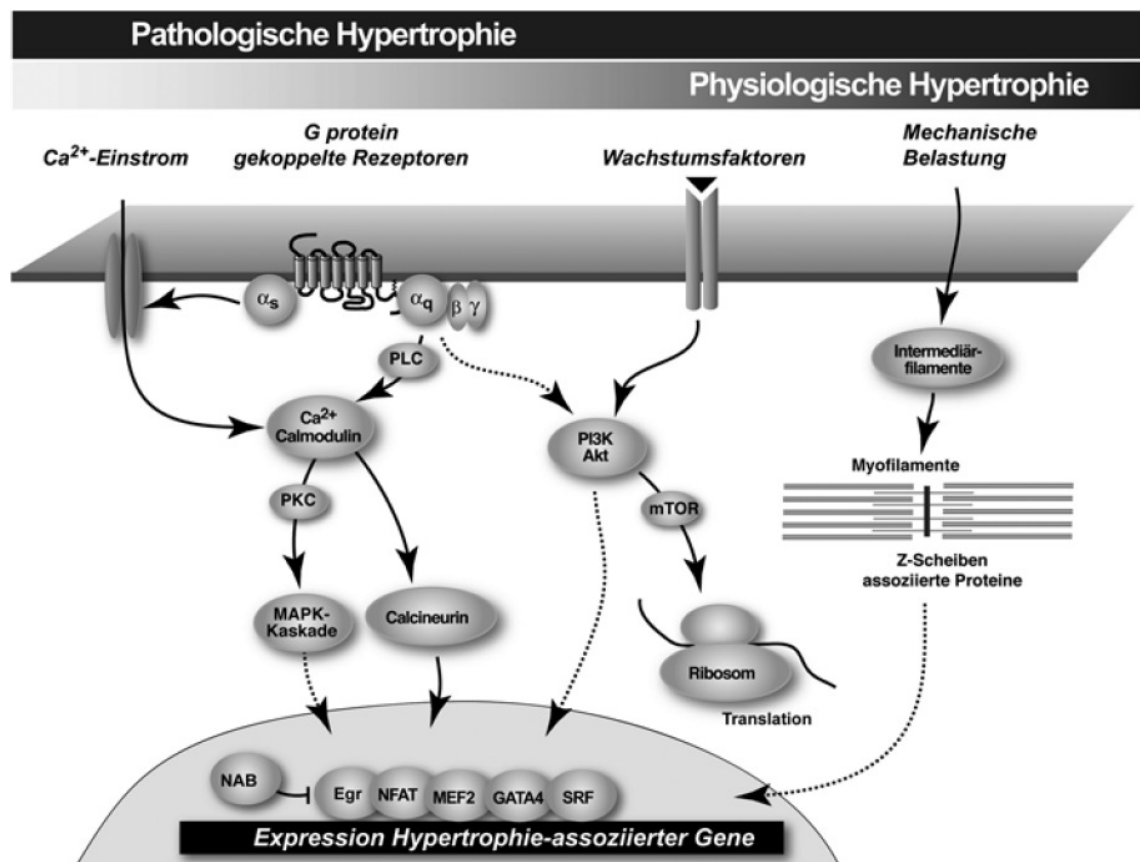
In den letzten Jahren haben die vor allem durch das Humangenom-Programm gewonnenen neuen Informationen über das menschliche Erbgut Hinweise auf zahlreiche Gene geliefert, die teils unabhängig voneinander, teils in regulatorischen Netzwerken verknüpft, die Herzentwicklung bzw. die Anpassungsreaktionen des Herzens auf unterschiedliche physiologische bzw. pathologische Stimuli beeinflussen.

So können Sequenzunterschiede innerhalb dieser Gene einen qualitativen bzw. quantitativen Einfluss auf deren Genprodukt, und somit einen modulierenden Einfluss auf die kardialen Anpassungsreaktionen haben. Diese Sequenzvariationen werden Polymorphismen genannt. Als Polymorphismus („Vielgestaltigkeit“) bezeichnet man das Auftreten von Genvarianten (Allele) innerhalb einer Population. Erfahrungsgemäß muss die Allelfrequenz, d.h. die Auftretenshäufigkeit des Allels, größer als ein Prozent sein, um sich in einer Population über die Generationen hinweg halten zu können. Andernfalls geht man von einer Neumutation aus. Polymorphismen, die innerhalb der kodierenden Region oder des Promotors eines Gens liegen, können die Funktion bzw. die Expressionsstärke des von ihm kodierten Proteins verändern. Auch wenn diese Polymorphismen selbst keine Wirkung entfalten, könnten sie dadurch wirksam werden, in dem sie im Kopplungsungleichgewicht mit einem funktionell wirksamen Allel eines unmittelbar benachbarten Gens stehen (Bleumink et al., 2004; Risch, 2000).

Die Suche nach bzw. die Untersuchung von Polymorphismen in kardiologisch relevanten Signalwegen könnte somit Aufschluss darüber geben, wie die individuellen Unterschiede bei der Anpassungsreaktion des Herzens auf ein Ausdauertraining zu Stande kommen.

## 2.2 Signalwege bei einer Myokardhypertrophie

Die Hypertrophie der Kardiomyozyten ist die zelluläre Antwort auf biomechanischen Stress. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Signalwegen aufgedeckt, die der Hypertrophie von Kardiomyozyten zugrunde liegen, wobei man hier allgemein zwischen einer physiologischen Hypertrophie, wie dem Sporthertz, und einer pathologischen Hypertrophie unterscheidet (Frey and Olson, 2003; Schlüter and Wollert, 2004). Diese Signalwege sind stark vereinfacht in Abb.2.2 dargestellt.



**Abb.2.2:** Signalwege bei physiologischer und pathologischer Myokardhypertrophie.

Bei der physiologischen Form der Myokardhypertrophie führen hauptsächlich die mechanische Belastung und die Induktion des PI3K-Signalwegs durch Wachstumsfaktoren zur Expression Hypertrophie-assoziierten Gene und zu einer Aktivierung der Proteintranslation. Bei der pathologischen Hypertrophie hingegen kommt es zur parallelen Aktivierung vieler verschiedener Signalwege, u.a. über die Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GPCRs).

PLC: Phospholipase C; PKC: Proteinkinase C; MAPK: Mitogen-activated protein kinase; PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinase; mTOR: mammalian target of rapamycin; NAB: NGFI-A binding protein; Egr: early growth response; NFAT: nuclear factor of activated T-cells; MEF2: myogenic enhancer factor 2; GATA 4: GATA binding protein 4; SRF: serum response factor (aus Engelhardt und Merkle, 2006).

Die Umwandlung der auf die Zelle wirkenden mechanischen Kräfte in biochemische Signale wird durch Sensoren, wie z.B. Integrine oder mechanosensitive Ionen-Kanäle vermittelt. Bei den Integrinen handelt es sich um eine Gruppe von

Zelladhäsionsrezeptoren, die die extrazelluläre Matrix mit dem Zytoskelett verbinden. Diese Sensoren übermitteln Informationen zu den Sarkomeren und induzieren die Expression Hypertrophie-assoziiierter Gene (Ross, 2004).

Des Weiteren werden Kardiomyozyten von vielen verschiedenen Hormonen in ihrer Umgebung beeinflusst, die teils endokrin, teils auch parakrin bzw. autokrin wirken können, wobei ihre Freisetzung aus der Zelle u.a. durch die mechanische Dehnung direkt verursacht wird (Force et al., 2002).

Hierzu gehören:

- die Peptidhormone (AngiotensinII, die natriuretischen Peptide, IGF1...)
- die Katecholamine (Adrenalin, Noradrenalin...)
- die Steroidhormone (Mineralocorticoide, Androgene, Östrogene...)
- und die Kinine (Bradykinin...)

Die Signaltransduktion der hypertrophischen Antwort beginnt auf der Zelloberfläche durch Aktivierung von Rezeptoren oder Kanälen. Die membranständigen Rezeptoren können dabei unterteilt werden in: Ionenkanalrezeptoren (ligandengesteuerte Ionenkanäle), G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) und Enzym-gekoppelte Rezeptoren (Abb.2.2). Sie generieren intrazelluläre Signal-Kaskaden, die teilweise als Netzwerke die Genexpression verändern und das Zellwachstum regulieren. Andere Hormone, wie die Steroidhormone, wirken über intrazelluläre Rezeptoren. Die Vergrößerung der Kardiomyozyten, eine gesteigerte Proteinsynthese und eine dichtere Organisation der Sarkomere sind die daraus resultierenden phänotypischen Veränderungen im Myokard (Mutschler et al., 2007; Schlüter and Wollert, 2004).

Die physiologische wie pathologische myokardiale Hypertrophie wird verursacht durch erhöhten Einfluss der Hypertrophie-fördernden oder durch reduzierten Einfluss der hemmenden Faktoren. Somit ist die Herzgröße das Ergebnis des Zusammenspiels verschiedener Stimuli.

### ***2.2.1 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)***

Eine Herzhypertrophie geht mit einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) einher. Das RAAS ist, neben seiner Bedeutung für die Blutdruckregulation, eines der wichtigsten hormonellen Systeme, die an der

Entwicklung einer Herzhypertrophie beteiligt sind. Dabei werden die Effekte des RAAS hauptsächlich von den beiden Hormonen AngiotensinII und Aldosteron vermittelt.

Das „klassische“ RAAS geht von einer endokrinen Wirkung aus: das Ausgangsprotein des RAAS ist das Angiotensinogen (AGT), das in der Leber gebildet wird und beim Menschen aus 485 Aminosäuren besteht. Das aus der Niere freigesetzte Enzym Renin spaltet von Angiotensinogen das Dekapeptid AngiotensinI (AngI) ab. AngI ist biologisch weitgehend inaktiv und wird durch das hauptsächlich im Endothel der Lunge aktivierte Angiotensin-Konversionsenzym (ACE) in das Oktapeptid AngiotensinII (AngII) umgewandelt. AngII ist ein außerordentlich starker Vasokonstriktor und wirkt somit gefäßverengend und blutdrucksteigernd. ACE kann jedoch nicht nur AngI in AngII umwandeln sondern es vermittelt gleichzeitig den Abbau von Bradykinin. Bradykinin gehört zu den Kininen und wirkt über seinen Rezeptor (Bradykinin-Rezeptor TypII, B2BKR) als Antagonist zu AngII sowohl vasodilatatorisch, als auch wachstumshemmend. ACE generiert somit den starken Vasokonstriktor AngII und inaktiviert gleichzeitig den starken Vasodilatator Bradykinin, weshalb ACE auch als KininaseII bekannt ist (Jones and Woods, 2003). Es existieren aber auch noch ACE-unabhängige Mechanismen für die Produktion von AngII. So kann Angiotensinogen von Enzymen wie dem Gewebe-Plasminogen-Aktivator, Cathepsin G und Tonin direkt in AngII umgewandelt werden, wohingegen die Serinprotease Chymase A neben ACE ebenfalls AngI in AngII spalten kann (Unger, 2002).

AngII vermittelt seine Effekte über verschiedene Rezeptoren, wobei die AngII-Rezeptoren TypI (AT<sub>1</sub>R) und TypII (AT<sub>2</sub>R) die beiden Hauptrezeptoren darstellen (Timmermans et al., 1993). Über den AT<sub>1</sub>R fördert AngII u.a. die Freisetzung des Mineralocorticoids Aldosteron in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde. Aldosteron hält Natriumchlorid im Bereich der distalen Tubuli zurück, begünstigt die Ausscheidung von Kalium und wirkt somit wasserresorbierend. Das Schlüsselenzym der Aldosteron-Bildung ist die Aldosteron-Synthase, ein Cytochrom P450-Enzym (11 $\beta$ -Hydroxylase 2, CYP11B2), das die letzten Schritte der Aldosteron-Biosynthese, nämlich die Umwandlung von Desoxycorticosteron zu Aldosteron katalysiert. Die Expression der Aldosteron-Synthase wird durch AngII positiv reguliert (Clyne et al., 1997; Song et al., 2003) (Abb.2.3).



gebildet wird (Young et al., 2001). Allerdings ist die kardiale Expression der Aldosteron-Synthase um das 6-fache geringer als in der Nebenniere, weshalb die kardiale Aldosteron-Produktion kontrovers diskutiert wird. Außerdem sind der Aldosteron- und Renin-Spiegel im Herz positiv korreliert, wobei Renin ausschließlich aus der Niere stammt (Chai and Danser, 2006; Danser et al., 1994; Gomez-Sanchez et al., 2004).

AngiotensinII und Aldosteron haben zusätzlich zu ihrer endokrinen, indirekten Wirkung auf das Herz, z.B. über die Blutdruckregulation, auch direkte Auswirkungen auf die Herzstruktur und -funktion. AngII bewirkt über Bindung an den AT<sub>1</sub>R, einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (Abb.2.3), eine hypertrophische Antwort der Kardiomyozyten (erhöhte Proteinsynthese ohne Änderung der DNA-Syntheserate) und eine mitogene Antwort (erhöhte Proteinsynthese und Erhöhung der DNA-Syntheserate) der Herz-Fibroblasten (Sadoshima and Izumo, 1993). Aldosteron potenziert die Wirkung von AngII und bewirkt sowohl eine hypertrophische Antwort bei den Kardiomyozyten als auch eine Bindegewebeproliferation und eine kardiale Fibrose (Heller et al., 2004; Schunkert et al., 1997; Young et al., 1994).

Das RAAS ist somit eines der wichtigsten regulatorischen Systeme des Körpers, die in die Pathophysiologie des Herzens involviert sind. Interessanterweise wird das RAAS auch bei körperlichem Training aktiviert (Kinugawa et al., 1997), weshalb das RAAS auch an der Entwicklung einer physiologischen Herzhypertrophie (Sportherzentwicklung) beteiligt sein könnte.

Es sind verschiedene Polymorphismen innerhalb der RAAS-Gene bekannt, die eine Rolle bei der Modifizierung der Sportherz-Entwicklung spielen könnten:

Innerhalb des **Angiotensinogen-Gens (AGT)**, das auf Chromosom 1q42-43 lokalisiert ist und 5 Exons besitzt, wurden u.a. zwei Polymorphismen in Exon2 detektiert. Zum einen verursacht ein Basenaustausch Thymin → Cytosin einen Aminosäureaustausch Methionin (M) → Threonin (T) in Codon 235 (**M235T**). Zum anderen führt ein Basenaustausch Cytosin → Thymin zu einem Aminosäureaustausch Threonin (T) → Methionin (M) in Codon 174 (**T174M**) (Ishanov et al., 1997). Bei beiden Polymorphismen ist das T-Allel anscheinend mit einer höheren Angiotensinogen-Konzentration assoziiert (Sethi et al., 2003). Beide Polymorphismen werden mit unterschiedlichen kardialen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht, allerdings mit widersprüchlichen Ergebnissen. So fanden Jeunemaitre et al. 1992 einen signifikanten Zusammenhang zwischen beiden Polymorphismen und Bluthochdruck beim Menschen,

wohingegen Caulfield et al. 1994 bei Europäern keine Assoziation fanden. Der AGT T174M-Polymorphismus wurde darüber hinaus mit dem Ausmaß einer linksventrikulären Hypertrophie bei Patienten mit einer Aortenstenose in Zusammenhang gebracht (Wong et al., 1996). Das Gleiche gilt für den weitaus häufiger untersuchten M235T-Polymorphismus, der ebenfalls mit verschiedenen Formen einer linksventrikulären Hypertrophie (LVH) in Verbindung gebracht wurde. Ishanov et al. (1997) fanden bei japanischen Patienten eine Assoziation zwischen dem 235T-Allel und einer hypertrophen Kardiomyopathie, wohingegen Yamada et al. (1997) keinen solchen Zusammenhang feststellen konnten. Dieser Polymorphismus wurde auch bereits in Hinblick auf eine physiologische Myokardhypertrophie bei Ausdauersportlern untersucht: Karjalainen et al. (1999) entdeckten bei finnischen Ausdauersportlern einen Zusammenhang zwischen dem 235T/T-Genotyp und einer deutlich größeren linksventrikulären Muskelmasse im Vergleich zu Trägern des 235M/M-Genotyps.

Ähnlich kontroverse Ergebnisse sind bei dem wohl bekanntesten RAAS-Polymorphismus, dem **I/D-Polymorphismus** im **ACE-Gen** gefunden worden. Das menschliche ACE-Gen, dessen Protein AngI in AngII umwandelt, liegt auf Chromosom 17q23 und besitzt 26 Exons. Der I/D-Polymorphismus ist charakterisiert durch die Insertion (I) bzw. Deletion (D) einer nichtkodierenden, 287bp-langen Alu-Repeat-Sequenz in Intron 16. Dieser Polymorphismus beeinflusst die ACE-Konzentration, wobei der D/D-Genotyp mit der höchsten ACE-Konzentration sowohl im Plasma als auch im Herz assoziiert ist (Danser et al., 1995; Montgomery et al., 1997). Die Bedeutung des ACE I/D-Polymorphismus wurde sowohl in Hinblick auf eine pathologische als auch eine physiologische Herzhypertrophie mit widersprüchlichen Ergebnissen untersucht. Im pathologischen Sinne wurde in mehreren Studien ein Zusammenhang zwischen dem D/D-Genotyp und der Ausbildung einer hypertrophen Kardiomyopathie (HCM) gezeigt (Marian et al., 1993; Pfeufer et al., 1996; Yoneya et al., 1995). Andere Studien konnten keinen Zusammenhang feststellen (Osterop et al., 1998; Yamada et al., 1997). Ortlepp et al. (2002) fanden einen modifizierenden Einfluss des ACE I/D-Polymorphismus auf die Ausprägung einer hypertrophen Kardiomyopathie innerhalb einer Familie mit einer Mutation im Myosin-bindenden Protein C (MyBP-C). Eine Metaanalyse von Kuznetsova et al. (2000) lieferte Hinweise darauf, dass der D/D-Genotyp lediglich bei Personen mit Bluthochdruck einen Einfluss auf die linksventrikuläre Masse hat. Darüber hinaus wurde der ACE I/D-Polymorphismus mit der Ausprägung einer physiologischen Herzhypertrophie in Verbindung gebracht: in einer Studie an 140 männlichen Militärrekruten kaukasischer



Abstammung wurde ein signifikanter Anstieg der linksventrikulären Muskelmasse bei Probanden mit mindestens einem D-Allel nach 10-wöchigem intensivem Kraft- und Ausdauertraining beobachtet. Die größte Zunahme zeigten Träger des D/D-Genotyps (Montgomery et al., 1997). Im Einklang damit wurde auch bei männlichen Ausdauerathleten ein Zusammenhang zwischen dem D/D-Genotyp und einer linksventrikulären Hypertrophie (LVH) nachgewiesen (Hernández et al., 2003). Andere Studien an Ausdauersportlern fanden hingegen keinen Einfluss des ACE I/D-Polymorphismus auf die LVM (Karjalainen et al., 1999; Shneider et al., 2004).

Das Enzym **Chymase A (CMA)** kann ebenfalls AngI in AngII umwandeln und scheint sogar das Hauptenzym der kardialen AngII-Produktion zu sein. Mehr als 80% der AngII-Bildung im Herz werden anscheinend durch die Chymase A vermittelt (Wolf, 2005). Das ebenfalls polymorphe CMA-Gen liegt auf Chromosom 14q11 und besitzt 5 Exons. An Position -1903 der 5'-untranslatierten Region vor dem eigentlichen Gen ist eine A/G-Basensubstitution bekannt, deren funktionelle Relevanz jedoch noch unklar ist. Trotzdem scheint dieser Polymorphismus bei einer pathologischen Herzhypertrophie eine Rolle zu spielen: Pfeufer et al. (1996) stellten einen Zusammenhang zwischen dem A-Allel kombiniert mit dem ACE D/D-Genotyp und einem erhöhten Risiko einer hypertrophen Kardiomyopathie fest. Auch Ortlepp et al. (2002) fanden eine Assoziation zwischen dem CMA A/A-Genotyp und einer größeren linksventrikulären Muskelmasse bei HCM-Patienten im Vergleich zu Nicht-Trägern dieses Genotyps. Untersuchungen in Hinblick auf eine physiologische Hypertrophie sind jedoch bisher nicht bekannt.

Auch ein Insertions-/Deletions-Polymorphismus im Gen des **Bradykinin-Rezeptors (B2BKR)**, über den u.a. die antihypertrophischen Effekte von Bradykinin im Herz vermittelt werden (Rosenkranz et al., 2002), wurde mit dem linksventrikulären Muskelwachstum in Verbindung gebracht. Das B2BKR-Gen liegt auf Chromosom 14q32 und besitzt 3 Exons. Brull et al. (2001) zeigten, dass ein **9bpI/D-Polymorphismus** in Exon1, bei dem an Position 21-29 die Nukleotidabfolge ...GGTGGGGAC... entweder vorliegt (I) oder fehlt (D) (Braun et al., 1995), stark assoziiert ist mit dem linksventrikulären Wachstum bei männlichen weißen Armee-Rekruten nach 10-wöchigem körperlichem Training. Das D-Allel (-9) ist assoziiert mit einer höheren B2BKR-Expression als das I-Allel (Lung et al., 1997); somit zeigten Probanden mit der geringsten Rezeptor-Konzentration (I/I) das größte linksventrikuläre Wachstum. Ähnliche Ergebnisse erbrachte eine Studie an einer Athletengruppe und an

einer Gruppe von Patienten mit Bluthochdruck: auch hier war das I-Allel jeweils mit einer größeren LVM assoziiert (Shneider et al., 2004).

Das Gen des **AngiotensinII-Rezeptors TypI (AT<sub>1</sub>R)** liegt auf Chromosom 3q21-25 und besteht aus 2 Exons. Es handelt sich um einen G-Protein-gekoppelten 7-Transmembran-Rezeptor, über den die meisten AngII-induzierten physiologischen und pathophysiologischen Funktionen wie Vasokonstriktion, Freisetzung von Aldosteron, Zellproliferation und -wachstum vermittelt werden (Paradis et al., 2000) Die Funktionen des AT<sub>2</sub>-Rezeptors sind hingegen weniger gut untersucht. Das Gen des **AngiotensinII-Rezeptor TypII (AT<sub>2</sub>R)** ist auf dem X-Chromosom (Xq22-23) lokalisiert und besitzt 3 Exons. Bei dem AT<sub>2</sub>R handelt es sich ebenfalls um einen G-Protein-gekoppelten 7-Transmembran-Rezeptor, der allerdings nur 34% Aminosäure-Sequenz-Homologie zum AT<sub>1</sub>R aufweist (Chung et al., 1996; Unger, 2002). Interessanterweise scheint der AT<sub>2</sub>R teilweise antagonistische Funktionen zu dem AT<sub>1</sub>R zu vermitteln (Booz, 2004; van Kesteren et al., 1997; Tab.2.1)

**Tab.2.1:** Partiell antagonistische Funktionen der beiden AngII-Rezeptoren AT<sub>1</sub>R und AT<sub>2</sub>R

<b>AT<sub>1</sub>-Rezeptor</b>	<b>AT<sub>2</sub>-Rezeptor</b>
Vasokonstriktion	Vasodilatation
Aldosteron-Synthese und -Sekretion	
Induziert Zellwachstum/Proliferation Herz-Hypertrophie	Hemmt Zellwachstum/Proliferation
	Zelldifferenzierung und Apoptose
Aktiviert Kinasen	Aktiviert Phosphatasen
Expression wird bei hoher AngII-Konzentration supprimiert	Expression wird bei hoher AngII-Konzentration nicht supprimiert

Die quantitative Verteilung von AT<sub>1</sub>- und AT<sub>2</sub>-Rezeptoren spielt bei kardialen Umbauprozessen, dem Herz-Remodeling, anscheinend eine wichtige Rolle (Alfakhi et al., 2004).

In beiden Rezeptoren wurden verschiedene Polymorphismen gefunden:

eine Basensubstitution A → C an Position 1166 (3'-untranslatierte Region) im AT<sub>1</sub>R-Gen scheint dabei mit dem Ausmaß einer Herzhypertrophie bei Patienten mit

hypertropher Kardiomyopathie assoziiert zu sein, wobei das C-Allel das Risiko-Allel darstellt. Außerdem wurde bei C/C-Trägern eine signifikant höhere Vasokonstriktion der Koronar-Gefäße festgestellt. Trotzdem scheint der AT<sub>1</sub>R 1166A/C-Polymorphismus nicht funktional zu sein (Amant et al., 1997; Ortlepp et al., 2002; Osterop et al., 1998). Ein Zusammenhang mit der Sportherzentwicklung bei Ausdauersportlern konnte bisher nicht gezeigt werden (Karjalainen et al., 1999).

Innerhalb des AT<sub>2</sub>R-Gens wurde in Intron1 ein Basenaustausch G → A an Position +1675 (bzw. -1332) gefunden, der anscheinend die Transkription des Rezeptors beeinflusst, wobei das G-Allel mit einem höheren AT<sub>2</sub>R-Spiegel assoziiert ist als das A-Allel (Warnecke et al., 2005). Schmieder et al. (2001) stellten einen Zusammenhang zwischen dem AT<sub>2</sub>R 1675A-Allel und einer größeren LVM bei jungen Männern mit leicht erhöhtem Blutdruck fest. Im Gegensatz dazu zeigten Alfakhi et al. (2004), dass das G-Allel mit einer linksventrikulären Hypertrophie bei Patienten mit systemischem Bluthochdruck assoziiert ist. Allerdings war hierbei das Untersuchungskollektiv gemischt aus männlichen und weiblichen Probanden. Ein Zusammenhang mit einer physiologischen Herzhypertrophie wurde bisher anscheinend noch nicht untersucht.

Der Serum-Aldosteron-Spiegel ist assoziiert mit der Veränderung der linksventrikulären Masse bei gesunden Personen, aber auch bei Patienten mit Bluthochdruck (Chai and Danser, 2006; Schunkert et al., 1997). Ein Polymorphismus innerhalb der Promotorregion des **Aldosteron-Synthase-Gens (CYP11B2)**, das auf Chromosom 8q22 liegt und aus 9 Exons besteht, wirkt sich anscheinend auf den Aldosteron-Spiegel aus. Es handelt sich hierbei um einen Basenaustausch C → T, der 344 Nukleotide vor (upstream) Beginn der Protein-kodierenden Sequenz liegt (-344C/T). Diese Region beinhaltet eine putative Bindungsstelle für den steroidogenen Transkriptionsfaktor SF-1. Träger des T-Allels zeigten in manchen Studien eine deutlich höhere Aldosteron-Konzentration als C/C-Homozygote (Barbato et al., 2004; Stella et al., 2004); in einer Studie von Takai et al. (2002) wurde hingegen genau das Gegenteil beobachtet. Studien in Hinblick auf einen Zusammenhang zwischen dem CYP11B2 -344C/T-Polymorphismus und der LVM ergaben ebenfalls widersprüchliche Ergebnisse: so wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass das T-Allel mit einer größeren LVM assoziiert ist, sowohl bei Probanden mit Bluthochdruck (Schunkert et al., 1997; Stella et al., 2004), als auch bei HCM-Patienten (Chai et al., 2006). Andere Studien fanden stattdessen keinen Zusammenhang zwischen dem CYP11B2 -344C/T-Polymorphismus und der LVM (Ortlepp et al., 2001; Schunkert et al., 1999). Überraschenderweise wurde

sogar eine Assoziation des C/C-Genotyps mit einer größeren LVM bei jungen Erwachsenen ohne klinische Herzerkrankungen beobachtet (Kupari et al., 1998). Isaji et al. (2005) beschrieben einen Zusammenhang zwischen dem -344C/C-Genotyp und der Entwicklung einer salz-sensitiven Herzhypertrophie innerhalb einer japanischen Population. Darüber hinaus wurde bei japanischen Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie ein Zusammenhang zwischen dem C-Allel und einem größeren linksventrikulären Volumen nachgewiesen (Takai et al., 2002).

Diese widersprüchlichen Ergebnisse in Hinblick auf den Einfluss der unterschiedlichen RAAS-Polymorphismen auf die linksventrikuläre Masse von gesunden aber auch von herzkranken Personen könnten zum Teil durch die Heterogenität der untersuchten Populationen zu Stande kommen. So wurden bei manchen Studien männliche und weibliche Probanden zusammen betrachtet, obwohl es Hinweise auf geschlechtsspezifische Unterschiede gibt. Meist wurden die Polymorphismen nur einzeln betrachtet, obwohl es sich bei dem RAAS um ein komplexes Netzwerk von miteinander interagierenden Faktoren handelt. Eine große Querschnittsstudie aller (möglicherweise) LVM-relevanten RAAS-Polymorphismen an ein und demselben Untersuchungskollektiv könnte mehr Aufschluss über den Einfluss der Polymorphismen auf die linksventrikuläre Masse liefern.

### ***2.2.2 Der IGF1-Signalweg***

Wachstumsfaktoren spielen eine entscheidende Rolle bei der Induktion einer Herzhypertrophie (s. Abb.2.2). Einer der wichtigsten Wachstumsfaktoren für das postnatale Wachstum des Säuger-Herz ist der „**Insulin-like growth factor 1**“ (IGF1). IGF1 ist ein einzelkettiges Peptidhormon, das eine strukturelle Homologie mit Proinsulin aufweist und zu den Zytokinen gehört. So zeigt IGF1 neben Insulin-ähnlichen kurzfristigen Effekten auf den Metabolismus auch Wachstumsfaktor-ähnliche langfristige Effekte auf die Proliferation und Differenzierung verschiedener Zelltypen, und ist allgemein an der Regulation der Körper- und Organgröße während der fötalen und postnatalen Entwicklung beteiligt. Dabei kann IGF1 sowohl endokrin als auch parakrin bzw. autokrin wirken, weshalb IGF1 auch eine gewebespezifische Rolle beispielsweise im Myokard zukommt. Im Unterschied zu anderen Wachstumsfaktoren ist IGF1 mit spezifischen Bindungsproteinen (IGFBP 1 bis 6) im Plasma und Gewebe assoziiert, die anscheinend die wirksame Konzentration sowie die biologische Aktivität von IGF1 regulieren (Jones and Clemmons, 1995; Reiss et al., 1996; Ren et al., 1999).

Die Wirkung von IGF1 wird über einen membranständigen Enzym-gekoppelten Rezeptor vermittelt, den **IGF1-Rezeptor (IGF1R)**. Hierbei handelt es sich um eine heterotetramere Rezeptor-Tyrosin-Kinase, die aus je zwei  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten besteht und dem Insulin-Rezeptor sehr ähnelt. Über die IGF1-Rezeptoren, die sowohl im fötalen als auch im adulten Herz exprimiert werden, beeinflusst IGF1 das Herzwachstum durch Erhöhung der kardialen DNA- und Protein-Synthese, sowie durch Reduktion des Protein-Abbaus (Ren et al., 1999). Auf diese Weise vermittelt IGF1 sowohl die Proliferation der Kardiomyozyten während der Herzentwicklung (fötales Herzwachstum) als auch die Volumenzunahme (Hypertrophie) der Kardiomyozyten beim adulten Herz (postnatales Herzwachstum).

Obwohl IGF1 eine Vielzahl von Signalwegen aktivieren kann, scheint der Weg über die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K; Klasse I<sub>A</sub>), die aus einer regulatorischen p85- und einer katalytischen p110 $\alpha$ -Untereinheit besteht, der Schlüssel-Signalweg für das Herzwachstum zu sein. Dabei wird der IGF1-Rezeptor durch die Bindung von IGF1 aktiviert und es erfolgt die Phosphorylierung des Insulin-Rezeptor-Substrats 1 (IRS1), das seinerseits an die regulatorische Untereinheit (p85) der PI3K bindet und diese aktiviert. Die Protein- und Lipid-Kinase PI3K wiederum katalysiert die Phosphorylierung des Membranbestandteils Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP3), was zur Aktivierung der Protein Kinase Akt (Proteinkinase B, PKB) führt. Akt setzt dann eine Transduktionskaskade in Gang, die letztendlich den Glukose-Metabolismus und die Proteinsynthese sowie das Zellwachstum stimuliert. Darüber hinaus ist Akt ein zentrales Element im „Survival-Pathway“ der Zelle, da sie verschiedene Apoptose-auslösende Faktoren hemmt. Auf diese Weise kann IGF1 die Herzmuskelmasse zusätzlich über Unterdrückung des programmierten Zelltods beeinflussen (Force et al., 2002; Toker and Cantley, 1997).

Neben seiner Rolle beim Herzwachstum hat IGF1 auch einen Einfluss auf die Herzfunktion, indem es die Kontraktilität der Kardiomyozyten steigert (McMullen and Jennings, 2007; Ren et al., 1999).

Transgene Mäuse mit erhöhter kardialer IGF1/PI3K(p110 $\alpha$ )-Aktivierung entwickeln eine Herzhypertrophie mit normaler Lebenserwartung und normaler bzw. verbesserter Herzfunktion. Umgekehrt zeigen Mäuse mit einer reduzierten kardialen IGF1/PI3K(p110 $\alpha$ )-Aktivierung signifikant kleinere Herzen mit beeinträchtigter Kontraktionsfähigkeit (McMullen et al., 2004; Reiss et al., 1996; Shioi et al., 2000).

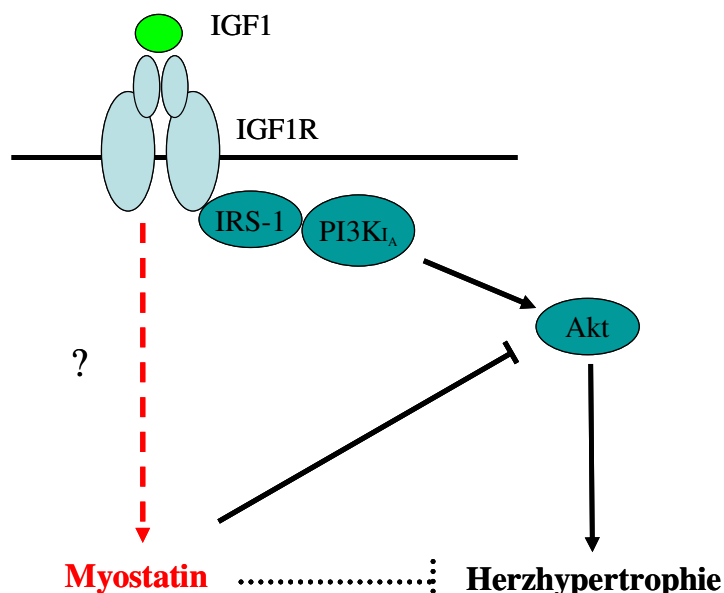
Bemerkenswerterweise wird IGF1 durch körperliches Training vermehrt freigesetzt. So ist laut Neri Serneri et al. (2001) die kardiale Bildung von IGF1, und nicht die von AngII, bei Berufssportlern höher als bei Kontrollen. Somit scheint der IGF1-Signalweg eine essenzielle Rolle besonders bei der Entwicklung einer physiologischen Herzhypertrophie zu spielen.

Im Jahre 2005 zeigten Shyu et al., dass Myostatin einen negativen Regulator des kardialen IGF1-Signalwegs darstellt. **Myostatin (growth differentiation factor 8, GDF8)** zählt zur TGF $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ )-Superfamilie, die eine wichtige Rolle bei der Regulation von Wachstums- und -Differenzierungsprozessen spielt. Es handelt sich um ein extrazelluläres Signalmolekül, das 1997 als Inhibitor des Skelettmuskel-Wachstums bekannt wurde (McPherron et al., 1997). Tierversuche zeigten, dass ein Myostatin (Mst)-„knockout“ zu einem dramatischen Anstieg der Skelettmuskel-Masse führt (McPherron and Lee, 1997). Umgekehrt ist bei Patienten mit einer HIV-Infektion ein erhöhter Mst-Spiegel mit einem deutlichen Muskelschwund assoziiert (Gonzalez-Cadavid et al., 1998). Zusätzlich wurde bei einem Jungen mit einer homozygoten „loss-of-function“-Mutation (IVS1+5G/A) im Mst-Gen eine im Vergleich zu anderen Jungen seines Alters dramatisch vermehrte Muskelmasse festgestellt. Seine Mutter, eine ehemalige Berufssportlerin, war heterozygote Trägerin der Mutation (Schuelke et al., 2004).

1999 entdeckten Sharma et al., dass Myostatin (Mst) ebenfalls im Herzmuskel exprimiert wird, sowohl im fötalen als auch im adulten Herz. Mst wird dort in den Kardiomyozyten gebildet und es wurde beschrieben, dass seine Expression nach einem Herzinfarkt hochreguliert wird (Sharma et al., 1999). Zusätzlich wurde in hypertrophierten Herzen mit transgener Überexpression der Kinase Akt eine starke Hochregulation der Mst-Expression beobachtet (Cook et al., 2002). Passend hierzu zeigten Shyu et al. (2005), dass eine zyklische mechanische Dehnung, die in vitro ein Kardiomyozyten-Wachstum auslöst, zu einer Mst-Überexpression führt. Es handelt sich anscheinend um einen Kompensationsmechanismus zu der durch die Dehnung induzierten Hypertrophie-fördernden IGF1-Sekretion. Dabei wird die IGF1-induzierte Protein-Synthese durch Co-Stimulation mit Mst gehemmt (Abb.2.4). Dies lässt vermuten, dass es sich bei Mst um ein sog. Chalon handeln könnte, das das Herzwachstum kontrolliert. Chalone bieten einen negativen Feedback-Mechanismus, um die Masse eines Gewebes, von dem sie sezerniert werden, zu kontrollieren.

Allgemein handelt es sich bei Chalonen um wachstumshemmende Proteinkomplexe, die man in nahezu allen Organen finden kann.

Es wird vermutet, dass bereits eine normale IGF1-Konzentration eine adaptive Herzhypertrophie ermöglicht, dass jedoch eine übermäßige IGF1-Produktion gleichzeitig zur Freisetzung von Myostatin führt, das dann nach Erreichen eines Schwellenwertes die hypertrophische Antwort zu limitieren scheint (Gaussin and Depre, 2005). Morissette et al. (2006) zeigten, dass Mst-defiziente Kardiomyozyten von Mäusen eine verstärkte hypertrophische Antwort auf eine chronische Infusion mit Phenylephrin, einem Sympathomimetikum, in vitro und in vivo aufweisen. Zusätzlich fanden sie heraus, dass Mst das Kardiomyozyten-Wachstum anscheinend über Inhibierung der Akt bzw. der p38 MAP-Kinase reguliert.



**Abb.2.4:** Vereinfachte Darstellung des IGF1-Signalwegs und dessen mögliche Hemmung durch Myostatin.

Bei einer normalen IGF1-Konzentration induziert die Bindung von IGF1 an den IGF1-Rezeptor die PI3K/Akt-Signalkaskade, die eine adaptive Herzhypertrophie verursacht. Bei übermäßiger IGF1-Produktion wird gleichzeitig das Chalon Myostatin aktiviert, das über Hemmung der Akt-Phosphorylierung regulierend in den IGF1-Signalweg eingreift und der hypertrophischen Antwort des Herzens entgegenwirkt.

Mst greift im Herz anscheinend sowohl in die Kardiomyozyten-Proliferation als auch in das –Wachstum ein (McKoy et al., 2007). Dies konnte allerdings in einer Studie von Cohn et al. (2007) an Mst-„knockout“-Mäusen nicht bestätigt werden, wobei in diesem Fall allerdings auch keine hypertrophischen Stimuli benutzt worden sind.

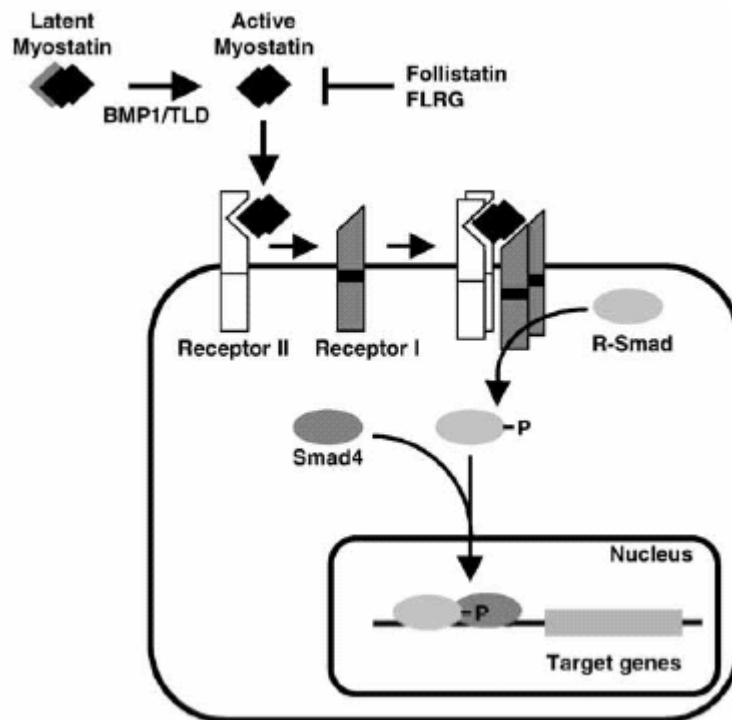
---

Wie andere Mitglieder der TGF $\beta$ -Familie, wird Myostatin als ein Vorläuferprotein synthetisiert, das eine Signal-Sequenz, eine N-terminale Propeptid-Domäne und eine C-terminale Domäne besitzt, die den aktiven Liganden darstellt (Hill et al., 2002; McPherron et al., 1997). Eine proteolytische Spaltung zwischen der Propeptid-Domäne und der C-terminalen Domäne setzt das reife Myostatin frei. Myostatin wird als ein latenter Komplex sezerniert, wobei das Propeptid nicht-kovalent mit einem Homodimer der reifen C-terminalen Domäne assoziiert bleibt (Walsh and Celeste, 2005). Zusätzlich zu dem inhibitorischen Propeptid kann Myostatin auch an inhibitorische Proteine wie Follistatin und das „Follistatin-related gene“ (FLRG) gebunden sein. Mittels proteolytischer Spaltung durch bestimmte Metalloproteasen (BMP1/TLD) wird Mst aktiv. Wie auch andere Mitglieder der TGF $\beta$ -Familie vermittelt Myostatin seine Wirkung durch Bindung an TypII- und TypI-Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren, die ein intrazelluläres Signaling durch Aktivierung von sog. Smad-Proteinen<sup>1</sup> induzieren (Abb.2.5). Die Smad-Proteine dienen als Signalvermittler. Durch Bindung von Myostatin an seinen TypII-Rezeptor (Activin-TypIIB-Rezeptor; ActRIIb), der ebenfalls im Herz-Gewebe exprimiert wird, erfolgt eine Annäherung und Phosphorylierung des TypI-Rezeptors. Dies führt zur Phosphorylierung von Rezeptor-regulierten Smads (R-Smads), die dann einen heteromeren Komplex mit dem Co-Smad Smad4 bilden. Dieser Komplex gelangt in den Zellkern, wo er an die Promotor-Region von verschiedenen Target-Genen binden oder mit unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren interagieren kann, und auf diese Weise die Gen-Expression reguliert (McCroskery et al., 2003; Miyazono et al., 2000).

---

<sup>1</sup> Smad-Proteine = Substrate für alle TGF $\beta$ -Familien Rezeptor-Kinasen. Bisher sind 8 Smads bekannt, die sich in drei Gruppen aufteilen: 1. Rezeptor-assoziierte Smads (R-Smads), bei denen es sich um direkte Substrate der TGF $\beta$ -Rezeptor-Kinasen handelt (Smad1, 2, 3, 5, 8). 2. Co-Smads, die mit den R-Smads während der Signalkaskade assoziieren (Smad4). 3. inhibitorische Smads, die die Aktivität der anderen Smad-Proteine hemmen (Smad6, 7).





**Abb.2.5:** Vereinfachte Darstellung des Myostatin-Signalwegs (aus Gaussin and Depre, 2005).

Durch Myostatin wird u.a. die Expression von p21 hochreguliert. Das p21-Protein gehört zur Klasse der Tumorsupressorproteine, die eine Kontrollfunktion im Zellzyklus besitzen. p21 inhibiert die cdk2 (cyclin-dependent-kinase 2), was zu einer Inhibierung der Kardiomyozyten-Proliferation durch Zellzyklus-Arrest führt. Dies spielt allerdings anscheinend nur während der Herzentwicklung eine Rolle. Im adulten Herzen, in dem die Kardiomyozyten ihre Teilungsfähigkeit verloren haben, scheint Mst lediglich das hypertrophische Wachstum der Kardiomyozyten zu regulieren. Demnach könnte die Fähigkeit von Myostatin, das hyperplastische bzw. das hypertrophische Wachstum zu beeinflussen, vom physiologischen Zustand der Kardiomyozyten abhängen (Artaza et al., 2007; McKoy et al., 2007). Interessanterweise scheint Myostatin zusätzlich in einer Smad-unabhängigen Weise über „mitogen-activated protein kinase“- (MAPK)-Signalwege wirken zu können, wobei diese Mechanismen noch nicht restlos geklärt sind (Philip et al., 2005; Yang et al., 2006).

Somit stellt der IGF1/PI3K-Signalweg, inklusive des negativen Regulators Myostatin, einen essenziellen Mechanismus zur Regulierung des Kardiomyozyten-Wachstums dar.

Auch in einigen Komponenten des IGF1-Signalwegs sind DNA-Polymorphismen bekannt:

so ist in der Promotor-Region des **IGF1-Gens** auf Chromosom 12q23 (4 Exons) ein Dinukleotid-Polymorphismus entdeckt worden, der (CA)<sub>n</sub>-Repeatpolymorphismus, der anscheinend die IGF1-Produktion beeinflusst. Allerdings wurden diesbezüglich kontroverse Ergebnisse gefunden: Rosen et al. (1998) fanden einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem homozygoten Vorliegen des Allels 19 mit 19 Cytosin-Adenin-Wiederholungen (19/19), und einer signifikant geringeren Serum-IGF1-Konzentration bei 116 gesunden Kaukasiern im Vergleich zu allen anderen Genotypen. Da das 19-Allel am häufigsten in der europäischen Bevölkerung vorkommt, wird es als Wildtyp(WT)-Allel angesehen. Umgekehrt zeigten Vaessen et al. (2001) in einer großen Studie an 900 Holländern, dass Nicht-Träger des WT-Allels ( $\neq 19/\neq 19$ ) eine geringere zirkulierende IGF1-Konzentration und Körpergröße aufweisen als Träger des WT-Allels, sowie ein erhöhtes Risiko für Typ2 Diabetes mellitus und einen Herzinfarkt besitzen. Darüber hinaus scheinen Nicht-Träger des WT-Allels anfälliger für die Entwicklung einer LVH zu sein als homozygote WT-Träger (19/19) (Bleumink et al., 2005). Im Gegensatz dazu konnten Allen et al. (2002) keine Assoziation zwischen dem IGF1(CA)<sub>n</sub>-Polymorphismus und der Serum-IGF1-Konzentration bei Männern finden.

Das Gen des IGF1-Rezeptors (**IGF1R**; 15q26; 21 Exons) ist ebenfalls polymorph. Innerhalb von Exon16 an Position 3174 (Codon 1013) ist ein Basenaustausch G  $\rightarrow$  A entdeckt worden, der sich anscheinend auf die IGF1-Konzentration im Plasma sowie auf die Lebenserwartung auswirkt. So scheint das A-Allel mit einer geringeren Plasmakonzentration an freiem IGF1 assoziiert zu sein und vermehrt bei Probanden mit einer höheren Lebenserwartung vorzuliegen (Bonafè et al., 2003). Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass das A-Allel an der Pathogenese einer vaskulären Demenz bei Frauen beteiligt ist (Garcia et al., 2006). Da es sich hierbei um einen „stummen“ Polymorphismus handelt, der keine Veränderung der Aminosäuresequenz verursacht, ist er wahrscheinlich mit einer anderen funktionellen Veränderung gekoppelt. Studien über den Zusammenhang des IGF1R 3174G/A-Polymorphismus und dem Vorliegen einer physiologischen oder pathologischen Herzhypertrophie liegen nach unserem Kenntnisstand bisher nicht vor.

Innerhalb des Myostatin-Gens (**GDF8**; 2q32; 3 Exons) sind bei Tier und Mensch unterschiedliche inhibierende Mutationen entdeckt worden, die sich in einer dramatischen Zunahme des Skelettmuskel-Wachstums auswirken (Kambadur et al.,

1997; Schuelke et al., 2004). Ferrell et al. (1999) identifizierten fünf Polymorphismen innerhalb der kodierenden Sequenz bei Kaukasiern und Afroamerikanern, von denen allerdings nur zwei eine relevante Allelfrequenz in der Bevölkerung aufwiesen. Diese hatten jedoch keinen Einfluss auf die Entwicklung der Muskelmasse bei Krafttraining. Somit sind kaum bzw. keine funktionell relevanten Polymorphismen innerhalb des Myostatin-Gens beim Mensch bekannt. Darüber hinaus sind bisher keine Studien an Myostatin-Polymorphismen in Hinblick auf die Ausprägung einer LVH veröffentlicht worden.

### ***2.2.3 Assoziierte Faktoren und Signalwege***

Zusätzlich zu den Komponenten des RAAS und des IGF1-Signalwegs sind noch viele weitere Faktoren bekannt, die bei der Entwicklung einer Herzhypertrophie eine Rolle spielen. Polymorphismen innerhalb ihrer Gensequenz könnten ebenfalls einen modulierenden Einfluss auf die Ausprägung einer Herzhypertrophie haben. Nahezu alle nachfolgend erwähnten Faktoren stehen in Verbindung mit einem der vorher beschriebenen Signalwege, dem RAAS bzw. dem IGF1-Signalweg. Somit bilden die beschriebenen Faktoren ein großes zusammenhängendes Netzwerk, das die Entwicklung einer adaptiven Herzhypertrophie fördern bzw. hemmen könnte.

#### ***2.2.3.1 Der Androgen-Rezeptor (AR)***

Der X-chromosomale Androgen-Rezeptor (AR; Xq12; 8 Exons) ist ein intrazellulärer Transkriptionsfaktor, der die Wirkung der zu den Steroidhormonen gehörenden Androgene vermittelt. Der AR gehört zur Superfamilie der Kern-Rezeptoren. Es ist bekannt, dass Androgene, wie z.B. Testosteron, auch die Herzstruktur beeinflussen. So kann ein Testosteron-Missbrauch, der im Hochleistungssport oft zur Leistungssteigerung betrieben wird, neben einer erhöhten Skelettmuskel-Hypertrophie auch kardiale Nebeneffekte wie z.B. eine pathologische Herzhypertrophie bewirken (Campbell et al., 1993). Darüber hinaus scheinen Sexualhormone eine entscheidende Rolle bei den erheblichen Geschlechtsunterschieden im kardialen Phänotyp zu spielen, u.a. bei der deutlich größeren linksventrikulären Muskelmasse bei Männern (Hayward et al., 2001). Anhand unterschiedlicher Tiermodelle konnte gezeigt werden, dass das AR-Gen in Herzmyozyten exprimiert wird, und dass auf diese Weise Androgene eine signifikante hypertrophische Antwort bei Herzmyozyten durch einen direkten, Rezeptor-spezifischen Mechanismus hervorrufen können. Andererseits scheint das AR-System auch eine protektive Rolle gegen ein AngII-induziertes aberrantes Herz-Remodeling zu

spielen, indem es die Sekretion von natriuretischen Peptiden (NPs) steigert. NPs greifen ihrerseits hemmend in das RAAS ein, indem sie die beiden Enzyme Renin und Aldosteron-Synthase hemmen (Ikeda et al., 2005; Marsh et al., 1998).

Innerhalb der aminoterminalen Transaktivierungsdomäne des AR sind zwei unterschiedliche transkribierte und translatierte Trinukleotid-Polymorphismen bekannt: der (CAG)<sub>n</sub>-Repeatpolymorphismus, der eine Polyglutaminwiederholung kodiert, und der (GGC)<sub>n</sub>-Repeatpolymorphismus, der eine Polyglycinwiederholung kodiert. Beide Polymorphismen liegen gekoppelt nur etwa 1kb auseinander und sind funktionell relevant.

Bei dem in Exon1 5'-gelegenen **(CAG)<sub>n</sub>-Repeat** kann man innerhalb der Normalbevölkerung Längen von 9-37 CAG-Wiederholungen finden, wobei bei Europäern 21 Wiederholungen am häufigsten vorkommen (Edwards et al., 1992; Röpke et al., 2004). Längere CAG-Repeats führen zu einer verminderten Aktivität des AR, wohingegen kürzere CAG-Repeatlängen mit einer verstärkten Aktivität assoziiert sind. Es gibt mittlerweile Hinweise, dass der Zusammenhang nicht völlig linear ist, sondern dass bestimmte Repeatlängen innerhalb des Normbereichs (z.B. n=15 bzw. n=17) die AR-Aktivität besonders stark erhöhen (Ding et al., 2004).

Bei dem in Exon1 3'-gelegenen **(GGC)<sub>n</sub>-Repeatpolymorphismus**, der weniger polymorph ist als der (CAG)<sub>n</sub>-Polymorphismus, wurden in der Normalbevölkerung 3-30 Wiederholungen gefunden, wobei 17 am häufigsten zu finden sind. Auch in diesem Fall ist die Repeatlänge invers assoziiert mit der Aktivität des AR: ein kürzerer (GGC)<sub>n</sub>-Repeat ist mit einer höheren AR-Aktivität assoziiert als ein längerer (Binnie et al., 2005; Sleddens et al., 1993).

Ein besonders aktiver AR wird u.a. mit dem frühen Auftreten und einem höheren Rezidivrisiko eines Prostata-Karzinoms in Verbindung gebracht. Systematische Untersuchungen in Hinblick auf kardiale Veränderungen sind bisher nicht bekannt.

#### 2.2.3.2 Das B-Typ natriuretische Peptid (BNP)

Eine weitere Gruppe von kardialen Peptidhormonen, die natriuretischen Peptide (NPs), haben einen regulatorischen Einfluss auf den Kreislauf und die Herzgröße. Zu ihnen gehören das atriale natriuretische Peptid (ANP), das zerebrale bzw. B-Typ natriuretische Peptid (BNP) und das C-Typ natriuretische Peptid (CNP). ANP wird hauptsächlich im Atrium gebildet, während BNP überwiegend im Ventrikel gebildet wird. Die Bildung

von CNP erfolgt primär im zentralen Nervensystem und in den vaskulären Endothelzellen.

Bei Überbelastung und Hypertrophie des Myokards wird die (verstärkte) Expression von ANP und BNP induziert. Deshalb werden ANP und BNP auch als Hypertrophiemarker angesehen (Su et al., 1999).

ANP wird von den atrialen, BNP von den ventrikulären Myozyten synthetisiert und sezerniert, wobei sie zunächst als Vorläuferpeptide, proANP bzw. proBNP, vorliegen. Bei der Sekretion werden dann die Vorläuferpeptide in das inaktive N-terminale NT-proANP bzw. -proBNP und die aktiven Peptide gespalten. Die natriuretischen Peptide wirken über Stimulierung von Enzym-gekoppelten Rezeptoren mit Guanylylcyclase-Aktivität, was zu einer Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) und zur Abnahme der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration führt (Rosenkranz et al., 2003). ANP und BNP hemmen zusätzlich die Produktion von Renin und Aldosteron und antagonisieren darüber hinaus die zentralen Effekte von AngiotensinII (Friedl et al., 1998; Ito et al., 2003). Des Weiteren verbessern sie über die Senkung der myokardialen Vor- und Nachlast die linksventrikuläre (LV) Funktion. Transgene Tier-Modelle zeigten, dass ein ANP bzw. BNP „knockout“ zu einer Herzhypertrophie und Fibrose führt. Im Gegensatz dazu wirkt eine Überexpression einer Kardiomyozyten-Hypertrophie entgegen (Burnett und Olson, 2007; London, 2006; Rosenkranz et al., 2003). Obwohl sowohl ANP als auch BNP von erheblicher Bedeutung für eine Herzhypertrophie zu sein scheinen, wurde im Gegensatz zum ANP das BNP-Gen, das auf Chromosom 1 (1p36) lokalisiert ist und 3 Exons besitzt, bisher anscheinend nicht systematisch auf funktionell relevante Polymorphismen untersucht.

#### 2.2.3.3 Der $\beta_1$ -adrenerge Rezeptor ( $\beta_1AR$ )

Sowohl körperliches Training, als auch eine Herzhypertrophie gehen mit einer erhöhten Sympathikus-Aktivierung einher. Diese führt zur Freisetzung von Katecholaminen, z.B. Adrenalin und Noradrenalin, welche  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren stimulieren. Der  $\beta_1AR$  stellt den Hauptrezeptor für Katecholamine im Herz dar und gehört zu den Gs-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Diese vermitteln über Adenylatzyklase-(AC)-Aktivierung und Stimulierung der cAMP-Produktion positiv chronotrope und positiv inotrope Effekte. Eine Überexpression des  $\beta_1AR$  im Herz transgener Mäuse führt zunächst zu einer verstärkten Kontraktilität, die jedoch langsam in eine Herzhypertrophie mit massiver Fibrose übergeht (Bisognano et al. 2002; Frey and Olson, 2003). Außerdem wird die Renin-Sekretion durch renale  $\beta_1ARs$  vermittelt,

wodurch das  $\beta_1$ -adrenerge System zusätzlich einen Einfluss auf das RAAS hat (Bruck et al., 2005).

Auch der  $\beta_1$ AR ist polymorph: innerhalb des Gens des  $\beta_1$ AR (ADRB1), das auf Chromosom 10 (10q25) lokalisiert ist und aus nur einem Exon besteht, ist ein „gain-of-function“-Polymorphismus bekannt, bei dem es sich um einen Basenaustausch Guanin  $\rightarrow$  Cytosin an Position 1165 handelt, der zu einem Aminosäureaustausch Glycin (G)  $\rightarrow$  Arginin (R) in Codon 389 führt. Diese Region ist wichtig für die G-Protein-Bindung. Interessanterweise scheint die unterrepräsentierte G(Glycin)-Variante den Wildtyp-Rezeptor darzustellen. Mason et al. (1999) fanden heraus, dass der R389- $\beta_1$ AR eine höhere basale Adenylatzyklase-Aktivität und eine stärkere Bindung an das Gs-Protein hat als der G389- $\beta_1$ AR. In einer neueren Studie von Bruck et al. (2005) wurde gezeigt, dass eine Stimulierung mit dem  $\beta_1$ AR-Agonisten Dobutamin bei Trägern des R/R- $\beta_1$ AR zu einer signifikant höheren Plasma-Renin-Aktivität (PRA) führt als bei Trägern des G/G- $\beta_1$ AR; d.h. die PRA wird durch den G389R-Polymorphismus im  $\beta_1$ AR beeinflusst. Yuan et al. (2006) konnten keinen Einfluss des  $\beta_1$ AR G389R-Polymorphismus auf die Entwicklung einer LVH bei Patienten mit einer essenziellen Hypertonie finden. Ein Zusammenhang mit einer physiologischen Herzhypertrophie wurde bisher anscheinend nicht untersucht.

#### 2.2.3.4 Das Troponin T (TNNT2)

Bei der myokardialen Hypertrophie kann ein Anstieg der Konzentration kontraktiver Proteine, sowie die Induktion von Isoformen kontraktiver Proteine beobachtet werden (Chien et al., 1991). Außerdem spielt die intrazelluläre Calcium-Konzentration eine zentrale Rolle. Somit scheint der Troponin-Komplex eine entscheidende Bedeutung bei der hypertrophischen Antwort der Kardiomyozyten zu haben. Der Troponin-Komplex ist ein Calcium-Sensor-Mechanismus, der die Kontraktion von gestreiften Muskeln reguliert. Er besteht aus 3 Proteinen: dem Troponin C, das für die Calcium-Bindung verantwortlich ist, dem Troponin I, das die Muskelkontraktion durch Inhibierung der Interaktion zwischen Actin und Myosin verhindert, und dem Troponin T, das den Troponin-Komplex mit Tropomyosin verbindet. Somit ist der Troponin-Komplex wichtig für die sarcomere Anordnung und kardiale Kontraktilität und reguliert die Kontraktion des Herzmuskels als Antwort auf Veränderungen der intrazellulären Calcium-Konzentration. Mutationen im Troponin T-Gen (TNNT2) werden u.a. mit einem plötzlichen Herztod („sudden cardiac death“, SCD) und der Entwicklung einer hypertrophen Kardiomyopathie (HCM) in Zusammenhang gebracht (Maron, 2002).

Im menschlichen Herz wurden verschiedene Isoformen von Troponin T (cTnT) gefunden, die durch alternatives Spleißen zustande kommen:

- Isoform cTnT3, bei der Exon5 fehlt (Hauptform)
- Isoform cTnT2, bei der Exon4 fehlt
- Isoform cTnT4, bei der Exon4 und 5 fehlen, und
- Isoform cTnT1, bei der alle Exons vorhanden sind

Alle Isoformen werden im Herz exprimiert, wobei die relative Expression im fetalen, adulten und kranken Herzen variiert (Anderson et al., 1995; Farza et al., 1998). Die genaue physiologische Bedeutung dieses Phänomens ist noch nicht geklärt.

Innerhalb des TNNT2-Gens, das auf Chromosom 1 (1q32) lokalisiert ist und aus 17 Exons besteht, ist ein Polymorphismus bekannt, der das Spleißen des Gens zu beeinflussen scheint. Es handelt sich hierbei um einen Insertions-/Deletions-Polymorphismus in Intron3, bei dem eine 5bp-lange Sequenz (...CTTCT...) entweder vorliegt (I) oder fehlt (D). Dabei führt das D-Allel anscheinend zu einem veränderten Spleißing, das ein Überspringen von Exon4 begünstigt (Farza et al., 1998). Studien an HCM-Patienten zeigten eine Assoziation des D/D-Genotyps mit einer größeren LVM bzw. dass der D/D-Genotyp innerhalb einer Population von HCM-Patienten signifikant häufiger zu finden war als innerhalb der Kontroll-Gruppe (Garcia-Castro et al., 2007; Komamura et al., 2004). Studien in Hinblick auf eine physiologische LVH liegen bisher nicht vor.

### **2.3 Ziele dieser Arbeit**

Auf dem Gebiet der Sportmedizin ist bekannt, dass die individuellen kardialen Anpassungen an ein Ausdauertraining sehr variabel sind. So kann man beobachten, dass trotz eines ähnlichen Umfangs an Ausdauertraining einige Leistungssportler ein Sportherz entwickeln, andere jedoch nicht (Karjalainen et al., 1997). Dieses Phänomen scheint wesentlich durch genetische Faktoren beeinflusst zu sein.

Das Ziel dieser Arbeit war die Suche nach genetischen Polymorphismen, die diese sportbedingten Anpassungsreaktionen des Herzens individuell modifizieren können. Dazu sollten in dieser Studie folgende Systeme auf Polymorphismen untersucht werden:

- Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), bei dem die meisten Polymorphismen bisher nur einzeln und eher unsystematisch an

unterschiedlichen Populationen untersucht worden sind. Außerdem wurden die Untersuchungen überwiegend in Zusammenhang mit einer pathologischen und nicht mit einer physiologischen Herzhypertrophie durchgeführt. Die Ergebnisse sind sehr widersprüchlich.

- Komponenten innerhalb des IGF1-Signalwegs, der anscheinend essenziell für die Induktion einer physiologischen Herzhypertrophie ist. Überraschenderweise wurden die beiden Polymorphismen innerhalb des IGF1- und IGF1R-Gens bisher noch nicht in Hinblick auf eine physiologische Herzhypertrophie untersucht. Auch erschien eine Mutationsanalyse der vollständigen kodierenden, sowie von Teilen der nicht-kodierenden Sequenz des bisher als wenig polymorph angesehenen Myostatin-Gens erforderlich.
- Da bei der Induktion einer Myokardhypertrophie komplexe miteinander interagierende Netzwerke von unterschiedlichen Signalwegen aktiviert werden, sollten darüber hinaus auch noch weitere, assoziierte Faktoren auf Polymorphismen und deren Zusammenhang mit dem Vorliegen bzw. Ausbleiben eines Sportherzens untersucht werden.

Durch die Analyse dieser Polymorphismen sollten folgende Fragen geklärt werden:

1. Gibt es einen Zusammenhang zwischen diesen Polymorphismen und dem Auftreten eines Sportherzens?
2. Beeinflussen sich die Polymorphismen, die in Genen lokalisiert sind, deren Genprodukte in Signalkaskaden miteinander interagieren, in ihren Effekten gegenseitig?
3. Gibt es geschlechtsspezifische Unterschiede bei den Effekten der Polymorphismen auf die Anpassungsreaktionen des Herzens?
4. Läßt sich ein genetisches Profil erstellen, mit dem man vorraussagen kann, ob ein Ausdauersportler ein Sporthertz entwickelt oder nicht?



---

### 3. Material und Methodik

#### 3.1 Material

##### *3.1.1 Lösungen und Puffer*

Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, bei RT aufbewahrt. Alle mit \* gekennzeichneten Lösungen wurden autoklaviert. Lösungsmittel war im Allgemeinen H<sub>2</sub>Odest., Ausnahmen sind angegeben.

##### **Reagenz A\***

10ml 1M Tris, pH 8.0

109,5g Saccharose

1,02g MgCl<sub>2</sub>

10ml Triton X-100

ad 1l mit H<sub>2</sub>O

##### **Reagenz B\***

40ml 1M Tris, pH 8.0

12ml 0,5M EDTA, pH 8.0

876mg NaCl

mit H<sub>2</sub>O auf 95ml auffüllen, autoklavieren, danach 5ml 20% SDS zugeben

##### **0.5M EDTA\*, pH 8.0**

46,5g Na<sub>2</sub>-EDTA

5g NaOH

ad 250ml mit H<sub>2</sub>O

##### **20% SDS**

50g SDS

ad 250ml mit H<sub>2</sub>O

bei 65°C lösen

##### **3M Natriumacetat\*, pH 5,2**

40,81g Natriumacetat×3 H<sub>2</sub>O

ad 100ml mit H<sub>2</sub>O

**5M Natrium-Perchlorat\***

35,12g Natrium-Perchlorat

ad 50ml mit H<sub>2</sub>O**20x TBE\*, pH 8,3**

60,55g Tris

25,7g Borsäure

1,86g Na<sub>2</sub>-EDTAad 250ml mit H<sub>2</sub>O**1M Tris-Lösung\*, pH 8.0**

12,114g Tris

ad 100ml mit H<sub>2</sub>O**Puffer A (Transgenomic bzw. Biosolve)**

0,1M TEAA in HPLC-Wasser

**Puffer B (Transgenomic bzw. Biosolve)**

0,1M TEAA in HPLC-Wasser/Acetonitril 75:25

**Puffer C (Transgenomic bzw. Biosolve)**

8% Acetonitril in HPLC-Wasser

**Puffer D (Transgenomic bzw. Biosolve)**

75% Acetonitril in HPLC-Wasser

**0,0001% Ethidiumbromid-Lösung**auf 1l H<sub>2</sub>O 100µl 1% Ethidiumbromid-Lösung**Stop-Lade-Mix für Agarosegele (5x)**

0,4g Saccharose

200µl 0,5M EDTA

200µl Glycerin

50µl gesättigte Xylencyanollösung

50µl gesättigte Bromphenolblaulösung

ad 1ml mit H<sub>2</sub>O**5x Q-Solution (QUIAGEN)****5M Betain (Sigma)**

### 3.1.2 Kits und Standards

**Tab. 3.1:** verwendete Kits und Standards

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystem
DNA Molecular Weight Marker VI, 0,15-2,1kbp	Roche
DNA Molecular Weight Marker VIII, 19-1114bp	Roche
DNA-Polymerization-Mix dNTPs (je 20mM)	Ge Healthcare
Internal Lane Standard 600 (ILS600)	Promega
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN
Wave High-Range Mutation control Standard	Transgenomic
Wave Low-Range Mutation control Standard	Transgenomic

### 3.1.3 Enzyme

**Tab. 3.2:** verwendete DNA-Polymerasen

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Taq-DNA-Polymerase, 5U/μl	Peqlab
Thermoprime Plus DNA Polymerase, 5U/μl	ABgene
ThermoStart-Taq-Polymerase, 5U/μl	ABgene

**Tab. 3.3:** verwendete Restriktionsenzyme

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
BstXI, 10U/μl	Fermentas
HaeIII, 10U/μl	GIBCO BRL
MnlI, 10U/μl	Fermentas
NcoI, 10U/μl	Fermentas

### 3.1.4 Primer

Die Primer wurden von der Firma Biomers.net synthetisiert und in lyophilisierter, d.h. gefriergetrockneter Form geliefert. Für die fluoreszenzmarkierten Primer wurde entweder 5'-FAM- bzw. 5'-JOE als Farbstoff benutzt.

Tab. 3.4: verwendete Primer

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Schmelzpunkt
ACE for (Rigat et al., 1992)	ctg gag acc act ccc atc ctt tct	74°C
ACE rev (Rigat et al., 1992)	gat gtg gcc atc aca ttc gtc aga t	74°C
ACE for Ins	tgg gat tac agg cgt gat aca g	54°C
ADRB1 for (Mason et al., 1999)	cgc ctc ttc gtc ttc ttc aa	52°C
ADRB1 rev (Mason et al., 1999)	tgg gct tcg agt tca cct gct atc	60°C
AGT for	cac gct ctc tgg act tca ca	51°C
AGT rev	ggg tgg tca cca ggt atg tc	51°C
AGT-174 for	gcg cac aag gtc ctg tct	51°C
AGT-174 rev	ggg tgc tgt cca cac tgg	51°C
AGTR1 for	ccg ccc ctc aga taa tgt aa	52°C
AGTR1 rev	ttg caa aag gaa aga aaa gc	49°C
ARA-1	tcc aga atc tgt tcc aga gcg tgc	74°C
ARA-1 FAM <sup>1</sup> -gelabelt	tcc aga atc tgt tcc aga gcg tgc	74°C
ARA-2	gct gtg aag gtt gct gtt cct cat	72°C
AR-GGN for	gga gaa ccc gct gga cta c	51°C
AR-GGN for JOE <sup>2</sup> -gelabelt	gga gaa ccc gct gga cta c	51°C
AR-GGN rev	cca ggg tac cac aca tca gg	52°C
AT2R for	aga gat ctg gtg cta tta cg	44°C
AT2R rev	cac ttg aag act tac tgg ttg	44°C
BKR for	ctg ggc agg agt gca gag	51°C
BKR rev	ttc agt cgc tcc ctg gta ct	51°C
BNP-Ex1 for	gtc tcc acc tcc cac gtc	49°C
BNP-Ex1 rev	ctt tca ttg ctg ctg tcc aa	51°C
BNP-Ex2 for	gag gcc ctc atc ttt cct tt	52°C
BNP-Ex2 rev	caa caa acc cca aag tga ctc	51°C
BNP-Ex3 for	gtg gca cac gat gag gta ag	50°C
BNP-Ex3 rev	tca cag ggc ttt gtg gtt tt	52°C
CMA for (Pfeufer et al., 1996)	gga aat gtg agc aga tag tgc agt c	56°C
CMA rev (Pfeufer et al., 1996)	aat ccg gag ctg gag aac tct tgt c	60°C
CYP11B2 for (Kupari et al., 1998)	cag gag gag acc cca tgt gac	55°C
CYP11B2 rev (Kupari et al., 1998)	cct cca ccc tgt tca gcc c	56°C
GDF8 Ex1a for	aac ctc tga cag cga gat tca	51°C
GDF8 Ex1a rev	ttg aag att tag tgt ttt gtc tcc a	52°C
GDF8 Ex1b for	tgc tgg tcc agt gga tct aaa	52°C
GDF8 Ex1b rev	aac act aga aca aca gtc agc aga a	52°C
GDF8 Ex2a for	tgg agg ggt ttt gtt aat gg	52°C
GDF8 Ex2a rev	cct tgt acc gtc ttt cat agg ttt	53°C
GDF8 Ex2b for	caa taa agt agt aaa ggc cca act	50°C
GDF8 Ex2b rev	ggg aat ttg tag cta ttt tcc a	50°C
GDF8 Ex3a for	aaa gtg ttt cca ggc cta ttg a	52°C
GDF8 Ex3a rev	aaa tct cat gag cac cca ca	50°C
GDF8 Ex3b for	tgc tat att tta atg gca aag aac a	52°C
GDF8 Ex3b rev	tgc tgc acc atc cct att tt	52°C
GDF8 Ex3c for	tca ttc gaa tca tcc tta aac a	49°C
GDF8 Ex3c rev	aaa aag gag aca ctt att tac aaa aca	52°C
GDF8 Ex3d for	aca ctg cct ttg caa cac tg	51°C
GDF8 Ex3d rev	ttt gca agt att aaa ata atg gaa cg	53°C
GDF8 Ex3e for	tga tgg ctg tat aaa gtg aat ttg a	53°C
GDF8 Ex3e rev	aaa gtg aaa atc aga aat cca gaa	51°C

GDF8 IVS1 for	cac tcc ggg aac tga ttg at	51°C
GDF8 IVS1 rev	tca tgc aat ctt gaa aaa gag aa	51°C
IGF1 for (Vaessen et al., 2001)	acc act ctg gga gaa ggg ta	50°C
IGF1 for JOE <sup>2</sup> gelabelt	acc act ctg gga gaa ggg ta	50°C
IGF1 rev (Vaessen et al., 2001)	gct agc cag ctg gtg tta tt	49°C
IGF1R for (Balogh et al., 2006)	cag ggg tcg ttt ggg atg gtc	60°C
IGF1R rev (Balogh et al., 2006)	cct gtg ctg cat ttt ggc ttt tc	60°C
TNNT2 for	tct cag gga gca gga agg ta	51°C
TNNT2 rev	tca gct gag agt gag gag ca	51°C

<sup>1</sup>: 6-FAM=6-Carboxy-Fluorescein (blau); <sup>2</sup>: JOE=2,7-Dimethoxy-4,5-dichloro-6-carboxyfluorescein (grün)

#### Eingesetzte Konzentrationen:

Stammlösungen: 100pmol/μl

#### Gebrauchslösungen:

- für PCR: 10pmol/μl
- für GeneScan-Analyse (gelabelte Primer): 5pmol/μl
- für Sequenzierungs-Reaktionen: 1pmol/μl

Die Lagerung der Primer, sowohl der Stammlösungen als auch der Arbeitslösungen erfolgte bei -20°C (± 5°C).

### 3.1.5 Geräte und Software

**Tab. 3.5:** verwendete Geräte bzw. Software

<b>Gerät/Software</b>	<b>Hersteller</b>
Bio-Imaging-Control-Software Argus X1 V.3	Biostep GmbH Jahnsdorf
Digitalkamera C4040 ZOOM	Olympus
DNA Sequencing Analysis Software V. 3.4	Applied Biosystems
Electrophoresis Power Supply E143	Consort
Gelkammer klein	CTI
Gelkammer mittel	CTI
Heizblock HBT-2 131	HLC
Mikroliterzentrifuge Z233M2 mit Rotor 220.87 V05	Hermle
Mikrowelle 9023	Privileg
Navigator® Software 1.6.4	Transgenomic
Peltier Thermal Cycler PTC-100	MJ Research
Peltier Thermal Cycler PTC-200	MJ Research
RNA/DNA Calculator GENEQUANT	Amersham Pharmacia
Überkoprotator 3025	GFL
Universal Zentrifuge mit Rotor 1323	Hettich
UV-Leuchttisch TCP-26.M	Vilber Lourmat
Sequencher ABI310 Genetic Analyzer	Applied Biosystem
SEQUENCHER- Software	Gene Codes Corporation
WAVE MD MDA4000	Transgenomic
Wasserbad W6	Medingen
Wasserbad WB14	Memmert
Zentrifuge Rotofix 32 mit Rotor 1617	Hettich

### 3.1.6 Auswahl und Beschreibung des Untersuchungskollektivs

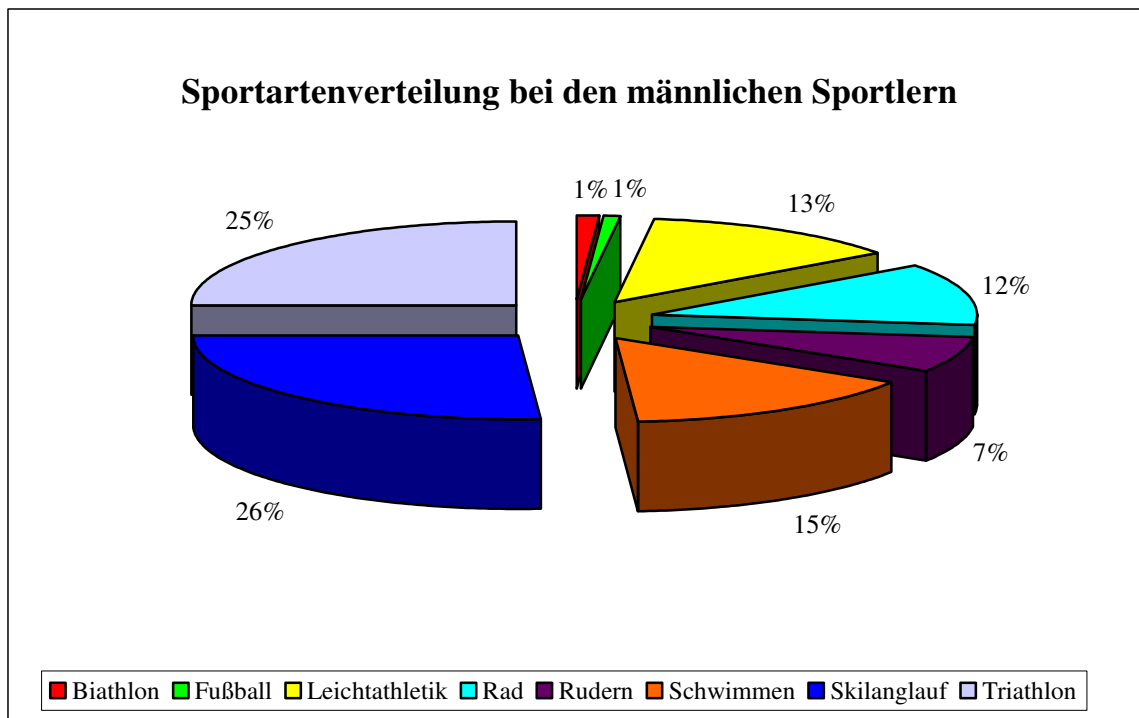
Die molekulargenetischen Untersuchungen wurden an einem Untersuchungskollektiv von 137 Probanden durchgeführt. Tabelle 3.6 zeigt die Zusammensetzung unseres gesamten Untersuchungskollektivs.

**Tab.3.6:** untersuchte Population (n=137)

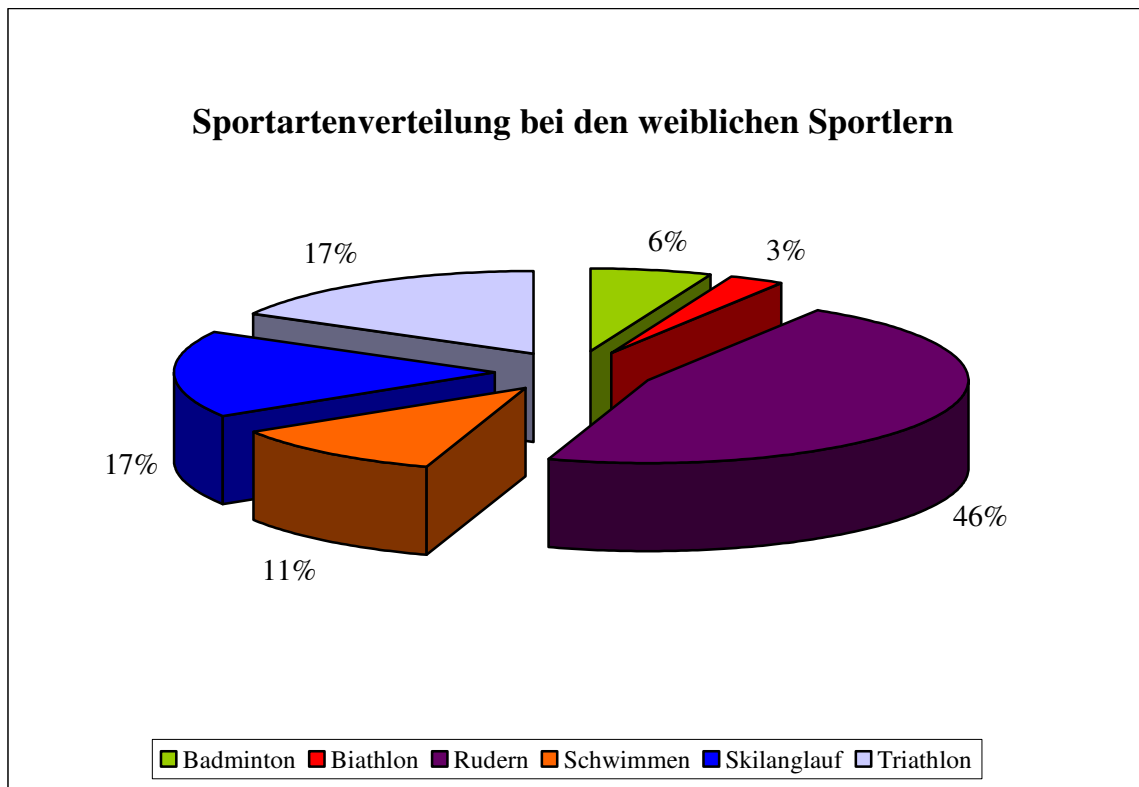
	n	Alter [Jahre]	Gewicht [kg]	Größe [cm]	Training [Jahre]	AT/Woche [h]
Kontrollen (♂)	27	26 ± 4	72 ± 8	178 ± 6	-	-
♀ Sportler	35	20 ± 3	66 ± 6	175 ± 6	7 ± 4	13 ± 4
♂ Sportler	75	23 ± 5	73 ± 8	181 ± 8	9 ± 4	15 ± 6

#### 3.1.6.1 Athletengruppe

Bei den Sportlern handelte es sich um gesunde Leistungssportler, die alle einen hohen Anteil an Ausdauertraining betrieben haben. Aus Abbildung 3.1 und 3.2 lässt sich ablesen, welche Sportarten sich im Untersuchungsgut befinden und wie sie sich prozentual auf die Gesamtheit der Sportler aufteilen.



**Abb.3.1:** Sportartenverteilung im männlichen Sportlerkollektiv (n=75)



**Abb.3.2:** Sportartenverteilung im weiblichen Sportlerkollektiv (n=35)

a) Einschlusskriterien

In die Studie wurden gesunde Kaderathleten (A-, B-, C-Landeskader) im Alter von 15-35 Jahren aufgenommen, die seit mindestens 3 Jahren Leistungssport mit Ausdaueranteil betrieben haben und mindestens 10 Stunden pro Woche trainierten.

b) Ausschlusskriterien

Probanden mit relevanten internistischen Erkrankungen und Auffälligkeiten insbesondere:

- Hypertonie
- Erkrankungen des Klappenapparates
- asymmetrische Hypertrophie, HCM, HOCM, DCM
- Höhergradige Herzrhythmusstörungen
- Kompletter Links- oder Rechtsschenkelblock
- Einnahme von Medikamenten mit möglichem Einfluss auf das Herz-Kreislaufsystem

wurden von der Studie ausgeschlossen.



Weitere Ausschlusskriterien waren:

- Krafttraining >20% des Trainingumfangs
- Trainingsunterbrechungen von mehr als 3 Monaten innerhalb des vergangenen Jahres
- Verwendung von Doping-Substanzen

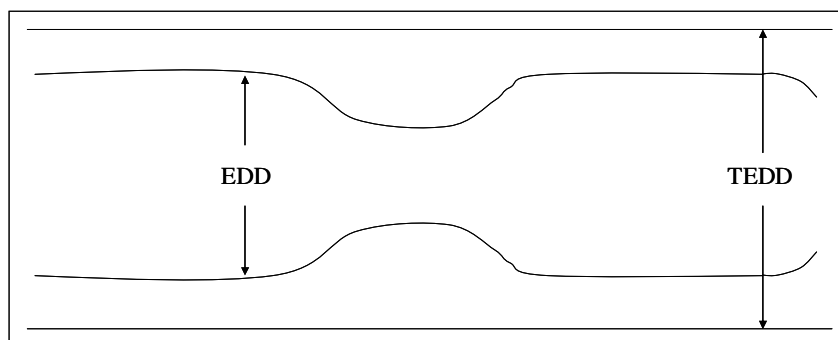
### 3.1.6.2 Kontrollgruppe

Das untersuchte Normalkollektiv setzte sich aus untrainierten gesunden Männern zusammen. Die Studienkriterien erfüllten 27 Probanden, die damit in die Studie aufgenommen wurden.

## 3.2 Methodik

### *3.2.1 Sportmedizinische bzw. kardiologische Untersuchungen*

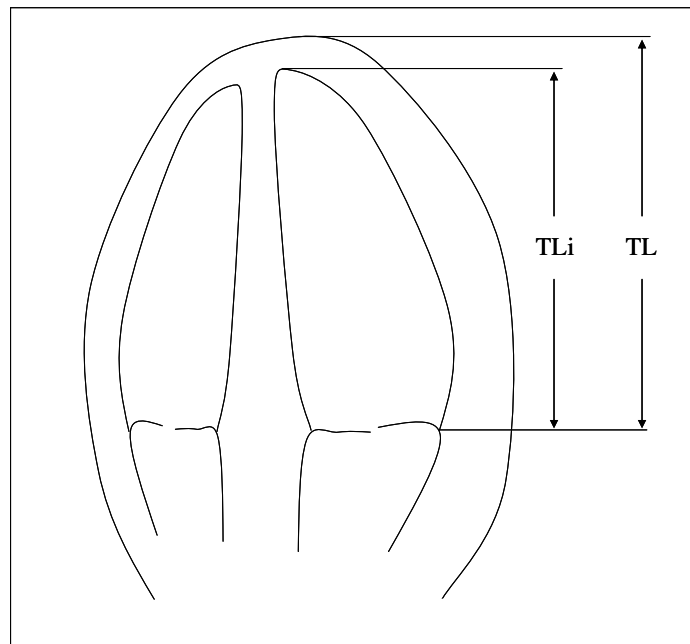
Die sportmedizinischen bzw. kardiologischen Untersuchungen wurden am Institut für Sport- und Präventivmedizin der Universität des Saarlandes und in der Sportmedizinischen Abteilung des Krankenhauses Hellersen durchgeführt und dokumentiert. Hierzu gehörten u.a. konventionelle echokardiographische Routine-Untersuchungen. Auf diese Weise wurden die linksventrikuläre Muskelmasse (LVM; Abb.3.3) und das Herzvolumen (Abb.3.4) bestimmt. Die LVM wird üblicherweise auf die Körperoberfläche (LVM/KOF), das Herzvolumen auf das Körpergewicht (relatives Herzvolumen) bezogen. Zusätzlich wurden den Probanden 10ml EDTA-Blut entnommen und für die molekulargenetischen Analysen bei ca. -20°C bzw. -80°C asserviert.



**Abb.3.3:** Messungen auf der parasternalen langen Achse auf Papillarmuskelebene.

EDD: enddiastolischer Durchmesser des linken Ventrikels

TEDD: totaler enddiastolischer Durchmesser des linken Ventrikels



**Abb.3.4:** Messungen auf der apikalen langen Achse.  
 TL: totale enddiastolische Länge (linker Ventrikel inklusive Myokard)  
 TLi: enddiastolische Länge (linkes Ventrikelcavum)

Es erfolgte eine eindimensionale Bestimmung der LVM nach dem Berechnungsverfahren nach Teichholz (Scharhag et al., 2003):

Mittels M-Mode erfolgte die enddiastolische Bestimmung der Septumdicke (IVS), der Hinterwanddicke (PW) und des Innendurchmessers (EDD) auf Höhe der Papillarmuskeln in der langen parasternalen Achse (Abb.3.3). Die Formel zur Berechnung der LVM im M-Mode nach Teichholz ist nachfolgend aufgeführt:

$$\text{LVM [g]} = 1,05 \left\{ \left[ \frac{7}{2,4 + \text{IVS} + \text{PW} + \text{EDD}} \right] (\text{IVS} + \text{PW} + \text{EDD})^3 - \left[ \frac{7}{2,4 + \text{EDD}} \right] \text{EDD}^3 \right\}$$

### ***3.2.2 Molekulargenetische Untersuchungen***

#### **Arbeiten mit DNA**

##### **3.2.2.1 DNA-Isolierung aus EDTA-Blut**

Zur Gewinnung der DNA ist es wesentlich, die Zellmembranen der kernhaltigen Leukozyten aufzubrechen. Dies erfolgt bei der durchgeführten Methode unter Verwendung des nichtionischen Detergenz Triton X-100. Es zerstört die Zellmembran unter größtmöglicher Schonung der DNA. Zur weiteren Schonung der DNA wird noch Saccharose hinzugegeben, die ein sofortiges Aufplatzen der Zellen verhindern soll.

Diese beiden Stoffe bilden die Grundlage von Reagenz A. Die DNA-Extraktion aus dem Kern erfolgt mit Hilfe von Reagenz B, das als wirksame Bestandteile EDTA und SDS enthält. EDTA entzieht der Membran Magnesiumionen, die wesentlich für deren Stabilität sind, SDS ist eine Detergenz zur Entfernung der Lipidhülle.

Anschließend erfolgt eine Inkubation bei 65°C, wobei die thermische Energie den Zellaufschluss und die Denaturierung störender Proteine wie z.B. DNAsen (= DNA abbauende Enzyme) unterstützt. Dieser Vorgang wird auch durch die in Reagenz B befindlichen Salzionen bzw. durch Zugabe des chaotropen Salzes Natriumperchlorat unterstützt.

Die Aufreinigung der DNA erfolgt mittels Chloroform. Chloroform dient der Entfernung von Proteinen, denn diese amphoteren Moleküle sammeln sich zwischen der hydrophoben Chloroform- und der hydrophilen wässrigen Phase, während die DNA aufgrund ihrer hydrophilen Eigenschaft in der oberen wässrigen Phase verbleibt.

Durch Zugabe von Ethanol wird die Struktur der DNA destabilisiert und sie fällt aus. Dies erfolgt durch die Verdrängung der stabilisierenden Hydrathülle um die Phosphatreste der DNA. Beim Mischen mit Ethanol entstehen zusätzlich Gasbläschen, die letztlich die ausgefällten DNA-Fäden nach oben ziehen. Da die DNA ein langes Faden-Molekül ist, bildet sie viskose, faserartige Ausfällungen, die sich sehr gut überführen lassen.

#### Durchführung:

Es wurden  $\geq 2$ ml zuvor eingefrorenes EDTA-Blut in ein entsprechend beschriftetes 50ml-Falcon überführt, mit Reagenz A auf  $\sim 40$ ml aufgefüllt und kurz gemischt. Das Gemisch wurde ca. 10min bei  $\sim 2500$ rpm zentrifugiert (Rotofix 32 bzw. Universal-Zentrifuge von Hettich), der Überstand vorsichtig in ein entsprechendes Abfallgefäß abgekippt und das Pellet, wenn möglich, kurz abtropfen gelassen. Anschließend wurden 4ml Reagenz B und 1ml 5M Natriumperchlorat zugegeben und das Pellet etwas resuspendiert. Danach folgte eine Inkubation für  $\sim 25$ min bei  $\sim 65^\circ\text{C}$  im Wasserbad W6 (Medingen).

Anschließend wurden  $\sim 5$ ml Chloroform zugegeben, das Gemisch für  $\sim 25$ min auf dem Überkoprotator 3025 (GFL) gedreht und anschließend etwa 10min bei  $\sim 3500$ rpm zentrifugiert. Dabei bildeten sich zwei Phasen, wobei die obere Phase die DNA enthielt. Die obere Phase wurde vorsichtig in ein neues beschriftetes 50ml Falcon überführt,  $\sim 1$

Volumen an 100%-igem Ethanol zugegeben und vorsichtig gemischt. Der DNA-Faden wurde in ein beschriftetes 1,5ml Reaktionsgefäß mit ~1ml 70%-igem Ethanol überführt (→ Waschschrift)

Bei Bedarf wurde das Ethanol entfernt, die DNA an der Luft getrocknet und anschließend in einem entsprechenden Volumen an H<sub>2</sub>O dest. gelöst.

Die Lagerung der DNA erfolgte bei etwa -20°C.

### 3.2.2.2 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Eine gängige Methode zur Bestimmung der DNA-Konzentration ist die Messung der UV-Absorption (A) bei 260nm (korrigiert um den Hintergrund bei 320nm), da hier das Absorptionsmaximum von Nucleinsäuren liegt. Die gelöste DNA bzw. die PCR-Produkte wurden vor der Messung mit Wasser verdünnt und das Wasser gleichzeitig als Referenz benutzt:

DNA-Konzentration (µg/ml) = (A<sub>260nm</sub> - A<sub>320nm</sub>) x 50 (DNA-Extinktionskoeffizient)  
x Verdünnungsfaktor

Die DNA-Qualität, insbesondere die Proteinverunreinigung, wurde durch die Bestimmung des Absorptionsquotienten (Q) bestimmt. Dieser ergibt sich aus den Absorptionswerten bei 260nm (Absorptionsmaximum der DNA) und 280nm (Absorptionsmaximum von Proteinen):

$$Q = (A_{260nm} - A_{320nm}) / (A_{280nm} - A_{320nm})$$

Bei reiner DNA liegt der Quotient zwischen 1,8 und 2,0.

Höhere Werte können ein Hinweis auf denaturierte DNA oder die Anwesenheit von RNA sein, wohingegen niedrigere Werte ein Indiz für Verunreinigungen mit organischen Lösungsmitteln oder Proteinen sind.

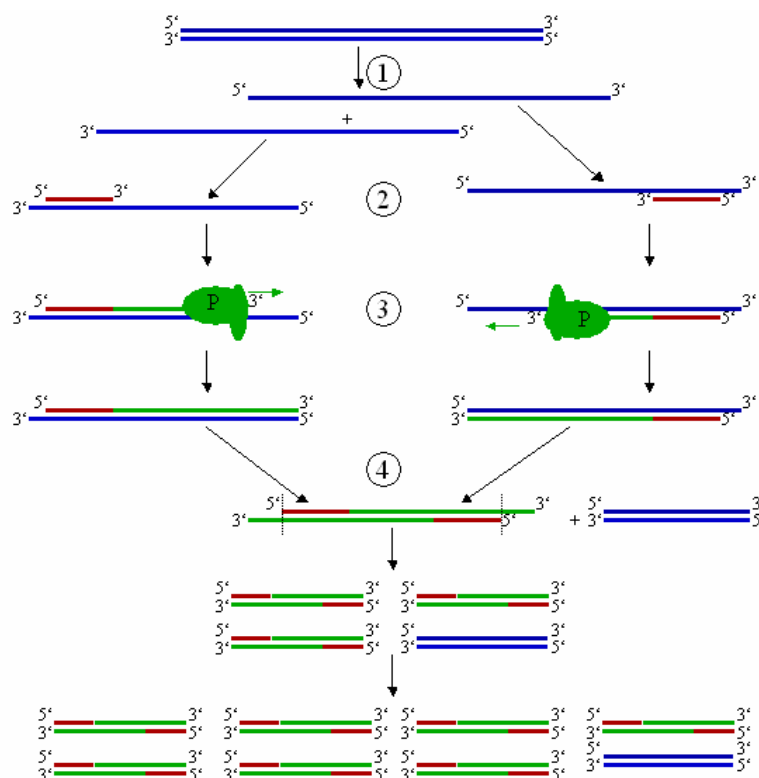
Die photometrischen Messungen wurden mit dem RNA/DNA Calculator GENEQUANT der Firma Amersham Pharmacia durchgeführt.

## Polymorphismus-Analysen

### 3.2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist ein biotechnisches Verfahren zur Vermehrung eines DNA-Abschnitts außerhalb der Zelle (Saiki et al., 1988). Dazu müssen flankierende Sequenzen des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts bekannt sein, zu denen man chemisch komplementäre DNA-Oligonukleotide, sog. Primer, synthetisiert.

Im ersten Reaktionszyklus (Abb.3.5) wird der DNA-Doppelstrang durch Erhitzen auf 94-96°C aufgetrennt („Denaturierung“). Nach Abkühlung können sich die Primer an die DNA anlagern („Annealing“). Schließlich füllt die DNA-Polymerase die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden auf („Elongation“), wobei sie am 3'-Ende des angelagerten Primers beginnt und dann dem DNA-Strang folgt. Als Produkt erhält man zwei neue, doppelsträngige DNA-Moleküle, die für den zweiten Reaktionszyklus wiederum hitzedenaturiert werden. Die Primer werden erneut anhybridisiert und es beginnt ein neuer Vermehrungszyklus. Da in jeder neuen Vermehrungsrunde auch die neusynthetisierten DNA-Stränge als Matritze dienen, kommt es zu einer exponentiellen Erhöhung der Kopienzahl.



**Abb.3.5:** Schematische Darstellung des PCR-Zyklus.

1. Schmelzen (Denaturierung) bei 94-96°C. 2. Anlagerung (Primerhybridisierung) bei spezifischer Temperatur. 3. Verlängerung (Elongation) bei ca. 72°C (P=Polymerase). 4. Der erste Zyklus ist beendet. ([www.biologie.de/w/images/4/4f/PCR-pcr.png](http://www.biologie.de/w/images/4/4f/PCR-pcr.png))

Durchführung:

Die Reaktionen wurden in 200µl-Reaktionsgefäßen angesetzt. Es wurde immer H<sub>2</sub>Oreinst benutzt.

Ansatz für PCR mit Taq-DNA-Polymerase (Peqlab):

~100ng Template-DNA

2µl Primer-Gemisch (Forward- + Reverse-Primer; 10pmol/µl)

5µl 10x PCR-Puffer (Peqlab)

0,25µl dNTPs (20mM, Ge Healthcare)

0,25µl Taq-DNA-Polymerase (5U/µl, Peqlab)

-----  
H<sub>2</sub>O ad 50µl Endvolumen

Ansatz für PCR mit Thermoprime Plus DNA Polymerase (ABgene):

~100ng Template-DNA

2µl Primer-Gemisch (Forward- + Reverse-Primer; 10pmol/µl)

5µl 10x PCR-Puffer (ABgene)

4-6µl MgCl<sub>2</sub> (25mM, ABgene)

5-10µl 5x Q-Solution (QIAGEN) bzw. 5M Betain\* (Sigma)

0,25µl dNTPs (20mM, Ge Healthcare)

0,25µl Thermoprime Plus DNA Polymerase (5U/µl, ABgene)

-----  
H<sub>2</sub>O ad 50µl Endvolumen

\*5M Betain wurde bei PCR-Ansätzen verwendet, die mittels WAVE MD analysiert wurden.

Die allgemeinen Reaktionsbedingungen sind in folgender Tabelle (Tab.3.7) aufgeführt:

**Tab.3.7:** allgemeine Reaktionsbedingungen der PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	94-95°C	5min	1
Denaturierung	94-95°C	1min	35
Annealing	44-64°C	20-45sec	
Elongation	72°C	1min	
Elongation	72°C	10min	1
Aufbewahrung	15°C	∞	

Die Reaktionsbedingungen, insbesondere die Annealing-Temperatur und –Zeit, sind teilweise abhängig von der verwendeten DNA-Polymerase, der Schmelztemperatur der Primer und der Größe der zu amplifizierenden Sequenz. Die Bedingungen wurden den jeweiligen Erfordernissen angepasst und sind in Tab.3.8 aufgeführt.

**Tab.3.8:** spezifische Reaktionsbedingungen der unterschiedlichen PCRs

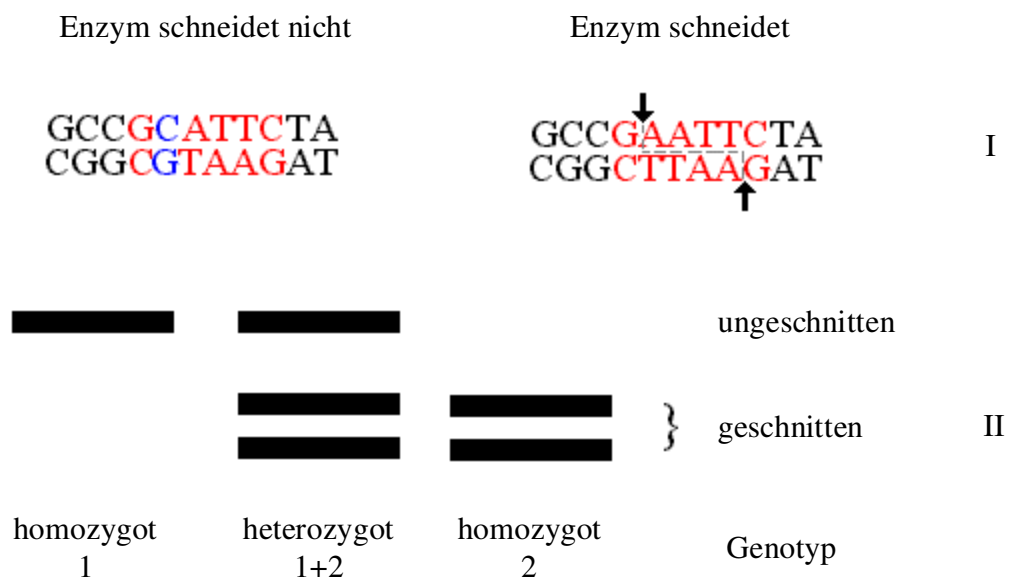
<b>Polymorphismus/Amplifikat</b>	<b>Primerpaar</b>	<b>Annealingtemperatur</b>	<b>Annealingzeit</b>
ACE I/D	ACE for/- rev	58°C	30sec
ACE Ins	ACE for Ins/- rev	60°C	45sec
ADRB1 G389R	ADRB1 for/- rev	50,5°C	30sec
AGT T174M	AGT174 for/- rev	62°C	30sec
AGT M235T	AGT for/- rev	57°C	30sec
AT <sub>1</sub> R 1166A/C	AGTR1 for/- rev	56°C	30sec
AT <sub>2</sub> R 1675G/A	AT2R for/- rev	44°C	30sec
B2BKR 9bpI/D	BKR for/- rev	60,5°C	30sec
CMA -1903G/A	CMA for/- rev	51°C	30sec
CYP11B2 -344C/T	CYP11B2 for/- rev	64°C	20sec
IGF1R 3174G/A	IGF1R for/- rev	56°C	20sec
TNNT2 5bpI/D	TNNT2 for/- rev	61°C	30sec
<b>BNP-Screen</b>			
Amplifikat A1	BNP-Ex1 for/- rev	63°C	45sec
Amplifikat A2	BNP-Ex2 for/- rev	56,5°C	45sec
Amplifikat A3	BNP-Ex3 for/- rev	56°C	45sec
<b>GDF8-Screen</b>			
Amplifikat A1	GDF8 Ex1a for/- rev	55°C	45sec
Amplifikat A2	GDF8 Ex1b for/- rev	55°C	45sec
Amplifikat A3	GDF8 Ex2a for/- rev	55°C	45sec
Amplifikat A4	GDF8 Ex2b for/- rev	55°C	45sec
Amplifikat A5	GDF8 Ex3a for/- rev	55°C	45sec
Amplifikat A6	GDF8 Ex3b for/- rev	55°C	45sec
Amplifikat A7	GDF8 Ex3c for/- rev	55°C	45sec
Amplifikat A8	GDF8 Ex3d for/- rev	55°C	45sec
Amplifikat A9	GDF8 Ex3e for/- rev	55°C	45sec
GDF8 IVS1	GDF8 IVS for/- rev	60°C	30sec

Für die Durchführung wurden die Peltier Thermal Cyclers PTC-100 bzw. -200 von MJ Research benutzt.

### 3.2.2.4 RFLP (Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus)-Analyse

Bei der RFLP-Analyse werden Polymorphismen in einem DNA-Fragment detektiert, die die Erkennungssequenz für ein Restriktionsenzym beeinflussen und somit zur Bildung unterschiedlich langer Restriktionsfragmente führen. Diese können dann mittels Agarose-Gelelektrophorese detektiert werden (Abb.3.6).

Restriktionsenzyme sind bakterielle DNA-spaltende Endonukleasen, die im Inneren der Kettenmoleküle spalten. Die Spaltung erfolgt über eine für das jeweilige Restriktionsenzym spezifische „Erkennungssequenz“, die vier bis acht Nukleotide lang ist. Bei der RFLP-Analyse wird die Erkennungssequenz durch die Mutation entweder gebildet oder geht verloren.



**Abb.3.6** : Prinzip der RFLP-Analyse.

I. Restriktionsverdau: durch den Polymorphismus wird eine Restriktionsschnittstelle entweder gebildet oder geht verloren, d.h. das PCR-Produkt wird vom Restriktionsenzym entweder geschnitten oder nicht.  
II. Auswertung mittels Gelelektrophorese: liegt Allel 1 homozygot vor, wird das Fragment nicht geschnitten. Liegen die Allele 1 und 2 heterozygot vor, so wird Allel 1 nicht geschnitten, jedoch Allel 2, d.h. man erhält das ursprüngliche Fragment und zwei kleiner Fragmente. Liegt Allel 2 homozygot vor, dann werden die Fragmente vollständig geschnitten und man erhält nur noch die beiden kleineren Fragmente. (www.ucl.ac.uk; abgeändert)

Die Reaktionsbedingungen eines Restriktionsverdau sind für jedes Enzym spezifisch. Die Puffer- und Temperaturbedingungen wurden den Herstellerangaben entsprechend gewählt.



Ansatz für einen Restriktionsverdau (10µl):

xµl PCR-Produkt

1µl 10x Restriktionspuffer

0,3µl Restriktionsenzym (10U/µl)

-----  
H<sub>2</sub>O ad 10µl Endvolumen

Die Wahl des jeweiligen Restriktionsenzym war dabei von seiner Erkennungssequenz abhängig. Die Reaktionsbedingungen richteten sich nach dem eingesetzten Restriktionsenzym und sind in Tab.3.9 aufgeführt.

**Tab.3.9:** Reaktionsbedingungen der verwendeten Restriktionsenzyme

<b>Polymorphismus</b>	<b>Enzym</b>	<b>Erkennungssequenz (5'→3')</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Inkubation</b>
AGT T174M	NcoI	C↓CATGG	37°C	>3h
CMA -1903G/A	BstXI	CCANNNNN↓NTGG	55°C	>5h
CYP11B2 -344C/T	HaeIII	GG↓CC	37°C	>3h
IGF1R 3174G/A	MnII	CCTC(N) <sub>7</sub> ↓	37°C	>3h

Die Inkubation erfolgte entweder im Wasserbad WB14 (Memmert) bzw. im Heizblock HBT-2 131 (HLC).

3.2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode, die die Trennung von DNA nach ihrer Fragment-Größe ermöglicht. Die absolute Größe wird hierbei durch Vergleich mit DNA Fragmenten mit definierter Größe (Längenstandard) bestimmt.

Als Trennmateriale dient Agarose, die sich aus glykosidisch verbundener D-Galaktose und 3,6-Anhydrogalaktose zusammensetzt. DNA-Moleküle wandern bei neutralem pH-Wert in einem elektrischen Feld (Gleichstrom) aufgrund der durch geladene Phosphatgruppen bedingten negativen Ladung der DNA vom Minus- zum Plus-Pol. Lineare DNA-Fragmente werden in einem Agarosegel ausschließlich nach ihrer Größe aufgetrennt. Dabei zeigt die Wanderungsgeschwindigkeit der Fragmente im Gel über einen bestimmten Bereich eine logarithmische Abhängigkeit von ihrer Größe.

#### *3.2.2.5.1 Gießen der Agarosegele*

Es wurden je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente 1,5%- bzw. 2,5%-ige Agarosegele verwendet. Dazu wurde die Agarose Seakem LE (Biozym) je nach gewünschter Gelkonzentration in einem Tris-Borat-EDTA-(TBE)-Puffer in der Mikrowelle 9023 (Privileg) aufgeköcht und vollständig gelöst. Nach dem Abkühlen auf etwa 50-75°C wurde die Gel-Lösung luftblasenfrei in einen Gelträger gegossen und der Gelkamm eingesetzt. Nach Erstarren des Gels wurde der Gelkamm vorsichtig herausgezogen, das erstarrte Gel mit dem Gelträger in die entsprechende Gelkammer (klein bzw. mittel der Firma CTI) eingesetzt und mit Laufpuffer (TBE) überschichtet.

#### *3.2.2.5.2 Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese*

Es wurden ~4µl des PCR-Ansatz bzw. Restriktionsverdau und 1µl des Längenstandards (DNA Molecular Weight Marker VI, 0,15-2,1kbp bzw. VIII, 19-1114bp von Roche) mit 3-4µl 5x Stop-Lade-Mix versetzt und die Ansätze in die Geltaschen pipettiert.

Der Stop-Lade-Mix enthält 2 Farbstoffe (Bromphenolblau und Xylencyanol), die sich während des Laufes auftrennen und 2 sichtbare Lauffronten bilden. Anhand der Farbfronten kann das Fortschreiten der Auftrennung beobachtet werden. Bromphenolblau wandert dabei mit doppelsträngiger DNA von etwa 100 Basenpaaren, Xylencyanol mit doppelsträngiger DNA von etwa 5 Kilobasen.

Die verwendete Spannung war abhängig von der Größe der verwendeten Gelkammer und der gewünschten Trennschärfe und betrug zwischen 100 und 150 Volt (Electrophoresis Power Supply E143 der Firma Consort). Die DNA-Banden im Agarosegel wurden anschließend mittels Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht.

#### *3.2.2.5.3 Ethidiumbromid-Färbung der Agarosegele*

Ethidiumbromid wird in der Molekularbiologie zum Anfärben von Nukleinsäuren bei der Gelelektrophorese verwendet. Einzelne Ethidiumbromid-Moleküle interkalieren (vom lat.: intercalare = einschieben) dabei zwischen die Basen der DNA, wodurch sich das Anregungsspektrum von Ethidiumbromid verändert und so die Fluoreszenz der Substanz bei Anregung mit ultraviolettem Licht stark erhöht wird. Auf diese Weise leuchten im Agarosegel die Stellen, an denen sich Nukleinsäuren befinden, hell auf, während Stellen ohne Nukleinsäuren dunkel erscheinen. Die Lichtintensität ist dabei proportional zur vorliegenden DNA-Konzentration, sowie zur Länge der Nukleinsäure. Mit EtBr lassen sich im Gel noch Mengen von nur 50ng DNA detektieren.

### Durchführung:

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurde das Gel 20-45min in einer 0,0001%-igen EtBr-Lösung gefärbt und anschließend auf dem UV-Leuchttisch TCP-26.M der Firma Vilber Lourmat ausgewertet. Die Ergebnisse wurden mit der Digitalkamera C4040 ZOOM von Olympus fotografiert und mittels Bio-Imaging-Control-Software Argus X1 V.3 der Firma Biostep GmbH Jahnsdorf dokumentiert.

### 3.2.2.6 DHPLC (WAVE-Analyse)

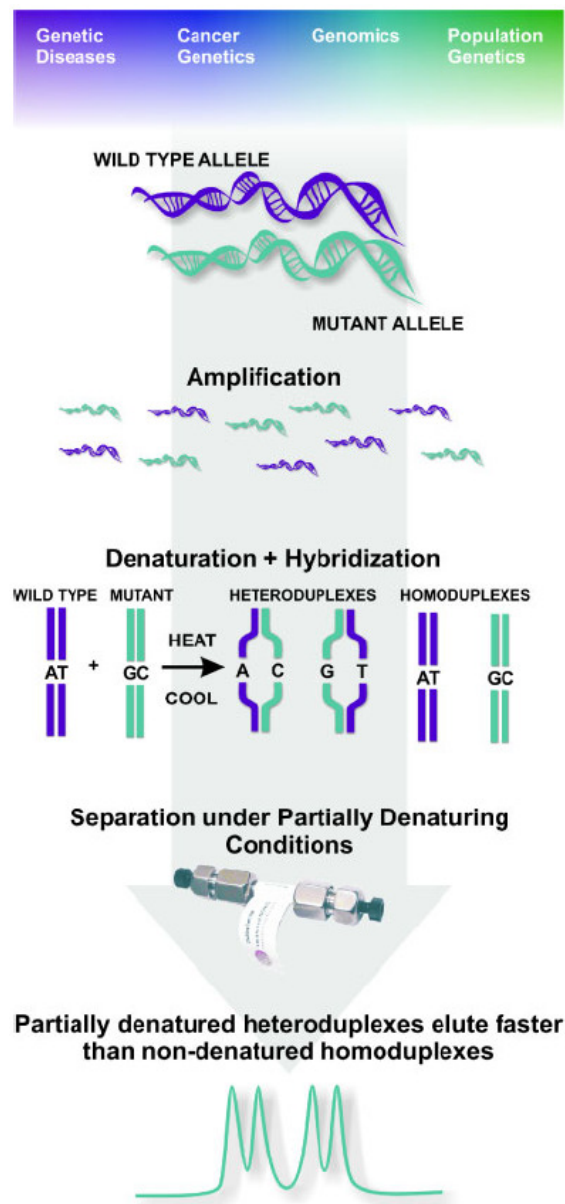
#### *3.2.2.6.1 Prinzip*

Die DHPLC (*denaturing high-performance liquid chromatography*) ist ein Analyseverfahren, das das unterschiedliche Schmelzverhalten von Homo- und Heteroduplex-DNA zur Detektion von Mutationen nutzt.

Zunächst wird der zu untersuchende DNA-Abschnitt mittels PCR amplifiziert. Durch anschließendes Erhitzen der PCR-Fragmente auf 95°C (Denaturierung) und langsames Abkühlen auf Raumtemperatur lagern sich die entstandenen Einzelstränge wieder zu Doppelsträngen zusammen. Trägt eines der beiden Fragmente eine Mutation, so bilden sich äquimolare Mengen an Homoduplices, bei welchen die gegenüberliegenden Basen komplementär sind, sowie Heteroduplices mit Basenfehlpaarungen (Abb.3.7).

Die entstandenen Heteroduplices können nun aufgrund der veränderten physikalischen Eigenschaften der Doppelstrang-DNA mit Hilfe einer hochauflösenden Polymermatrix von den Homoduplices getrennt werden. Dies geschieht mittels Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie (Oefner and Underhill, 1995). Als stationäre Phase dient eine aus alkylierten, hydrophoben Polystyren-Divinylbenzol Partikeln bestehende Säule. In der mobilen Phase übernimmt das amphiphile Molekül TEAA (Triethylammoniumacetat) eine Brückenfunktion, da die DNA nicht direkt an die Oberfläche der hydrophoben Säule binden kann. TEAA bindet DNA über seine positiv geladene Ammonium-Gruppe, während es über seine hydrophoben Ethylgruppen mit dem hydrophoben Säulenmaterial interagiert. Durch eine kontinuierlich ansteigende Acetonitrilkonzentration werden die DNA-Fragmente schließlich von der Säule eluiert, da die Bindung zwischen der Säule und den Alkylketten des TEAA gelöst wird (Dornia, 2006). Dabei hat die Analysetemperatur einen essenziellen Einfluss auf die Bindung der DNA. Bei steigender Temperatur wird die DNA zunehmend einzelsträngig, wodurch ihre Bindung an die Säule schwächer wird. Die DNA wird folglich bei geringerem Acetonitrilgehalt und damit früher von der Säule gewaschen. Heteroduplices sind im

Bereich der Basenfehlpaarung bereits einzelsträngig und denaturieren bei gleicher Temperatur etwas früher als Homoduplexes.

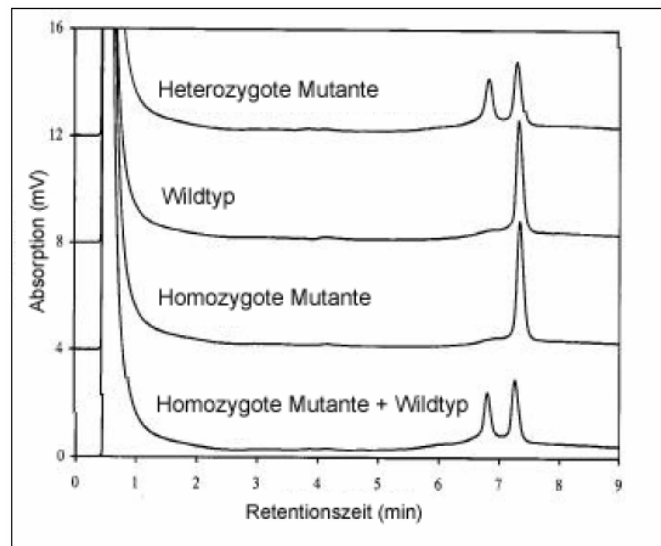


**Abb.3.7:** Prinzip der Mutationsdetektion mittels DHPLC-Analyse am WAVE MD (Transgenomic). Nach der Amplifikation eines spezifischen Allels einer DNA-Probe mit einer heterozygoten Veränderung an diesem Locus, kommt es durch Denaturierung und langsamem Renaturieren zur Heteroduplexbildung. Heteroduplexes haben aufgrund der Basenfehlpaarung eine geringere Schmelztemperatur als Homoduplexes und können unter partiell denaturierenden Bedingungen mittels hochauflösender Säule von den Homoduplexes separiert werden (aus Schollen et al., 2005).

Ein UV-Detektor registriert die eluierte DNA bei einer Wellenlänge von 260nm, die Auswertung erfolgt computergestützt in einem Absorptions-Zeit-Chromatogramm (Abb.3.8).

Im Idealfall sollten bei heterozygoten Mutationsträgern (von Punktmutationen) im Chromatogramm vier Peaks zu erkennen sein, zwei Heteroduplex-Peaks und zwei Homoduplex-Peaks, da sich beide Formen einer Duplexspezies an einer Basenposition voneinander unterscheiden. Tatsächlich ist eine Unterscheidung von vier verschiedenen Fraktionen im Allgemeinen nicht möglich, da der Unterschied der Retentionszeiten meist zu gering ist. Deshalb sind bei den meisten heterozygoten Proben nicht vier, sondern zwei aufeinander folgende Signale erkennbar: der erste verursacht durch die thermolabileren Heteroduplices, der zweite durch die Homoduplices.

Bei homozygoten Probanden bilden sich keine Heteroduplices, es entsteht lediglich ein homogener Peak im Chromatogramm. Durch Zugabe von Wildtyp-DNA in äquimolaren Mengen lässt sich die Mutation jedoch darstellen (Abb.3.8).



**Abb.3.8:** Ergebnisse einer DHPLC-Analyse.

Heterozygote Mutationen erzeugen einen Heteroduplex-Peak, der deutlich vor den Homoduplices eluiert. Durch Mischen mit dem Wildtyp wird bei Homozygoten ein heterozygoter Zustand erreicht (aus Schmitt et al., 2000).

#### 3.2.2.6.2 Bestimmung der DHPLC-Analysetemperaturen

Am Anfang einer jeden Analyse muss die optimale Analysetemperatur bestimmt werden, bei der das unterschiedliche Schmelzverhalten der Homo- und Heteroduplices am größten ist. Dies setzt partiell denaturierende Bedingungen voraus. Aufgrund der Basenfehlpaarung haben Heteroduplices einen geringeren Schmelzpunkt, denaturieren also schon bei niedrigeren Temperaturen als vergleichbare Homoduplices. Bei Temperaturen knapp unterhalb dieses Schmelzpunktes ist demnach die teilweise Denaturierung der Heteroduplices schon weiter fortgeschritten als die der

Homoduplices. Die besten Trennergebnisse liefert die DHPLC bei einer Analysetemperatur, bei der noch 75-95% des Fragments als Doppelstrang vorliegen. Je nach Länge und GC-Gehalt des Fragments liegt diese Temperatur im Bereich zwischen 50°C und 70°C (Dornia, 2006; Oefner and Huber, 2002). Die PCR-Fragmente sollten dabei eine Länge zwischen 200-500bp haben. Sind die Fragmente wesentlich kürzer, so besteht die Gefahr, dass die doppelsträngige DNA über einen zu geringen Temperaturgradienten aufschmilzt. Bei zu langen Fragmenten kann es stattdessen Einbußen in der Sensitivität geben.

Eine Möglichkeit zur computergestützten Bestimmung von DHPLC-Analysetemperaturen bietet die Navigator-Software von Transgenomic. Das Programm ermittelt für ein vorgegebenes PCR-Fragment eine Analysetemperatur. Dabei werden die Schmelzeigenschaften des Fragments graphisch dargestellt. Die vorgeschlagene Temperatur kann gegebenenfalls verändert oder durch zusätzliche Temperaturen ergänzt werden.

#### Durchführung:

Die DHPLC-Analysen wurden an einem WAVE MD<sup>TM</sup> MDA4000 von Transgenomic durchgeführt.

Vor der DHPLC-Analyse wurden die zu untersuchenden PCR-Produkte (250-600bp lang) im PCR-Gerät für 10 Minuten bei 95°C denaturiert und dann langsam auf 64°C abgekühlt (Tab.3.10), wobei sich Heteroduplices bilden konnten.

**Tab.3.10:** Programm zur Denaturierung/Renaturierung von PCR-Amplifikaten

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	94°C	10min	1
Langsames Abkühlen	-0,5°C	30sec	60
Aufbewahrung	15°C	∞	

Die PCR-Reaktionsbehälter (200µl) wurden im Autosampler des Wave-Systems platziert. Je nach Konzentration des PCR-Produkts betrug das Injektionsvolumen 3-9µl. Die Analyse einer Probe, von der Injektion bis zum Erstellen des DHPLC-Chromatogramms, dauerte ca. acht Minuten. Zwei Mutationsstandards (Wave Low-Range Mutation control Standard bzw. Wave High-Range Mutation control Standard, Transgenomic) dienen zur Überprüfung der Ofenkalibrierung. Bei einer definierten

Analysetemperatur (56°C bzw. 70°C) mussten im Chromatogramm vier Peaks in einem bestimmten Zeitintervall erscheinen. Falls notwendig wurde der Ofen neu kalibriert.

Entscheidender Parameter für die Detektionsgenauigkeit der DHPLC-Analyse ist die Temperatur, bei der ein PCR-Produkt untersucht wird.

Die spezifischen Analysetemperaturen für jedes zu untersuchende Fragment wurden mittels Navigator-Software 1.6.4 der Firma Transgenomic ermittelt und sind in Tabelle 3.11 angegeben.

**Tab.3.11:** spezifische Analysetemperaturen der DHPLC-Analysen

<b>PCR-Fragment</b>	<b>Temperatur [°C]</b>
AGT M235T	62,1
AT <sub>1</sub> R 1166A/C	57,7
AT <sub>2</sub> R 1675G/A	55,5
B2BKR 9bpI/D	63,5
ADRB1 G389R	69
TNNT2 5bpI/D	61,5
<b>BNP-Screen</b>	
Amplifikat A1	62,5
Amplifikat A2	63
Amplifikat A3	55
<b>GDF8-Screen</b>	
Amplifikat A1	56
Amplifikat A2	57,5
Amplifikat A3	55
Amplifikat A4	58
Amplifikat A5	56,2
Amplifikat A6	54
Amplifikat A7	54
Amplifikat A8	53
Amplifikat A9	52
GDF8 IVS1	56,5

Alle neuen Sequenzveränderungen wurden mittels Sequenzierung (3.2.2.8) überprüft und charakterisiert. Durch Mischen der so ermittelten Genotypen im Verhältnis 1:1 erfolgte dann die Genotypisierung der anderen Proben.

### 3.2.2.7 Fragmentlängenbestimmung mittels Kapillarelektrophorese

Die Fragmentlängenbestimmung (GeneScan-Analyse) erfolgte mittels Kapillarelektrophorese am Sequencher ABI310 Genetic Analyzer (Applied Biosystem). Mit Hilfe dieser Methode wurde die genaue Anzahl der sog. „short tandem repeats“ (STRs) ermittelt. Als STR wird die Wiederholung kurzer Basenpaar-Muster hintereinander in einem DNA-Strang bezeichnet. Diese Muster bestehen aus 2-6 Basenpaaren und können sehr polymorph sein.

Dazu wurde zunächst mit Hilfe markierter („gelabelter“) Primer ein fluoreszenzmarkiertes PCR-Produkt hergestellt. Anschließend wurde mittels Kapillarelektrophorese (KE) eine exakte Größenbestimmung des jeweiligen Fragmentes am automatischen Sequenziergerät (ABI310) durchgeführt. Während der KE werden die zuvor einzelsträngig gemachten (denaturierten) DNA-Fragmente nach ihrer Länge separiert, indem sie angetrieben durch ein elektrisches Feld durch eine Trennmatrix in einem dünnen Kapillarrohr wandern müssen. Dabei wandern kleinere DNA-Fragmente schneller als größere. Am Ende der Kapillare passieren die DNA-Fragmente ein Kapillarenfenster, an dem die markierten DNA-Fragmente durch Laser-Licht zur Fluoreszenz angeregt werden. Die Fluoreszenzsignale werden in Abhängigkeit von der Zeit als Kapillarelektropherogramm aufgezeichnet (Fluoreszenz-Intensitätspeaks). Zur genauen Bestimmung der DNA-Fragmentlänge wird ein interner DNA-Fragmentlängenstandard benutzt. Die genaue Bestimmung der Anzahl der Triplets erfolgt durch einen speziellen Berechnungsschritt.

#### Durchführung:

##### *3.2.2.7.1 Herstellung fluoreszenzmarkierter PCR-Produkte*

Dazu wurden PCR-Ansätze mit gelabelten Forward-Primern und H<sub>2</sub>Oreinst angesetzt:

#### Ansatz für PCR mit Taq-DNA-Polymerase (Peqlab): (CAG)<sub>n</sub>-Repeat im AR-Gen

50-100ng Template-DNA

0,5µl Primer-Gemisch (ARA1 FAM + ARA2; 5pmol/µl))

2,5µl 10x PCR-Puffer (Peqlab)

0,125µl dNTPs (20mM, Ge Healthcare)

0,125µl Taq-DNA-Polymerase (5U/µl, Peqlab)

-----  
H<sub>2</sub>O ad 25µl Endvolumen



**Tab.3.12:** PCR-Bedingungen für den (CAG)n-Repeat im AR-Gen

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95°C	5min	1
Denaturierung	95°C	45sec	30
Annealing	55°C	30sec	
Elongation	72°C	30sec	
Elongation	72°C	10min	1
Aufbewahrung	15°C	∞	

Ansatz für PCR mit Thermoprime Plus DNA Polymerase (ABgene): (CA)n-Repeat im IGF1-Gen

50-100ng Template-DNA

0,5µl Primer-Gemisch (IGF1 for JOE + IGF1 rev; 5pmol/µl))

2,5µl 10x PCR-Puffer (ABgene)

2µl MgCl<sub>2</sub> (25mM, ABgene)

5µl 5x Q-Solution (QIAGEN)

0,125µl dNTPs (20mM, Ge Healthcare)

0,125µl Thermoprime Plus DNA Polymerase (5U/µl, ABgene)

-----  
H<sub>2</sub>O ad 25µl Endvolumen

**Tab.3.13:** PCR-Bedingungen für den (CA)n-Repeat im IGF1-Gen

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	94°C	10min	1
Denaturierung	94°C	30sec	35
Annealing	55°C	30sec	
Elongation	72°C	30sec	
Elongation	72°C	10min	1
Aufbewahrung	15°C	∞	

Ansatz für PCR mit ThermoStart-Taq-Polymerase (ABgene): (GGC)<sub>n</sub>-Repeat im AR-Gen

~100ng Template-DNA

1µl Primer (AR-GGN JOE for + AR-GGN rev; 5pmol/µl)

2,5µl High-Performance Buffer (ABgene)

2µl MgCl<sub>2</sub> (25mM, ABgene)

5µl 5x Q-Solution (QIAGEN)

1µl 7-Deaza-dNTPs (7-deaza-2'-Deoxyguanosin-5'-Triphosphat (GE Healthcare) + dATP, dCTP und dTTP (Pharmacia Biotech); je 2mM)

0, 125µl ThermoStart-Taq-Polymerase (5U/µl, ABgene)

-----  
H<sub>2</sub>O ad 25µl Endvolumen

**Tab.3.14:** PCR-Bedingungen für den (GGC)<sub>n</sub>-Repeat im AR-Gen

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95°C	15min	1
Denaturierung	95°C	45sec	
Annealing	54,5°C	30sec	35
Elongation	72°C	30sec	
Elongation	72°C	10min	1
Aufbewahrung	15°C	∞	

### 3.2.2.7.2 Analyse am ABI 310

Für die Analyse wurden 0,5µl Längenstandard (Internal Lane Standard 600, Promega) und 24µl H<sub>2</sub>O mit 1-2µl des zu untersuchenden PCR-Produkts versetzt. Die Ansätze wurden für ~4min bei 95°C im Heizblock HBT-2 131 (HLC) denaturiert und bis zum Beladen des Geräts auf Eis gelagert.

Nach der Auftrennung mittels Kapillarelektrophorese erfolgt die Alleldetermination mittels Software 310 Genescan® durch den Vergleich der Amplikons mit dem internen Größen-/Längen-Standard.

### 3.2.2.7.3 Berechnung der Repeatlängen

Die Berechnung der Repeatlängen erfolgte jeweils anhand einer zuvor sequenzierten Referenz-Probe, bei der sowohl die Länge des Fragments, als auch die genaue Anzahl der Repeats bekannt war.

*AR-Polymorphismen:*

(GGC)n-Repeat:

$$345 = 17 \text{ GGCs}$$

$$\text{„GS-Wert,,} - 345 = x$$

$$x / 2.88 = y$$

$$y + 17 = \text{Repeat-Länge } (\pm 1) \text{ des GS-Werts}$$

(CAG)n-Repeat:

$$259 = 18 \text{ CAGs}$$

$$\text{„GS-Wert,,} - 259 = x$$

$$x / 2.88 = y$$

$$y + 18 = \text{Repeat-Länge } (\pm 1) \text{ des GS-Werts}$$

*IGF1-Polymorphismus:*

(CA)n-Repeat:

$$189 = 19 \text{ CAs}$$

$$\text{„GS-Wert,,} - 189 = x$$

$$x / 2 = y$$

$$y + 19 = \text{Repeat-Länge } (\pm 1) \text{ des GS-Werts}$$

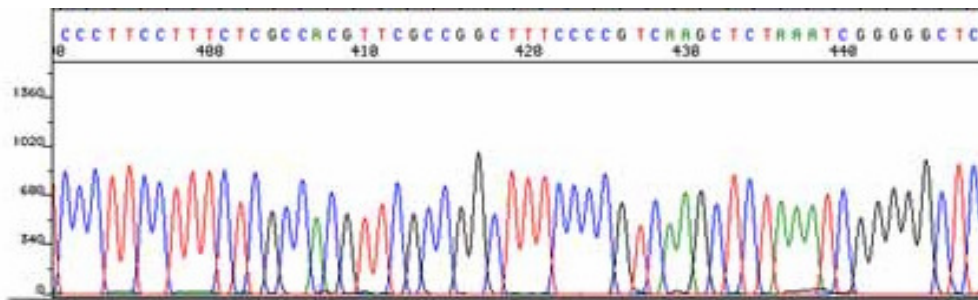
### 3.2.2.8 DNA-Sequenzierung

Alle unterschiedlichen Genotypen der verschiedenen Analysen wurden mit Hilfe der DNA-Sequenzierung verifiziert.

Die Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte nach der Didesoxymethode bzw. Kettenabbruch-Synthese (Sanger et al., 1977). Dieses Verfahren beruht auf dem zufälligen Einbau markierter Didesoxynukleotide (ddNTPs) in den neu synthetisierten DNA-Strang. Diese "Kettenabbruch-ddNTPs" besitzen keine 3'-Hydroxygruppe: werden sie in den neusynthetisierten Strang eingebaut, ist eine DNA-Verlängerung durch eine DNA-Polymerase nicht mehr möglich, da die OH-Gruppe am 3'-C-Atom für die Verknüpfung mit der Phosphatgruppe des nächsten Nucleotids fehlt. In der Folge entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge.

Jedes der vier ddNTPs wird mit einem unterschiedlichen Farbstoff gekoppelt. Diese Modifikation erlaubt es, alle vier ddNTPs in einem Reaktionsgefäß zuzugeben; eine

Aufspaltung in getrennte Ansätze und der Umgang mit Radioisotopen entfallen. Die entstehenden Kettenabbruchprodukte werden mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und mit Hilfe eines Lasers bei einer Wellenlänge von 480nm zur Fluoreszenz angeregt. Die unterschiedlichen Farben werden von einem Detektor erkannt. Das Chromatogramm (die Abfolge der Farbsignale, die am Detektor erscheinen) gibt direkt die Sequenz der Basen des sequenzierten DNA-Stranges wieder (Abb.3.9).



**Abb.3.9:** Multicolor-Detektion am ABI310.

Die Abbildung zeigt das Ergebnis einer DNA-Sequenzierung: an den verschiedenfarbigen Ausschlägen lässt sich die Abfolge der DNA-Bausteine ablesen.

#### 3.2.2.8.1 DNA-Aufreinigung mittels QIAquick PCR Purification Kit (QUIAGEN)

Vor der eigentlichen Sequenzierreaktion mussten die zu sequenzierenden PCR-Produkte aufgereinigt werden, um störende Faktoren wie z.B. überschüssige Primer und Nukleotide aber auch DNA-Fragmente <100bp zu entfernen.

Dazu wurde 1Vol PCR-Produkt mit 5Vol PB-Puffer in einem 1,5ml Reaktionsgefäß versetzt, gemischt und anschließend auf eine QIAquick spin column in einem 2ml Sammelgefäß gegeben. Dabei wurde die DNA mit Hilfe des Bindungspuffers PB auf der Silica-Membran der Säule immobilisiert. Die Säule wurde dann 1min bei 18000rpm (Mikroliterzentrifuge Z233M2, Hermle) zentrifugiert und der Durchfluss entsorgt. Anschließend wurde die Säule mit 750µl Waschpuffer PE gewaschen. Der Waschpuffer wurde, entgegen dem Protokoll des Herstellers, stets frisch angesetzt (150µl PE und 600µl 100% Ethanol pro Ansatz). Die Säule wurde 1min bei 18000rpm zentrifugiert und der Durchfluss entsorgt. Um den letzten Rest an Waschpuffer zu entfernen wurde nochmals bei 18000rpm 1min zentrifugiert und die Säule anschließend in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Zum Eluieren der DNA wurden 25µl bis 50µl H<sub>2</sub>O auf die Mitte der Silikamembran gegeben, wobei diese nicht mit der Pipettenspitze berührt werden durfte. Nach einer Inkubation von mindestens 5min wurde die Säule erneut bei

18000rpm für 1min zentrifugiert und dabei die gereinigte DNA in dem 1,5ml Reaktionsgefäß gesammelt.

Die Konzentration der gereinigten DNA wurde photometrisch bestimmt (s. 3.2.2.2)

#### 3.2.2.8.2 Sequenzierreaktion

Für die Sequenzierung wurde der BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem) benutzt.

##### Ansatz für eine Sequenzierreaktion (20µl):

~40ng PCR-Produkt

3,2µl Primer (Forward bzw. Reverse, 1pmol/µl)

3,5µl 5x Sequenzierpuffer

1µl Sequencing RR-100

-----  
ad 20µl H<sub>2</sub>Oreinst

Die Sequenzier-PCRs wurden nach folgenden Programmen durchgeführt:

**Tab.3.15:** Reaktionsbedingungen für normale Sequenzen

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	96°C	30sec	
Annealing	50°C	15sec	25
Elongation	60°C	4min	
Aufbewahrung	15°C	∞	

**Tab.3.16:** Reaktionsbedingungen für GC-reiche Sequenzen

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	96°C	45sec	
Annealing	56°C	15sec	25
Elongation	60°C	4min	
Aufbewahrung	15°C	∞	

#### 3.2.2.8.3 Ethanol-NaAc-Präzipitation

Nach Beendigung der PCR wurden die Ansätze in ein 1,5ml Reaktionsgefäß mit je 50µl 100%-igem Ethanol und 2µl 3M Natriumacetat pipettiert und die DNA mindestens 10min bei RT gefällt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation von 20min bei

19000rpm. Das Pellet wurde zweimal mit jeweils 500µl 70%-igem Ethanol gewaschen (je 5min bei 19000rpm) und anschließend getrocknet.

#### *3.2.2.8.4 Sequenzanalyse am Sequencher ABI310 Genetic Analyzer*

Das durch die Ethanol-NaAc-Fällung erhaltene DNA-Pellet wurde in 25µl H<sub>2</sub>O gelöst und anschließend 3min bei 95°C denaturiert. Um die DNA-Fragmente einzelsträngig zu halten, wurden die Ansätze bis zum Beladen des Geräts auf Eis gelagert.

Die Detektion der Fluoreszenzsignale erfolgte am automatischen Sequenziergerät ABI310 (Applied Biosystem). Die Ansicht der Rohdaten und die Voranalyse fand gemäß Software Manual (DNA Sequencing Analysis Software Version 3.4, Applied Biosystems) statt.

Die bearbeiteten Daten wurden auf einen entsprechenden PC übertragen und in die SEQUENCHER- Software (Gene Codes Corporation) importiert. Die Auswertung und Beurteilung der Daten erfolgt anhand der Sequencher User Guide (Sequencher 4.0 User Manual).

Der Sequenzabgleich erfolgt mit Hilfe der Datenbanken GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) bzw. Geneatlas (<http://www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas>). Die Überprüfung der Polymorphismen erfolgte über NCBI snp-BLAST ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_blast)).

### **3.2.3 Statistische Auswertung**

#### 3.2.3.1 Überprüfung der Genotyp- bzw. Allelfrequenzen

Zur Überprüfung, ob innerhalb unserer Populationen ein Selektionsdruck zugunsten eines bestimmten Genotyps oder Allels vorlag, wurden die gefundenen Genotyp- bzw. Allelfrequenzen mittels  $\chi^2$ -Tests auf ein Hardy-Weinberg-Gleichgewicht untersucht.

Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (nach den Mathematikern Godfrey Harold Hardy und Wilhelm Weinberg) ist ein Begriff der Populationsgenetik.

Dabei geht man von einer in der Realität nicht vorzufindenden idealen Population aus, in der sich weder die Häufigkeiten der Allele noch die Häufigkeiten der Genotypen verändern, d.h. die Allel- und Genotypfrequenzen eines Genpools sind in einer idealen Population konstant.

Im Falle des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts (HWG) lassen sich Allel- und Genotypfrequenzen ineinander umrechnen. Es bezeichne p die Allelfrequenz des Allels

A und q die Allelfrequenz des Allels a mit  $p+q=1$  sowie h die Funktion, die einem Genotyp seine Wahrscheinlichkeit zuordnet. Dann gilt:

$$p^2 + 2 pq + q^2 = 1$$

$$p^2 = h(AA)$$

$$2 pq = h(Aa)$$

$$q^2 = h(aa)$$

Mit Hilfe dieser Formeln lässt sich einmal die Häufigkeit der einzelnen Allele in einer Population berechnen, wenn die Häufigkeiten der Genotypen bekannt sind bzw. die Häufigkeit eines Genotyps, wenn die Allelfrequenz bekannt ist. Zum anderen lässt sich prüfen, ob Heterozygote einen Selektionsvorteil oder -nachteil haben. Trotz des theoretischen Konstrukts der idealen Population lässt sich die Formel mit Erfolg in der Praxis einsetzen.

Der Chi-Quadrat-Test ( $\chi^2$ -Test) ist ein vielfach verwendbarer Test aus der Statistik, der von dem amerikanischen Statistiker Karl Pearson entwickelt wurde. Beim Chi-Quadrat-Test wird geprüft, ob beobachtete Häufigkeiten sich maßgeblich von solchen Häufigkeiten unterscheiden, die man aufgrund einer bestimmten Modellannahme erwartet. Die Teststatistik lautet:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^k (BH_i - TH_i)^2 / TH_i$$

k = Anzahl der Klassen der Stichprobe

BH<sub>i</sub> = beobachtete Häufigkeit der i-ten Klasse

TH<sub>i</sub> = theoretisch zu erwartende Häufigkeit der i-ten Klasse

Hierzu wurden in dieser Studie zunächst sowohl die Genotyp- als auch die Allelfrequenzen eines jeden Polymorphismus durch Auszählen bestimmt. Anschließend wurden die dabei beobachteten Genotypfrequenzen (b) mit den aufgrund der Allelfrequenzen zu erwartenden Genotypfrequenzen (e) verglichen und mittels  $\chi^2$ -Test auf einen signifikanten Unterschied überprüft. Lag ein signifikanter Unterschied vor, so wurde davon ausgegangen, dass sich die untersuchte Population nicht in einem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befindet.

Zusätzlich wurde mit Hilfe des  $\chi^2$ -Tests ein Selektionsdruck zugunsten eines bestimmten Genotyps oder Allels überprüft, indem sowohl unsere männlichen Sportler mit unseren männlichen Kontrollen, als auch unsere beiden Sportlergruppen

miteinander verglichen wurden. Darüber hinaus erfolgte der Vergleich der Genotypfrequenzen unserer Gruppen mit denjenigen größerer ( $n \geq 100$ , soweit verfügbar) europäischer Vergleichspopulationen, die die Situation in der Normalbevölkerung widerspiegeln sollten.

Von einem statistisch signifikanten Unterschied wurde bei einem p-Wert  $\leq 0,05$  ausgegangen. Bei einem p-Wert zwischen 0,1 und 0,05 (hier als  $p < 0,1$  angegeben) spricht man von einer Tendenz.

### 3.2.3.2 Einfluss der Polymorphismen auf die Herzparameter

Die statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse in Bezug auf die Sportherzentwicklung erfolgte am Max-Planck-Institut für Informatik durch Herrn PD Dr. Jörg Rahnenführer (jetzt Universität Dortmund).

Es wurde die Programmiersprache R benutzt (R Development Core Team (2007). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>).

Der Einfluss der Einzelpolymorphismen bzw. Polymorphismuskombinationen auf die Parameter Herzvolumen und linksventrikuläre Muskelmasse wurde mit Hilfe von statistischen linearen Modellen, sog. ANOVA-Modellen untersucht. Die **Varianzanalyse** („analysis of variance“, ANOVA) ist ein Instrument zur Identifikation der relevanten Faktoren in einem multivariaten linearen Modell. Man betrachtet hier nicht eine Variable isoliert, sondern das Zusammenwirken mehrerer Variablen zugleich, also ihre Abhängigkeitsstruktur.

Die Verfahren untersuchen, ob (und gegebenenfalls wie) sich die Erwartungswerte der metrischen Zufallsvariablen in verschiedenen Gruppen (auch Klassen) unterscheiden. Mit den Prüfgrößen des Verfahrens wird getestet, ob die Varianz zwischen den Gruppen größer ist als die Varianz innerhalb der Gruppen. Dadurch kann ermittelt werden, ob die Gruppeneinteilung sinnvoll ist oder nicht, bzw. ob sich die Gruppen signifikant unterscheiden oder nicht.

Wenn sie sich signifikant unterscheiden, kann angenommen werden, dass in den Gruppen unterschiedliche Gesetzmäßigkeiten wirken. So lässt sich beispielsweise klären, ob Zusammenhänge zwischen erklärenden Variablen und der Zielvariable in einer Kontrollgruppe und im Untersuchungskollektiv identisch sind.



Die Anwendung jeder Form der Varianzanalyse ist an Voraussetzungen gebunden, deren Vorliegen vor jeder Berechnung geprüft werden muss. Erfüllen die Datensätze diese Voraussetzungen nicht, so sind die Ergebnisse unbrauchbar. Die Voraussetzungen sind je nach Anwendung etwas unterschiedlich, hinreichend sind in der Regel Varianzhomogenität der Stichprobenvariablen und Normalverteilung der Stichprobenvariablen.

Die Überprüfung erfolgt mit anderen Tests außerhalb der Varianzanalyse, die allerdings heute standardmäßig in Statistik-Programmen als Option mitgeliefert werden.

Bei einer einfaktoriellen Varianzanalyse (z.B. Untersuchung der Einzelpolymorphismen) untersucht man den Einfluss einer unabhängigen Variablen (Faktor) mit  $p$  verschiedenen Ausprägungen auf eine abhängige Zielvariable. Die Nullhypothese lautet in diesem Fall:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_p$$

Die Alternativhypothese lautet:

$$H_1: \mu_i \neq \mu_j \text{ für mindestens ein Paar } (i,j) \text{ mit } i \neq j$$

Die Nullhypothese besagt demnach, dass zwischen den Mittelwerten der Gruppen (die den Faktorausprägungen bzw. Faktorstufen entsprechen) kein Unterschied besteht. Die Alternativhypothese besagt, dass zwischen mindestens zwei Mittelwerten ein Unterschied besteht. Wenn wir beispielsweise drei Faktorstufen haben (wie im Falle eines biallelischen Polymorphismus), dann ist die Alternativhypothese bestätigt, wenn sich mindestens zwei der Gruppenmittelwerte unterscheiden. Es können sich aber auch drei Mittelwerte deutlich voneinander unterscheiden.

Die zweifaktorielle Varianzanalyse (z.B. Überprüfung von Polymorphismuskombinationen) berücksichtigt zur Erklärung der Zielvariablen zwei Faktoren (Faktor A und Faktor B). Auch mehr als zwei Faktoren sind möglich. Allerdings steigt der Datenbedarf für eine Schätzung der Modellparameter mit der Anzahl der Faktoren stark an.

Um die ANOVA ausführen zu können, müssen wir die Quadratfehlersumme innerhalb jeder Gruppe  $MS_w$  und zwischen den Gruppen  $MS_b$  berechnen. Die Testgröße  $F$ , die durch das Verhältnis von  $MS_b$  zu  $MS_w$  definiert ist, folgt unter der Nullhypothese einer  $F$ -Verteilung. Ein  $F$ -Wert, der höher als der kritische Wert  $F_{k-1;n-k}$  ist, bedeutet, dass die Nullhypothese verworfen werden muss (d.h. dass zumindest ein Mittelwert nicht gleich den restlichen Mittelwerten ist).

Alle Mittelwerte (MW) wurden inklusive der zugehörigen Standardabweichungen (SD) und Standardfehler (SE) angegeben:  $MW \pm SD/SE$ . Die Standardabweichungen liefern dabei Aussagen über die Streuung der Einzelwerte um den Mittelwert, die Standardfehler über die Streuung der Stichproben-Mittelwerte um den Gesamtmittelwert.

Von statistischer Signifikanz wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $\leq 5\%$ , d.h. einem p-Wert von  $p \leq 0,05$  ausgegangen. Bei einem p-Wert zwischen 0,05 und 0,1 wurde eine Tendenz angenommen.

Da eine große Anzahl verschiedener Polymorphismen untersucht wurden, müssen die p-Werte normalerweise durch Multiplikation mit der Anzahl der durchgeführten Tests angepasst werden („multiples Testen“). Darauf wird später im Rahmen der Diskussion detaillierter eingegangen.

Neben den Varianzanalysen wurden zusätzlich noch **Korrelations- bzw. -Regressionsanalysen** durchgeführt, um den linearen Zusammenhang zwischen den Variablen zu ermitteln. Als Maß für die Stärke des linearen Zusammenhangs wurde das Bestimmtheitsmaß  $r^2$  angegeben. Es gibt an, in welchem Maße die Varianz einer Variablen von der Varianz einer anderen abhängt. Dabei stellt  $r^2$  das Verhältnis von erklärter Variabilität und totaler Variabilität dar und liegt zwischen 0 und 1. Es gilt, je näher  $r^2$  an 1 liegt, desto stärker ist der lineare Zusammenhang. Ist  $r^2=0$  liegt kein linearer Zusammenhang vor. Somit bedeutet  $r^2=0,5$  für die beiden Variablen x und y, dass 50% der Streuung von y durch lineare Abhängigkeit von x erklärt werden kann.

Bei einfachen Regressionen entspricht  $r^2$  dem Quadrat des Pearson'schen Korrelationskoeffizienten r und wird aus der Kovarianz und den Einzelvarianzen berechnet:

$$R^2 = \frac{\text{Cov}(X, Y)^2}{\text{Var}(X)\text{Var}(Y)}$$

Bei multiplen Regressionen entspricht  $r^2$  dem Quadrat aus dem multiplen Korrelationskoeffizienten:

$$R^2 = \frac{SS_{Reg}}{SS_{Total}} = 1 - \frac{SS_{Res}}{SS_{Total}}$$

mit

$$SS_{Reg} = \sum_{i=1}^n (\hat{Y}_i - \bar{Y})^2, \quad \bar{Y} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n Y_i, \quad SS_{Res} = RSS = \sum_{i=1}^n (Y_i - \hat{Y}_i)^2, \quad SS_{Total} = \sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2$$

$SS_{Reg}$ : Summe der quadrierten Regressionswerte (durch die Regression erklärte Variabilität)

$SS_{Res}$  (RSS): Summe der quadrierten Residuen (nicht erklärte Variabilität)

$SS_{total}$ : Summe der quadrierten Beobachtungen (totale Variabilität)

Bei hoher Regressorenzahl und wenigen Beobachtungswerten verschlechtern sich Schätzeigenschaften des Modells, da das „einfache“ Bestimmtheitsmaß mit steigender Anzahl der Regressoren nicht sinken kann, selbst wenn ein Regressor ungeeignet ist.

Deshalb wurde bei unseren Analysen das korrigierte bzw. adjustierte Bestimmtheitsmaß verwendet ( $r^2_{adj}$ ).

Es wird folgendermaßen berechnet:

$$R^2_{adj} = 1 - (1 - R^2) \frac{n - 1}{n - p - 1}$$

n: Anzahl der Daten

p: Anzahl der unbekannt Parameter

Durch den zusätzlichen Korrekturfaktor  $(n-1)/(n-p-1)$  wird die Anzahl der Regressoren berücksichtigt wodurch  $r^2_{adj}$  auch kleiner werden kann. Darüber hinaus bezieht sich  $r^2_{adj}$  immer auf das gesamte gerechnete mehrdimensionale Modell und berücksichtigt somit auch die Faktoren, nach denen das Modell adjustiert wurde, wie Alter, Training und Geschlecht.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Polymorphismus-Analysen mit unterschiedlichen Methoden

#### 4.1.1 Suche nach neuen Polymorphismen

Im Falle des Myostatins (GDF8) und des B-Typ natriuretischen Peptids (BNP) wurde eine Mutationsanalyse der gesamten kodierenden DNA-Sequenzen inklusive Exon-/Intron-Übergänge mit Hilfe der DHPLC-Analyse durchgeführt, um möglicherweise neue bzw. in der Literatur bisher nicht beachtete Polymorphismen zu finden.

##### 4.1.1.1 Das Myostatin-Gen (GDF8-Screen)

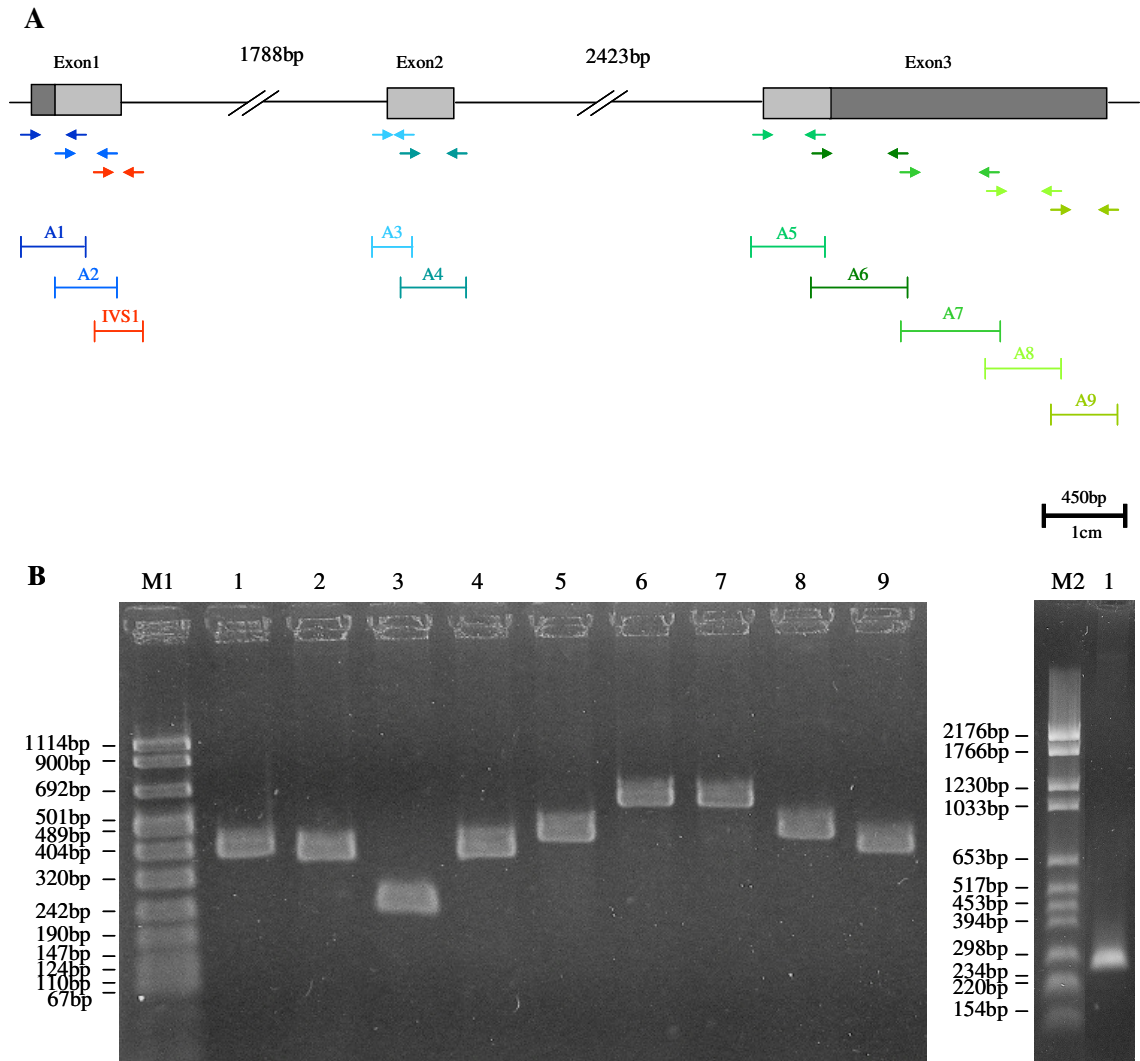
Das **GDF8-Gen** besteht aus drei Exons (Exon1: 506bp; Exon2: 374bp; Exon3: 1936bp), die aufgrund ihrer Größe in 9 sich überlappende Fragmente unterteilt wurden, um eine vollständige Analyse zu gewährleisten. Die Länge der Fragmente lag zwischen 243bp und 586bp (Abb.4.1). Zusätzlich wurde ein spezieller Bereich des Exon1-/Intron1-Überganges untersucht (IVS1), in dem laut Literatur die sehr seltene „loss-of-function“-Mutation IVS1+5G/A gefunden worden war, die zu einem veränderten Spleißing des Myostatin-Gens führt (Schuelke et al., 2004).

##### Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR):

Es erfolgte zunächst eine Amplifikation der 10 unterschiedlichen Fragmente mittels PCR (3.2.2.3). Die Polymerase-Kettenreaktion musste sowohl eine qualitativ als auch quantitativ optimale Vervielfältigung gewährleisten, um die hohe Sensitivität der DHPLC-Analyse möglichst nicht zu beeinträchtigen.

Bei allen Fragmenten wurde die Thermoprime Plus DNA-Polymerase von ABgene für die Amplifikation eingesetzt. Die zugehörigen Primerpaare und Reaktionsbedingungen sind im Methodikteil (3.2.2.3, Tab.3.8) beschrieben. Anschließend wurden die PCR-Produkte zur Überprüfung auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen (3.2.2.5).

Die Ergebnisse der unterschiedlichen PCRs sind in folgender Abbildung zusammengefasst:



**Abb.4.1:** Amplifikation aller Exons bzw. des Exon1-/Intron1-Übergangs des **GDF8-Gens** zur vollständigen Mutationsanalyse (GDF8-Screen).

A: Schematische Darstellung des GDF8-Gens mit der Lage der verwendeten Primer und der Größe der Amplifikate. Dargestellt sind die drei Exons von GDF8 (graue Rechtecke: dunkelgrau=nichttranslatiert; hellgrau=translatiert) mit den dazwischen liegenden Intronbereichen. Die Pfeile stellen die Lage der jeweiligen Primerpaare dar. Darunter ist mit A1-A9 (blau bis gelb) bzw. IVS1 (rot) die Größe und Lage der Amplifikate dargestellt. 1cm entspricht 450bp.

B: Ergebnis der Amplifikation der GDF8-Exons (großes Bild links) bzw. des Exon1-Intron1-Übergangs (IVS1; kleines Bild rechts).

Großes Bild links:

Spur 1: Amplifikat A1 bei ~395bp

Spur 2: Amplifikat A2 bei ~378bp

Spur 3: Amplifikat A3 bei ~243bp

Spur 4: Amplifikat A4 bei ~394bp

Spur 5: Amplifikat A5 bei ~439bp

Spur 6: Amplifikat A6 bei ~586bp

Spur 7: Amplifikat A7 bei ~580bp

Spur 8: Amplifikat A8 bei ~443bp

Spur 9: Amplifikat A9 bei ~398bp

M1: DNA Molecular Weight Marker VIII, 19-1114bp (Roche)

Kleines Bild rechts:

Spur1: Amplifikat IVS1 bei ~269bp

M2: DNA Molecular Weight Marker VI, 0,15-2,1kbp (Roche)

Alle Amplifikate waren als definierte Einzelbanden zu erkennen, was für die DHPLC-Analyse eine wichtige Voraussetzung ist. Unspezifische Nebenprodukte können bei der DHPLC-Analyse einen störenden Effekt auf das Untersuchungsergebnis haben.

#### Denaturierende Hochdruckflüssigkeitschromatographie (DHPLC):

Nach der erfolgreichen Amplifikation wurden die PCR-Produkte mittels DHPLC-Analyse am WAVE MD der Firma Transgenomic auf Sequenzveränderungen untersucht (3.2.2.6). Die spezifischen Analysetemperaturen für jedes GDF8-Fragment sind im Methodikteil in Tabelle 3.11 angegeben.

Da es sich bei der kodierenden Sequenz des GDF8-Gens bekanntermaßen um eine wenig polymorphe Sequenz handelt, wurden zunächst alle 10 GDF8-Fragmente an einer Stichprobe von 20 Probanden mittels DHPLC-Analyse auf Polymorphismen untersucht. Als das einzige polymorphe Fragment stellte sich das Amplifikat *GDF8 IVS1* heraus.

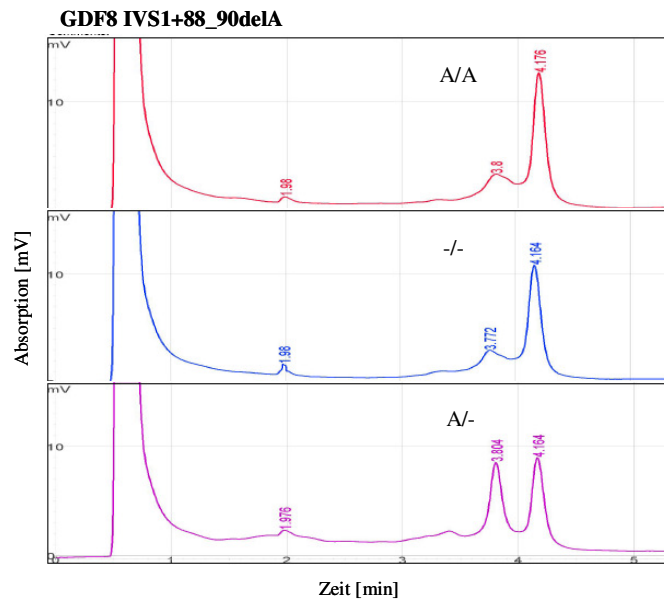
Die Sequenzierung (3.2.2.8) ergab allerdings, dass es sich bei der Sequenzveränderung innerhalb des Fragments nicht um die bereits bekannte IVS1+5G/A-Mutation handelte, die bei keinem der 20 Probanden vorlag; vielmehr lag an Position 205-207 innerhalb einer Basenabfolge von drei Adeninen (AAA) eine A-Deletion vor, d.h. bei einigen Probanden konnte man an Position 88-90 in Intron1 einen Verlust eines der drei Adenine (AA) finden:

A-Allel (WT):           ...GCTCTTTTAA~~A~~CAAGCTGTT...

delA(-)-Allel:           ...GCTCTTTTAA~~A~~CAAGCTGTT...

Nach der Nomenklatur von den Dunnen and Antonarakis (2001) wird der Polymorphismus nachfolgend als GDF8 IVS1+88\_90delA bezeichnet.

Das Ergebnis der DHPLC-Analyse ist in Abb.4.2 zu sehen.



**Abb.4.2:** Ergebnis der DHPLC-Analyse des GDF8-Polymorphismus IVS1+88\_90delA.

Es handelt sich hierbei um ein Absorptions-/Zeit-Chromatogramm. Das rote Chromatogramm zeigt den homozygoten Wildtyp (A/A), das blaue Chromatogramm die homozygot deletierte Form (-/-). Lila steht für den heterozygoten Genotyp (A/-).

Alle 137 Probanden wurden daraufhin auf diesen Polymorphismus untersucht, der bisher in der Literatur anscheinend nicht beachtet worden ist. Der Sequenzabgleich mit NCBI snp-BLAST ergab, dass der Polymorphismus als solcher zwar bereits bekannt war (rs11333758), dass es aber keinerlei Informationen über die Häufigkeit bzw. die Funktion des Polymorphismus gab.

#### 4.1.1.2 Das BNP-Gen (BNP-Screen)

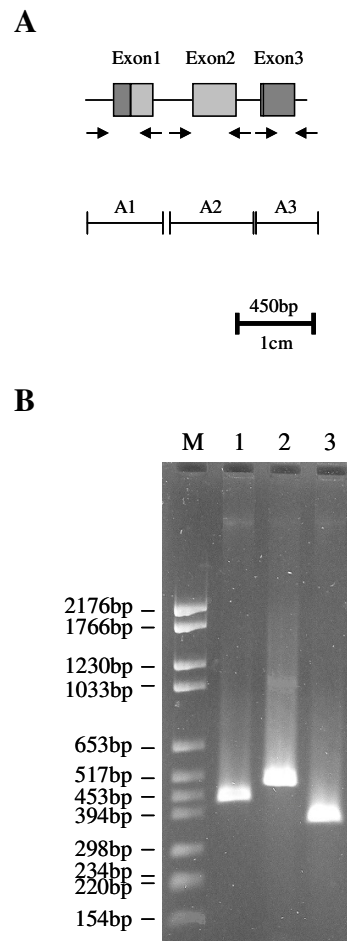
Das **BNP-Gen** besteht aus drei Exons (Exon1: 234bp; Exon2: 257bp; Exon3: 205bp), die aufgrund ihrer Größe separat und inklusive der Exon-/Intron-Übergänge analysiert wurden.

#### Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR):

Die drei unterschiedlichen Fragmente wurden mittels PCR mit der Thermoprime Plus DNA-Polymerase (ABgene) amplifiziert. Die zugehörigen Primerpaare und Reaktionsbedingungen sind im Methodikteil zu finden (3.2.2.3, Tab.3.8).

Die PCR-Produkte wurden zur Überprüfung auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen (3.2.2.5).

Die Ergebnisse der unterschiedlichen PCRs sind in folgender Abbildung zusammengefasst:



**Abb.4.3:** Amplifikation aller Exons bzw. Exon-/Intron-Übergänge des BNP-Gens zur vollständigen Mutationsanalyse (BNP-Screen).

A: Schematische Darstellung des BNP-Gens mit der Lage der verwendeten Primer und der Größe der Amplifikate. Zu sehen sind die drei Exons von BNP (graue Rechtecke: dunkelgrau=nichttranslatiert; hellgrau=translatiert) mit den dazwischen liegenden Intronbereichen. Die Pfeile stellen die Lage der jeweiligen Primerpaare dar. Darunter ist mit A1-A3 die Größe und Lage der einzelnen Amplifikate dargestellt. 1cm entspricht 450bp.

B: Ergebnis der Amplifikation der BNP-Exons.

Spur 1: Amplifikat A1 bei ~447bp

Spur 2: Amplifikat A2 bei ~498bp

Spur 3: Amplifikat A3 bei ~375bp

M: DNA Molecular Weight Marker VI, 0,15-2,1kbp (Roche)

Jedes der drei Amplifikate war als definierte Einzelbande zu erkennen.

#### Denaturierende Hochdruckflüssigkeitschromatographie (DHPLC):

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe des WAVE MD von Transgenomic (3.2.2.6). Die spezifischen Analysetemperaturen für jedes BNP-Fragment sind im Methodikteil in Tabelle 3.11 angegeben.

Mit Hilfe der DHPLC-Analyse konnten polymorphe Strukturen sowohl in Amplifikat A1 als auch in Amplifikat A3 detektiert werden.

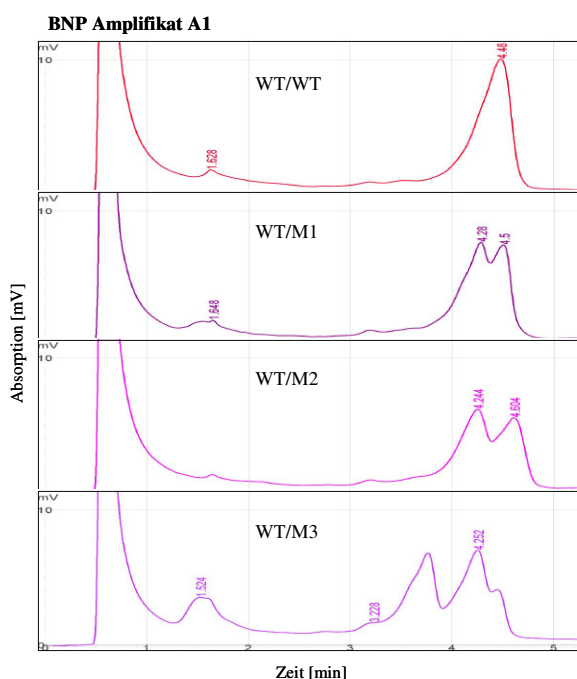


Die Sequenzierung (3.2.2.8) ergab, dass der polymorphe Bereich in **Amplifikat A1** in der Ausgangssequenz (WT) die Basentriplettabfolge ...**(CAG)<sub>7</sub> AAG (CAG)<sub>4</sub>**... besitzt und ~60bp vor dem Translationsstart (ATG) in Exon1 liegt. In dieser Region fanden wir eine Insertion bzw. Deletion einzelner oder mehrerer Basentriplets. Innerhalb unseres Untersuchungskollektivs konnten vier verschiedene Allele identifiziert werden (Tab.4.1).

**Tab.4.1:** Allele im 1.Exon des BNP-Gens innerhalb des Untersuchungskollektivs

Allel	Basenabfolge	Veränderung
WT	(CAG) <sub>7</sub> AAG (CAG) <sub>4</sub>	keine
Allel M1	(CAG) <sub>8</sub> AAG (CAG) <sub>4</sub>	(CAG)-Insertion
Allel M2	(CAG) <sub>5</sub> AAG (CAG) <sub>4</sub>	(CAG) <sub>2</sub> -Deletion
Allel M3	(CAG) <sub>5</sub>	6(CAG) AAG-Deletion

Alle Mutationsallele lagen in unserer Population nur in heterozygoter Form neben einem WT-Allel vor. Daraus ergaben sich vier unterschiedliche Genotypen.



**Abb.4.4:** Ergebnis der DHPLC-Analyse von Amplifikat **A1** des **BNP-Gens**.

Das rote Absorptions-/Zeit-Chromatogramm zeigt den homozygoten Wildtyp, die Chromatogramme in den verschiedenen Lila-Tönen zeigen die unterschiedlichen heterozygoten Genotypen. Keines der mutierten Allele kam in homozygoter Form innerhalb unserer Population vor.

Wie man in Abb.4.4 erkennen kann, unterschieden sich die Chromatogramme der drei heterozygoten Formen (lila) erheblich. In allen drei Fällen war ein Heteroduplex-Peak

(1. Peak) und ein Homoduplex-Peak (2. Peak) zu erkennen. Je größer der deletierte bzw. inserierte Bereich war, desto früher eluierte der Heteroduplex-Peak von der Säule, d.h. desto thermolabiler waren die Heteroduplices.

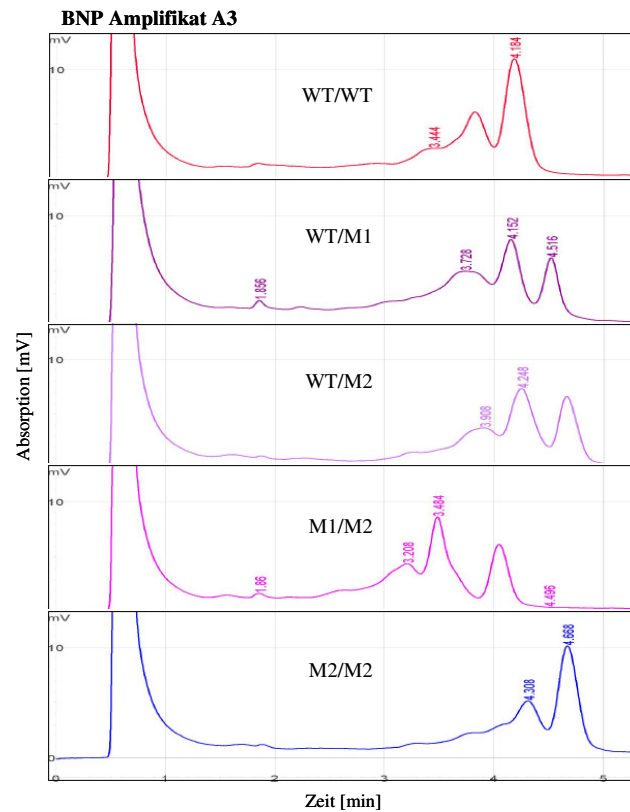
Der Sequenzabgleich mit NCBI snp-BLAST ergab, dass diese Region bereits als polymorph beschrieben ist (rs35519114); in der Literatur konnten wir allerdings keine Informationen über die Häufigkeit und eventuelle Funktion dieser allelischen Formen finden, und ob es eventuell weitere Varianten gibt.

Die polymorphe Region in **Amplifikat A3** liegt innerhalb von Exon3, ~85bp hinter dem Translationsschluss. Auch hierbei handelt es sich um eine Repeatstruktur mit der Basenabfolge ...TTTTTTTAATGT... (WT). Hier konnte man Insertionen sowohl im Bereich der sieben aufeinander folgenden Thymidine als auch der beiden Adenine finden. Es wurden drei unterschiedliche Allele innerhalb unseres Untersuchungskollektivs detektiert (Tab.4.2).

**Tab.4.2:** Allele im 3.Exon des BNP-Gens innerhalb des Untersuchungskollektivs

<b>Allel</b>	<b>Basenabfolge</b>	<b>Veränderung</b>
WT	(T) <sub>7</sub> (A) <sub>2</sub>	keine
Allel M1	(T) <sub>7</sub> (A) <sub>3</sub>	(A)-Insertion
Allel M2	(T) <sub>8</sub> (A) <sub>2</sub>	(T)-Insertion

Die drei Allele lagen in unterschiedlichen Kombinationen vor und ergaben fünf der sechs möglichen Genotypen. Mutationsallel M1 kam innerhalb unserer Population in homozygoter Form nicht vor.



**Abb.4.5:** Ergebnis der DHPLC-Analyse von Amplifikat A3 des **BNP-Gens**.

Das rote Absorptions-/Zeit-Chromatogramm zeigt den homozygoten Wildtyp, die Chromatogramme in den verschiedenen Lila-Tönen zeigen die unterschiedlichen heterozygoten Genotypen. Das einzige mutierte Allel, das in homozygoter Form innerhalb unserer Population zu finden war, war das Allel M2 (blau).

In Abb.4.5 ist zu erkennen, dass die Insertion eines Thymidins bzw. eines Adenins im heterozygoten Fall (WT/M1 und WT/M2) anhand des Chromatogramms nicht voneinander unterschieden werden konnte, und durch Mischen mit einem bekannten Genotyp überprüft werden musste. Die Insertion eines Thymidins auf dem einen Allel, kombiniert mit der Insertion eines Adenins auf dem anderen Allel führte hingegen zu einem deutlich früher eluierten Heteroduplex-Peak (M1/M2).

Der Sequenzabgleich mit NCBI snp-BLAST ergab, dass die polymorphe Region als solche bereits bekannt ist (rs35458601 bzw. rs3527557). Es lagen allerdings ebenfalls keine Informationen über Häufigkeit bzw. Funktion der Sequenzveränderungen vor.

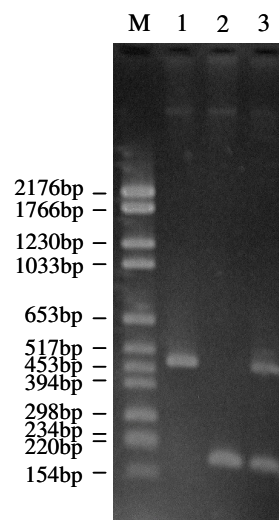
#### 4.1.2 Analyse bereits bekannter Polymorphismen

Es wurden zusätzlich 14 bereits bekannte, für unsere Fragestellung möglicherweise relevante Polymorphismen in 12 unterschiedlichen Genen analysiert. Dies erfolgte mit Hilfe unterschiedlicher Methoden.

##### 4.1.2.1 Fragmentlängen-Analyse mittels Agarosegel-Gelelektrophorese

Mit Hilfe dieser Methode wurde der Polymorphismus im **ACE-Gen** untersucht. Bei diesem Polymorphismus handelt es sich um einen Insertions-/Deletions-Polymorphismus einer 287bp-langen Alu-Repeat-Sequenz in Intron16. Da sich die beiden Allele aufgrund der Insertion (I) bzw. Deletion (D) in ihrer molekularen Masse erheblich unterscheiden, erfolgte die Analyse dieses Polymorphismus über Amplifikation des zu untersuchenden Abschnitts mittels PCR (3.2.2.3; Tab.3.8), und anschließender Genotypisierung über Agarose-Gelelektrophorese (3.2.2.5).

Für die PCR wurde die Taq-DNA-Polymerase der Firma Peqlab benutzt. Nach der Amplifikation wurden die PCR-Produkte auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen und die unterschiedlichen Allele nach ihrer molekularen Masse aufgetrennt (Abb.4.6).



**Abb.4.6:** Ergebnis der Untersuchung des **ACE I/D**-Polymorphismus.

M: DNA Molecular Weight Marker VI, 0,15-2,1kbp (Roche)

Spur 1: Bande bei ~490bp; Genotyp I/I

Spur 2: Bande bei ~190bp; Genotyp D/D

Spur 3: Banden bei ~490bp und ~190bp; Genotyp I/D

Wie zu erwarten, konnte man bei I/I-Homozygoten eine Bande bei ~490bp und bei D/D-Homozygoten eine Bande bei 190bp erkennen. Die I/D-Heterozygoten zeigten sowohl eine Bande bei ~490bp als auch bei ~190bp.

In der Literatur wird beschrieben, dass es bei dieser Methode der Genotypisierung des ACE I/D-Polymorphismus (Rigat et al., 1992) angeblich zu einer Fehltypisierung von I/D-Heterozygoten als D/D-Homozygote kommen kann (Perna et al., 1992; Odawara et al., 1997). Dabei wird das kleinere D-Allel bei I/D-Heterozygoten bevorzugt, bzw. das I-Allel zu wenig amplifiziert. Dies kann fälschlicherweise zur Annahme einer höheren Frequenz des D-Allels innerhalb einer Population führen.

Aus diesem Grund wurden die D/D-Homozygoten im Anschluss mit Hilfe eines Insertions-spezifischen Primer-Paares (ACE for Ins/ACE rev) und Verwendung eines Reaktions-Enhancers (Q-Solution von QIAGEN) erneut amplifiziert, diesmal mit Hilfe der Thermoprime Plus DNA Polymerase (ABgene), und mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Bei einem falsch-positiven D/D-Genotyp wäre es bei dieser Überprüfung zur Amplifikation eines ~170bp großen Fragments gekommen.

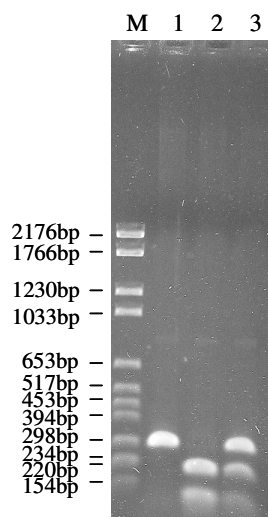
Innerhalb unserer Population sind jedoch keine falsch positiven D/D-Homozygoten aufgetreten.

#### 4.1.2.2 RFLP (Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus)-Analyse

Mit der RFLP-Analyse (3.2.2.4) wurden die Polymorphismen **AGT T174M**, **CMA -1903G/A**, **CYP11B2 -344C/T** und **IGF1R 3174G/A** untersucht. Die spezifischen Reaktionsbedingungen der PCRs (3.2.2.3; Tab.3.8), sowie die der verwendeten Restriktionsenzyme (Tab.3.9) sind im Methodikteil beschrieben. Hierbei wurden im Falle der Polymorphismen im CMA-, CYP11B2- und IGF1R-Gen bereits veröffentlichte Methoden modifiziert.

Für die Genotypisierung wurden die Restriktionansätze auf 2,5%-ige Agarose-Gele aufgetragen (3.2.2.5) und anschließend mittels Ethidiumbromid-Färbung detektiert.

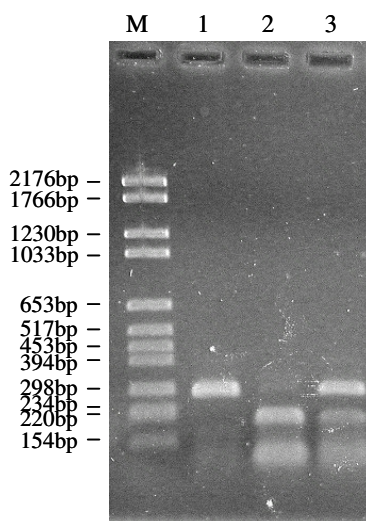
In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse der RFLP-Analysen zu sehen:



**Abb.4.7:** Ergebnis der Untersuchung des **AGT T174M-Polymorphismus** mittels NcoI-Restriktionsverdau.

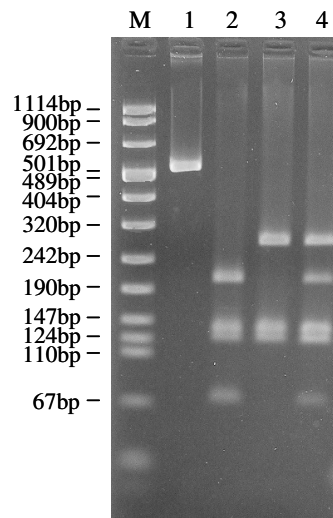
Bei diesem Polymorphismus des Angiotensinogen-Gens kommt es aufgrund eines Basenaustausches Cytosin → Thymin in Exon2 zu einem Aminosäureaustausch Threonin (T) → Methionin (M).

Mittels PCR mit der Thermoprime Plus DNA-Polymerase (ABgene) wurde der zu untersuchende Abschnitt zunächst amplifiziert (3.2.2.3). Anschließend wurden 4µl PCR-Produkt mit 3U NcoI-Enzym (Fermentas) verdaut. Beim T-Allel, bei dem an Position 89 im Fragment ein Cytosin vorliegt, ist keine Schnittstelle für das NcoI-Enzym vorhanden und es erfolgte keine Restriktion des 298bp langen Amplifikats (Spur 1; Genotyp T/T). Beim M-Allel hingegen wird durch den Basenaustausch Cytosin → Thymin eine NcoI-Schnittstelle erzeugt, und das Amplifikat in zwei Fragmente von 209bp und 89bp geschnitten (Spur 2; Genotyp M/M). Beim heterozygoten Fall konnte man sowohl das ungeschnittene Fragment des T-Allels bei 298bp erkennen, als auch die beiden Fragmente des geschnittenen M-Allels bei 209bp und 89bp (Spur 3; Genotyp T/M). M: DNA Molecular Weight Marker VI, 0,15-2,1kbp (Roche).



**Abb.4.8:** Ergebnis der Untersuchung des **CMA -1903G/A-Polymorphismus** mittels BstXI-Restriktionsverdau.

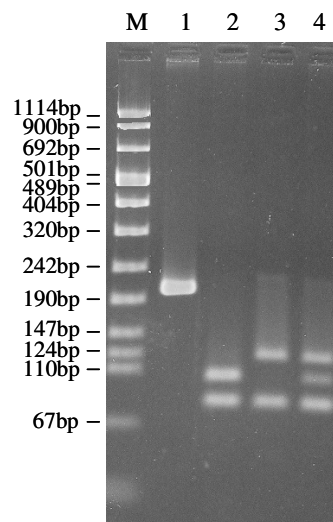
Innerhalb des ChymaseA-Gens wurde ein Polymorphismus untersucht, bei dem es an Position -1903 zu einem Basenaustausch G → A kommt. Zunächst erfolgte die Amplifikation des zu untersuchenden Abschnitts mittels PCR mit der Thermoprime Plus DNA-Polymerase (ABgene) (3.2.2.3). Anschließend wurden 4µl PCR-Produkt mit 3U BstXI-Enzym (Fermentas) verdaut (Pfeufer et al., 1996). Beim A-Allel liegt keine Erkennungsstelle für das Enzym vor und das Amplifikat von 283bp wurde nicht geschnitten (Spur 1; Genotyp A/A). Beim G-Allel hingegen ist eine BstXI-Erkennungssequenz vorhanden, und das Amplifikat wurde in zwei Fragmente von 190bp und 93bp geschnitten (Spur 2; Genotyp G/G). Bei G/A-Heterozygoten konnte man sowohl das ungeschnittene Fragment des A-Allels bei 283bp erkennen, als auch die beiden Fragmente des geschnittenen G-Allels bei 190bp und 93bp (Spur 3; Genotyp G/A). M: DNA Molecular Weight Marker VI, 0,15-2,1kbp (Roche).



**Abb.4.9:** Ergebnis der Untersuchung des **CYP11B2 -344C/T-Polymorphismus** mittels HaeIII-Restriktionsverdau.

Im Gen der Aldosteron-Synthase wurde eine Basensubstitution  $C \rightarrow T$  in der 5'-Promotor-Region an Position -344 untersucht.

Die Amplifikation des zu untersuchenden Abschnitts wurde mittels PCR mit der Thermoprime Plus DNA-Polymerase (ABgene) durchgeführt (3.2.2.3). Das amplifizierte Fragment besaß eine molekulare Größe von 538bp (Spur 1). Von dem PCR-Ansatz wurden anschließend 4µl mit 3U HaeIII-Enzym (GIBCO BRL) verdaut (Kupari et al., 1998). Das C-Allel besitzt 3 Erkennungsstellen für das HaeIII-Enzym. Deshalb wurde das C-Allel in 4 Fragmente von 203bp, 138bp, 126bp und 71bp geschnitten (Spur 2; Genotyp C/C). Beim T-Allel hingegen fehlt die Schnittstelle bei 203bp und das Amplifikat wurde in nur 3 Fragmente von 274bp, 138bp und 126bp gespalten (Spur 3; Genotyp T/T). Bei C/T-Heterozygoten konnte man alle 5 Fragmente bei 274bp, 203bp, 138bp, 126bp und 71bp erkennen (Spur 4; Genotyp C/T). M: DNA Molecular Weight Marker VIII, 19-1114bp (Roche).



**Abb.4.10:** Ergebnis der Untersuchung des **IGF1R 3174G/A-Polymorphismus** mittels MnlI-Restriktionsverdau.

Im IGF1-Rezeptor-Gen wurde ein Basenaustausch von  $G \rightarrow A$  an Position 3174 in Exon16 untersucht.

Der zu untersuchende Abschnitt wurde mittels PCR mit der Thermoprime Plus DNA-Polymerase (ABgene) amplifiziert (3.2.2.3). Das Amplifikat besaß eine molekulare Größe von 207bp (Spur 1). Anschließend wurden 4µl des PCR-Ansatzes mit 3U MnlI-Enzym (Fermentas) verdaut (Balogh et al., 2006). Das G-Allel besitzt zwei MnlI-Schnittstellen und wurde deshalb in 3 Fragmente von 100bp, 87bp und 20bp geschnitten (Spur 2; Genotyp G/G), wobei die 20bp-Bande auf dem Gelbild nicht erkennbar ist. Das A-Allel beinhaltet dagegen nur eine Erkennungsstelle für das MnlI-Enzym bei 87bp, weshalb das A-Allel in 2 Fragmente von 120bp und 87bp geschnitten wurde (Spur 3; Genotyp A/A). Lagen beide Allele heterozygot vor, so wurden die Allele in Fragmente von 120bp, 100bp, 87bp und 20bp geschnitten (Spur 4; Genotyp G/A). M: DNA Molecular Weight Marker VIII, 19-1114bp (Roche).

#### 4.1.2.3 DHPLC-Analyse

Außer den bereits beschriebenen Mutationsanalysen innerhalb des GDF8- und des BNP-Gens (4.1.1.1 und 4.1.1.2), wurde der größte Teil der Kandidaten-Polymorphismen ebenfalls mit Hilfe der DHPLC-Analyse am WAVE MD analysiert (3.2.2.6). Hierzu gehören folgende Polymorphismen:

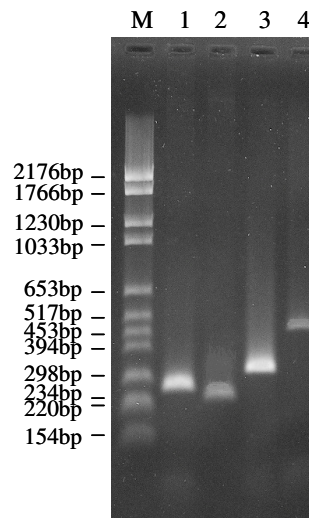
- **AGT M235T** im Angiotensinogen-Gen
- **AT<sub>1</sub>R 1166A/C** im Gen des AngiotensinII-Rezeptors TypI
- **AT<sub>2</sub>R 1675G/A** im Gen des AngiotensinII-Rezeptors TypII
- **B2BKR 9bpI/D** im Gen des Bradykinin-Rezeptors TypII
- **ADRB1 G389R** im Gen des  $\beta$ 1-adrenergen Rezeptors ( $\beta$ 1AR)
- **TNNT2 5bpI/D** im Troponin T-Gen

#### Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR):

Es erfolgte zunächst eine Amplifikation der zu untersuchenden Sequenzbereiche mittels PCR (3.2.2.3). Bei allen Fragmenten außer dem AGT235-Fragment, das mit der Taq-DNA-Polymerase von Peqlab aufgrund besserer Ergebnisse bei der Amplifikation vervielfältigt wurde, wurde die Thermoprime Plus DNA-Polymerase von ABgene eingesetzt. Die zugehörigen Primerpaare und Reaktionsbedingungen sind im Methodikteil (Tab.3.8) aufgeführt.

Anschließend wurden je 4 $\mu$ l PCR-Produkt zur Überprüfung auf 1,5%ige Agarosegele aufgetragen (3.2.2.5). Die Ergebnisse der unterschiedlichen PCRs sind in den folgenden Abbildungen zusammengefasst:





**Abb.4.11:** Ergebnisse der Amplifikationen der unterschiedlichen Fragmente mittels PCR.

Spur 1: Amplifikat des **AGT M235T**-Polymorphismus bei ~275bp

Spur 2: Amplifikat des **AT<sub>1</sub>R 1166A/C**-Polymorphismus bei ~245bp

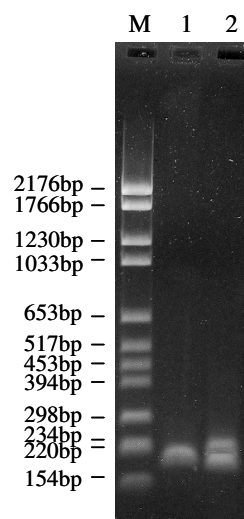
Spur 3: Amplifikat des **AT<sub>2</sub>R 1675G/A**-Polymorphismus bei ~310bp

Spur 4: Amplifikat des **ADRB1 G389R**-Polymorphismus bei ~462bp

M: DNA Molecular Weight Marker VI, 0,15-2,1kbp (Roche)

Alle Amplifikate waren als definierte Einzelbanden zu erkennen.

Bei zwei der untersuchten Polymorphismen, bei denen es sich jeweils um Insertions-/Deletions-Polymorphismen handelt, konnte jedoch bei der Amplifikation in einigen Fällen eine Zusatzbande festgestellt werden (Abb.4.12, 4.13). Hierbei handelte es sich allerdings nicht um unspezifische Banden, sondern um reproduzierbare Artefakte, die nur bei heterozygoten Probanden zu beobachten waren.

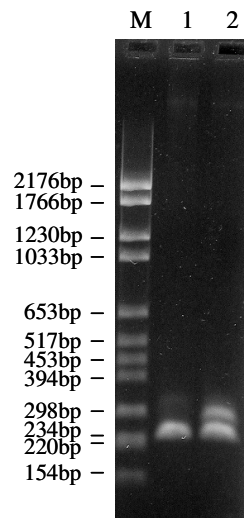


**Abb.4.12:** Ergebnisse der Amplifikation der **B2BKR**-Fragmente.

Spur 1: bei homozygoten Probanden ist eine Bande bei ~196bp zu sehen

Spur 2: bei Heterozygoten kann man zwei Banden bei ~220bp und ~196bp erkennen

M: DNA Molecular Weight Marker VI, 0,15-2,1kbp (Roche)



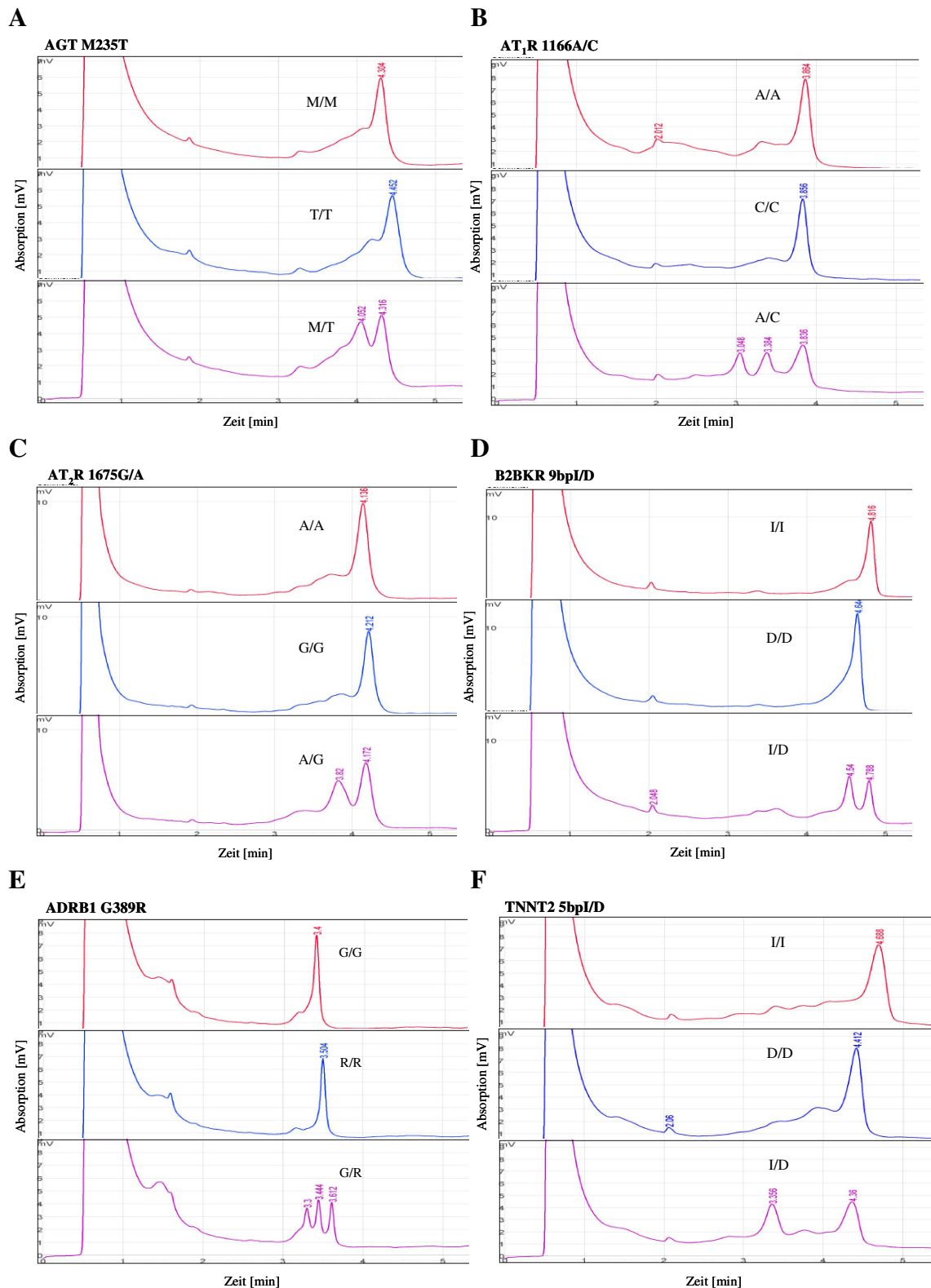
**Abb.4.13:** Ergebnisse der Amplifikation der **TNNT2**-Fragmente.  
 Spur 1: bei homozygoten Probanden ist eine Bande bei ~246bp zu sehen  
 Spur 2: bei Heterozygoten sind zwei Banden bei ~290bp und ~246bp zu erkennen  
 M: DNA Molecular Weight Marker VI, 0,15-2,1kbp (Roche).

Auf den Abbildungen kann man erkennen, dass sich die B2BKR (9bpI/D)- und TNNT2 (5bpI/D)-Heterozygoten bereits anhand der Agarose-Gelelektrophorese von den Homozygoten unterscheiden ließen, da sie im Gel zwei Banden bildeten. Dabei handelt es sich bei den oberen Banden (jeweils Spur 2) um Heteroduplex-Banden, bei denen sich die Insertions- und Deletions-Allele zusammenlagerten und Sekundärstrukturen bildeten, die aufgrund ihrer nicht-linearen Struktur eine leicht verzögerte Laufgeschwindigkeit im Agarosegel aufwiesen. Die unteren Banden waren eine Mischung aus Deletions- und Insertionsbanden, die aufgrund des zu geringen Größenunterschieds nicht erkennbar aufgetrennt wurden und als eine Bande erschienen.

#### Denaturierende Hochdruckflüssigkeitschromatographie (DHPLC):

Nach der erfolgreichen Amplifikation der zu untersuchenden Bereiche wurden die PCR-Produkte am WAVE MD analysiert (3.2.2.6). Die spezifischen Analysetemperaturen sind im Methodikteil in Tabelle 3.11 angegeben.

Die Chromatogramme der einzelnen Genotypen der unterschiedlichen Polymorphismen sind in Abbildung 4.14 dargestellt.



**Abb.4.14:** Ergebnisse der DHPLC-Analysen der unterschiedlichen Polymorphismen.

Die roten Absorptions-/Zeit-Chromatogramme zeigen den homozygoten Wildtyp, die blauen Chromatogramme die homozygote mutierte Form. Lila steht für den heterozygoten Genotyp.

Die Abbildung 4.14 zeigt die Genotypisierung der unterschiedlichen Polymorphismen mittels DHPLC-Analyse. Bei den Heterozygoten waren fast immer zwei deutlich

voneinander getrennte Peaks zu erkennen, d.h. die Heteroduplices eluierten früher als die Homoduplices von der Säule. Die Retentionszeiten lagen dabei zwischen 3-5min.

Bei den Polymorphismen AT<sub>1</sub>R 1166A/C (B, lila) und ADRB1 G389R (E, lila) waren die Retentionszeiten der beiden verschiedenen Heteroduplices so unterschiedlich, dass sie im Chromatogramm als separate Peaks zu sehen waren, die vor dem Homoduplex-Peak eluierten.

Die beiden homozygoten Formen eines Polymorphismus konnten erst durch Mischen mit einer Probe bekannten Genotyps eindeutig zugeordnet werden. Ergab das Mischen mit der WT-Sequenz lediglich einen Homoduplex-Peak, so handelte es sich bei der Probe um den Wildtyp, erschienen jedoch zusätzliche Peaks, so handelte es sich um die homozygote Form des mutierten Allels. Dies wurde zusätzlich durch Mischen mit diesem Genotyp verifiziert.

#### 4.1.2.4 Fragmentlängenbestimmung mittels Kapillarelektrophorese

Mit Hilfe der Kapillarelektrophorese wurden die Repeat-Polymorphismen innerhalb des Androgen-Rezeptor-(AR)-Gens und des IGF1-Gens untersucht.

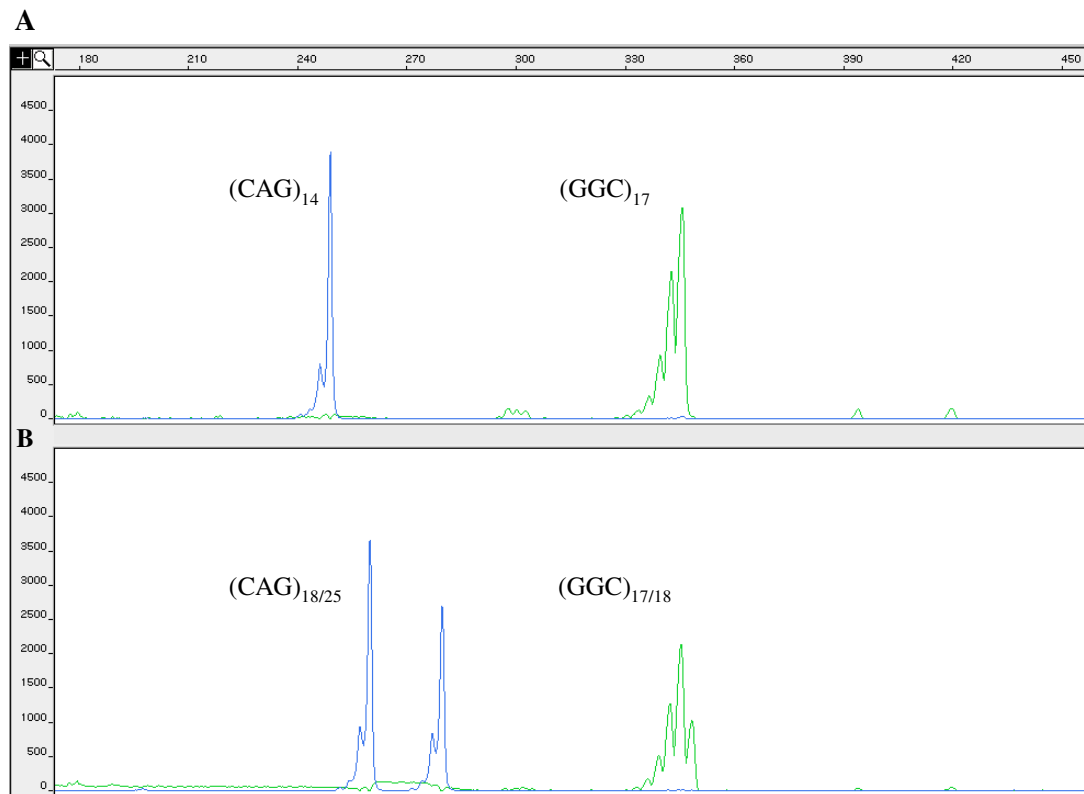
##### *4.1.2.4.1 Die Trinukleotid-Polymorphismen im Androgen-Rezeptor-Gen*

Im 1. Exon des X-chromosomalen AR-Gens, der Transaktivierungsdomäne des Rezeptors, wurden die beiden Trinukleotid-Polymorphismen (CAG)<sub>n</sub> und (GGC)<sub>n</sub> analysiert. Hierbei handelt es sich um polymorphe Strukturen, deren Länge zwischen 9-37 Wiederholungen beim Polyglutamin(CAG)-Repeat (21=WT) bzw. zwischen 3-30 Wiederholungen beim Polyglycin(GGC)-Repeat (17=WT) innerhalb der europäischen Normalbevölkerung variieren (Edwards et al., 1992; Sleddens et al., 1993).

Zur genauen Bestimmung der Anzahl der Basentriplets wurden die Fragmentlängen mittels Kapillarelektrophorese am Sequencher ABI310 Genetic Analyzer der Firma Applied Biosystem bestimmt (3.2.2.7).

Dazu wurde zunächst von jedem der beiden zu untersuchenden Bereiche ein fluoreszenzmarkiertes Amplifikat hergestellt. Um die beiden Polymorphismen zur Kosten- und Zeitersparnis zusammen in einem Lauf analysieren zu können, wurden zwei unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Primer-Paare benutzt (FAM und JOE); dadurch zeigte das (CAG)<sub>n</sub>-Fragment bei der Analyse ein blaues Fluoreszenzsignal, das (GGC)<sub>n</sub>-Fragment hingegen ein grünes (Abb.4.15). Dabei wurden die beiden PCR-Ansätze getrennt denaturiert und anschließend erst zusammenpipettiert, um

Wechselwirkungen zwischen den beiden PCR-Produkten zu vermeiden. Die Reaktionsansätze, inklusive der Wahl der Primer und Reaktionsbedingungen, sowie die verschiedenen Berechnungsschritte der tatsächlichen Repeat-Länge, sind im Methodikteil (3.2.2.7) aufgeführt.



**Abb.4.15:** Beispiel einer Fragmentlängenbestimmung des (CAG)n- und (GGC)n-Repeats des X-chromosmalen AR-Gens.

Anhand des Kapillarelektropherogramms kann sowohl die Fragmentlänge als auch die Intensität des Fluoreszenzsignals abgelesen werden.

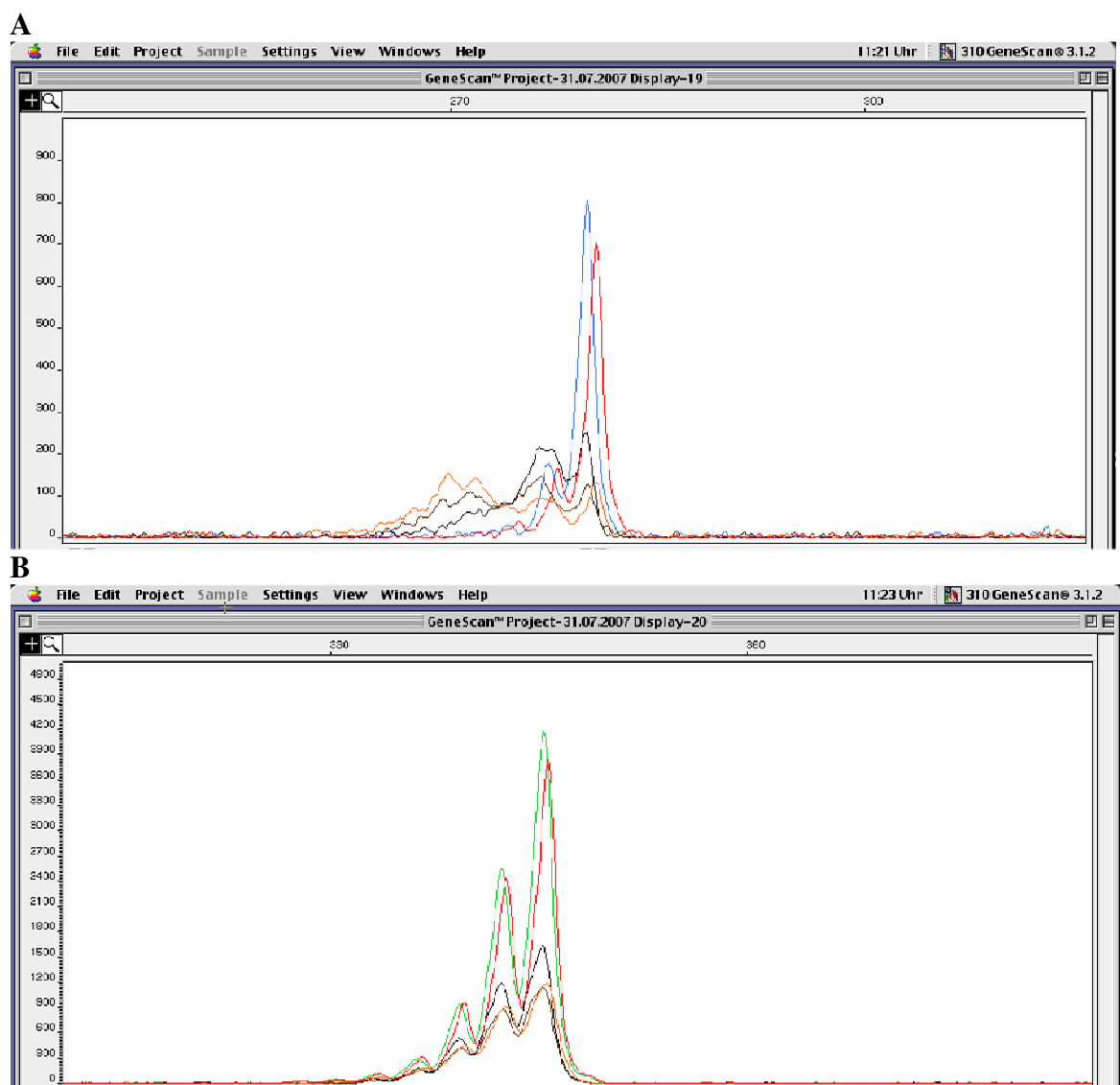
A: In diesem Beispiel liegt sowohl beim (CAG)n- als auch beim (GGC)n-Repeat nur ein Allel vor (jeweils 1 großer Hauptpeak). Es handelt sich hierbei um einen männlichen Probanden. Das (CAG)n-Fragment war in diesem Fall 249bp lang, das (GGC)n-Fragment 345bp. Dies entspricht den Repeatlängen  $(CAG)_{14}$  und  $(GGC)_{17}$  ( $\pm 1$ ).

B: Zu sehen ist die Analyse einer Probandin, die sowohl im (CAG)n-, als auch im (GGC)n-Repeat zwei unterschiedliche Allele besitzt. Die Fragmentlängen entsprechen dabei Repeat-Längen von 18/25 im (CAG)n-Repeat bzw. 17/18 im (GGC)n-Repeat ( $\pm 1$ ).

Innerhalb unseres Untersuchungskollektivs konnten 14 unterschiedliche Allele des (CAG)n-Repeats ( $n = 14, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28$  und  $29$ ) und 10 des (GGC)n-Repeats ( $n = 4, 9, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 19$  und  $20$ ) identifiziert werden.

Die Analyse der beiden Repeatpolymorphismen in einem gemeinsamen Lauf brachte allerdings einige Schwierigkeiten mit sich. Es wurde beobachtet, dass sich sowohl die Quantität als auch teilweise die Qualität der Fluoreszenzsignale innerhalb weniger Stunden deutlich verschlechterte.

Um zu überprüfen, ob sowohl der Faktor Zeit, als auch die Temperatur eine Rolle bei diesem Phänomen spielen, wurde folgendes Experiment durchgeführt: die beiden Repeats (CAG) $n$  und (GGC) $n$  eines männlichen Probanden wurden nach Protokoll amplifiziert, getrennt denaturiert und anschließend zu zwei Parallelansätzen (Ansatz 1 und 2) zusammenpipettiert. Anschließend erfolgte die Analyse von Ansatz 1 am ABI310 (Zeitpunkt 0). Ansatz 1 wurde danach bei RT stehen gelassen, Ansatz 2 stattdessen von Anfang an gekühlt (4-8°C). Ansatz 1 wurde nach 3h erneut analysiert, und danach alle 2h wieder. Zum Schluss (nach ~7,5h) wurde auch der durchgehend gekühlte Ansatz 2 analysiert und die Fluoreszenzsignale verglichen. In Abb.4.16 sind die Ergebnisse des Experiments zusammengefasst.



**Abb.4.16:** Ergebnis des Zeit- und Temperatur-Experiments der AR-Analyse.

A: Fluoreszenzsignale des (CAG) $n$ -Repeats ●

B: Fluoreszenzsignale des (GGC) $n$ -Repeats ●

Beide Repeats sind getrennt dargestellt, wurden aber in einem gemeinsamen Lauf analysiert.

● und ● Zeitpunkt 0

● nach ~3h bei RT

● nach ~7h bei RT

● nach ~5h bei RT

● nach ~7,5h Kühlung bei 4-8°C

Unser Experiment zeigte deutlich, dass die gemeinsame Analyse der beiden Repeatpolymorphismen im AR-Gen sowohl zeit- als auch temperaturabhängige Ergebnisse bzw. Verfälschungen liefert. Nach bereits 3h bei RT war der (CAG)<sub>n</sub>-Repeat kaum noch auszuwerten und das Fluoreszenzsignal zeigte nur noch 30% seiner vorherigen Intensität (Abb.4.16 A schwarz). Nach ~5h bei RT sank die Intensität sogar auf 15% (A, braun), verschlechterte sich allerdings danach nicht mehr deutlich (A, orange). Die gekühlte Probe hingegen zeigte sogar noch nach 7,5h eine Intensität von fast 90% im Vergleich zu Zeitpunkt 0 (A, rot).

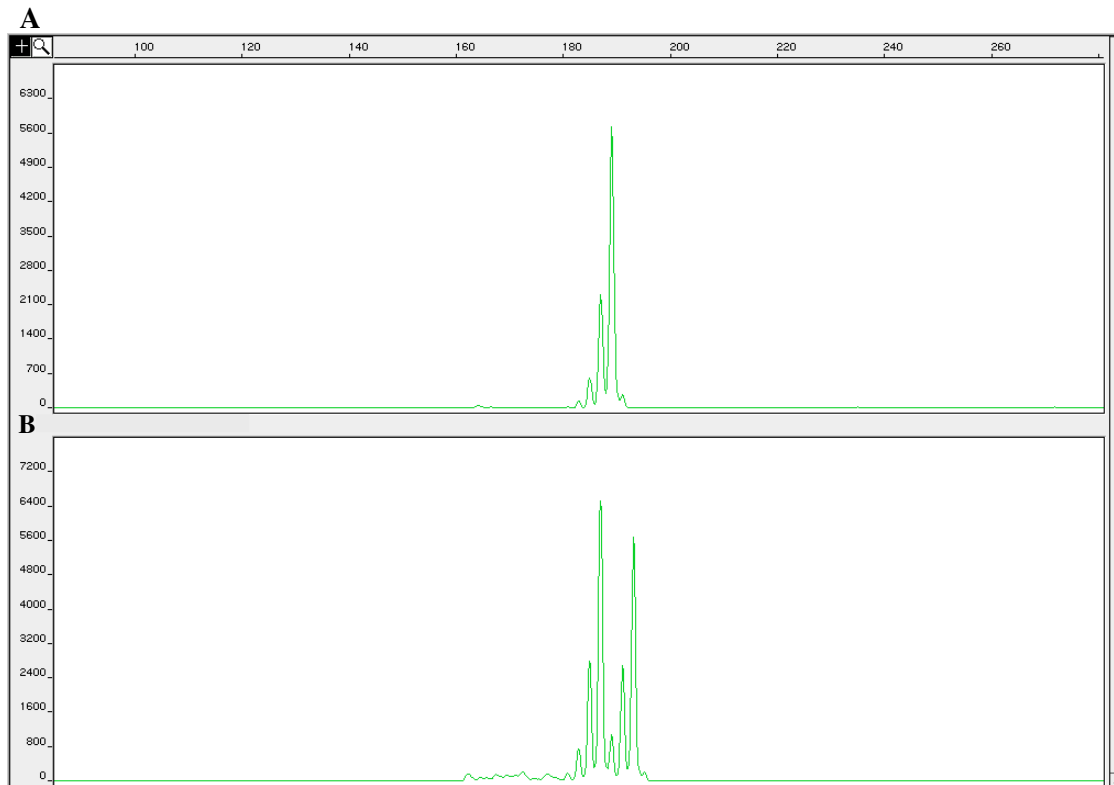
Der (GGC)<sub>n</sub>-Repeat ließ sich nach 3h bei RT zwar noch auswerten, verlor aber 60% seiner Intensität im Vergleich zu Zeitpunkt 0 (B, schwarz). Nach 5h bzw. 7h bei RT betrug die Intensität nur noch 30% (B, braun bzw. orange). Die Kühlung der Probe lieferte auch noch nach 7,5h eine Signalintensität von 95% (B, rot).

#### *4.1.2.4.2 Der Dinukleotid-Polymorphismus (CA)<sub>n</sub> im IGF1-Gen*

Im Gen des „Insulin-like growth factor 1“ (IGF1) wurde ein polymorpher (CA)<sub>n</sub>-Repeat innerhalb des Promotorbereichs untersucht. Die Anzahl der Dinukleotide schwankt laut Literatur zwischen 10 und 24, wobei das 19-er Allel als Wildtyp angesehen wird (Allen et al., 2002; Rosen et al., 1998; Vaessen et al., 2001).

Es wurde zunächst von dem zu untersuchenden Bereich ein fluoreszenzmarkiertes Amplifikat mit Hilfe eines JOE-gelabelten Primerpaares hergestellt (vgl. Vaessen et al., 2001). Anschließend wurde die genaue Anzahl der Dinukleotide ebenfalls mittels Kapillarelektrophorese am Sequencher ABI310 Genetic Analyzer bestimmt (3.2.2.7; Abb.4.17).

Die Reaktionsansätze, inklusive der Wahl der Primer und Reaktionsbedingungen, sowie die verschiedenen Berechnungsschritte der eigentlichen Repeat-Länge, sind im Methodikteil (3.2.2.7) beschrieben.



**Abb.4.17:** Beispiel einer Fragmentlängenbestimmung des (CA) $n$ -Repeats des IGF1-Gens.

A: Hier ist ein homozygoter Proband zu erkennen. Die Fragmentlänge von 189bp entspricht einer Repeatlänge von  $n=19$  ( $\pm 1$ ), d. h. hier lag der Genotyp 19/19 (=WT) vor.

B: Zu sehen ist ein heterozygoter Proband mit dem Genotyp 18/21 ( $\pm 1$ ).

Innerhalb unseres Untersuchungskollektivs konnten acht verschiedene Allele gefunden werden ( $n = 11, 17, 18, 19, 20, 21, 22$  und  $23$ ).



## 4.2 Zusammenhang der einzelnen Polymorphismen mit einer physiologischen Herzhypertrophie

Um den Zusammenhang der einzelnen Polymorphismen und dem Vorliegen eines Sportherzens zu analysieren, wurden die Genotypen mittels statistischen linearen Modellen mit den beiden Parametern Herzvolumen und linksventrikuläre Muskelmasse in Zusammenhang gebracht.

Nachfolgend werden alle Mittelwerte (MW) inklusive der zugehörigen Standardabweichungen (SD) und Standardfehler (SE) folgendermaßen angegeben: MW  $\pm$ SD/SE.

### 4.2.1 Echokardiographische Ergebnisse

Vom Institut für Sport- und Präventivmedizin der Universität des Saarlandes wurden folgende echokardiographischen Parameter bestimmt:

- das **relative Herzvolumen**, in Bezug auf das Körpergewicht und
- die **linksventrikuläre Muskelmasse in Bezug auf die Körperoberfläche (LVM/KOF bzw. als LVM angegeben)**, berechnet nach der sog. Teichholz-Formel (s. Methodik 3.2.1)

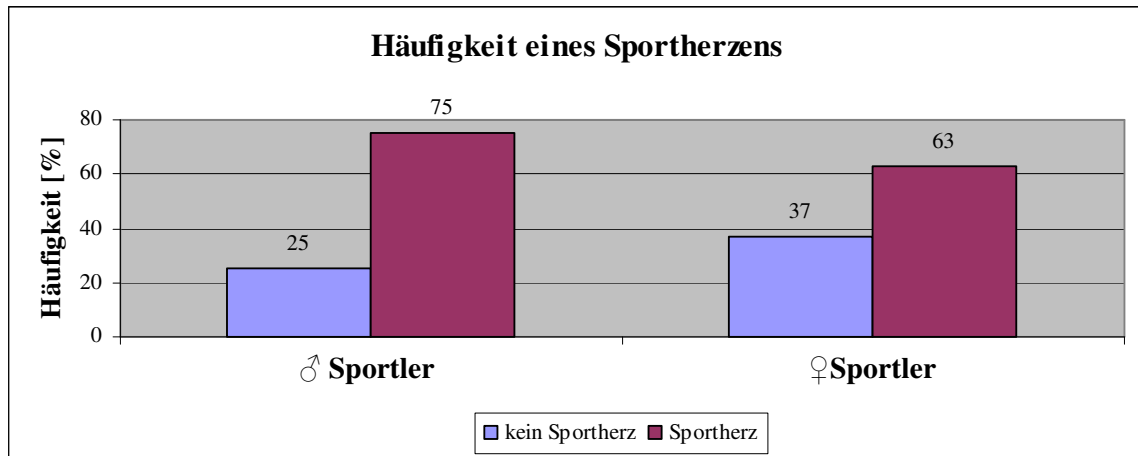
Die Mittelwerte inklusive Standardabweichungen und Standardfehler dieser beiden Parameter innerhalb unserer Population sind in folgender Tabelle angegeben:

**Tab.4.3:** Relatives Herzvolumen und LVM innerhalb des Untersuchungskollektivs (MW  $\pm$ SD/SE).

<b>Population</b>	<b>Relatives Herzvolumen [ml/kg]</b>	<b>LVM/KOF [g/m<sup>2</sup>]</b>
Kontrollen (♂)	11,0 $\pm$ 1/0,2	89 $\pm$ 8/1,5
Sportler gesamt	13,5 $\pm$ 1/0,1	97 $\pm$ 18/2
♀ Sportler	12,6 $\pm$ 1/0,2	87 $\pm$ 13/2
♂ Sportler	13,9 $\pm$ 1/0,1	101 $\pm$ 18/2

Tab.4.3 zeigt, dass die männlichen Sportler sowohl ein durchschnittlich um 26% größeres relatives Herzvolumen als auch eine durchschnittlich um 13% größere linksventrikuläre Muskelmasse aufwiesen als die männlichen Kontrollen. Die Werte der weiblichen Ausdauersportler waren umgekehrt im Durchschnitt um 10% bzw. 14% kleiner als die der männlichen Ausdauersportler.

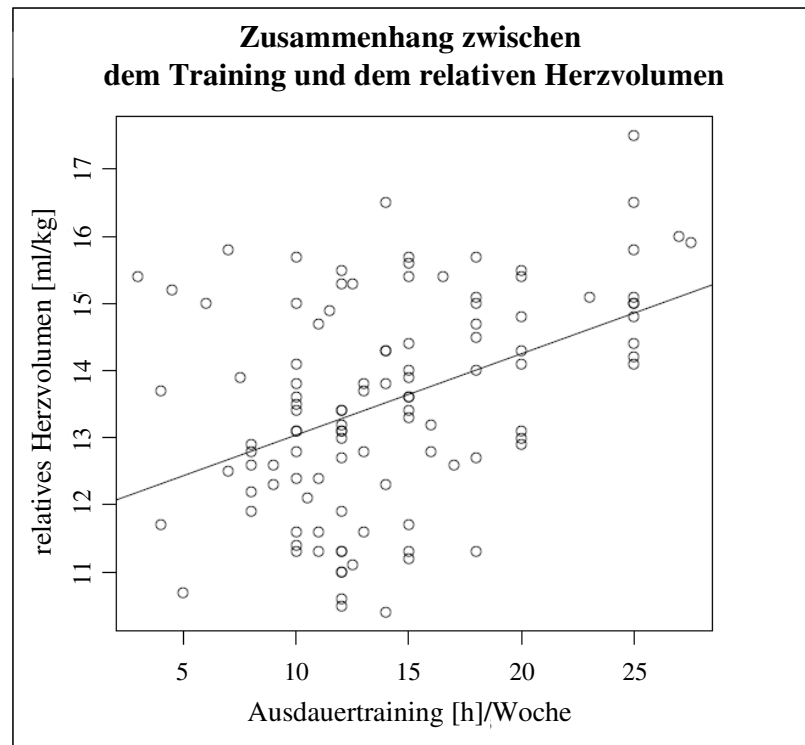
Bei einer Definition des Sportherzens ab einem relativen Herzvolumen von  $>13\text{ml/kg}$  bei Männern bzw.  $>12\text{ml/kg}$  bei Frauen, besaßen 75% der männlichen und 63% der weiblichen Ausdauersportler unseres Untersuchungskollektivs ein Sportherz (Abb.4.18).



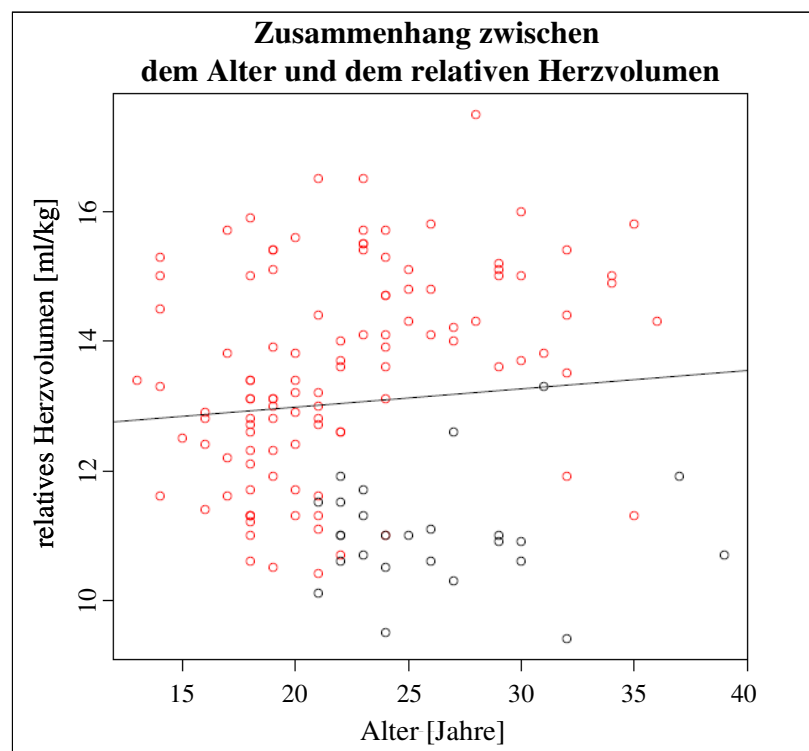
**Abb.4.18:** Häufigkeit eines Sportherzens innerhalb unseres Sportlerkollektivs.

Ein Sportherz ist definiert ab einem relativen Herzvolumen von  $>13\text{ml/kg}$  bei Männern und  $>12\text{ml/kg}$  bei Frauen (rot). Blau bedeutet kein Sportherz.

Die statistische Überprüfung ergab, dass das Training (Ausdauertraining [h]/Woche) einen signifikant erhöhenden Effekt auf das relative Herzvolumen (Abb.4.19) der Ausdauersportler hatte ( $+0,1 (\pm 0,2/0,02) \text{ml/kg pro h}$ ;  $p=0,000015$ ), wobei die Frauen im Vergleich zu den Männern ein signifikant kleineres Herzvolumen aufwiesen ( $-0,98 (\pm 1,2/0,2) \text{ml/kg}$ ;  $p=0,00056$ ).



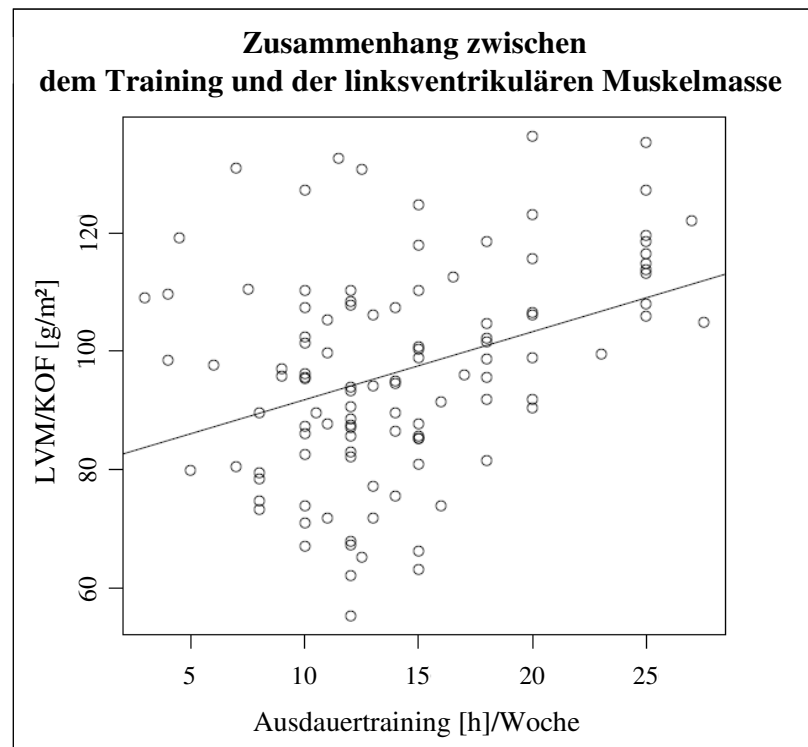
**Abb.4.19:** Zusammenhang zwischen dem Training und dem relativen Herzvolumen. Dargestellt ist das relative Herzvolumen [ml/kg] der Ausdauersportler in Abhängigkeit von der Anzahl der Trainingsstunden pro Woche.



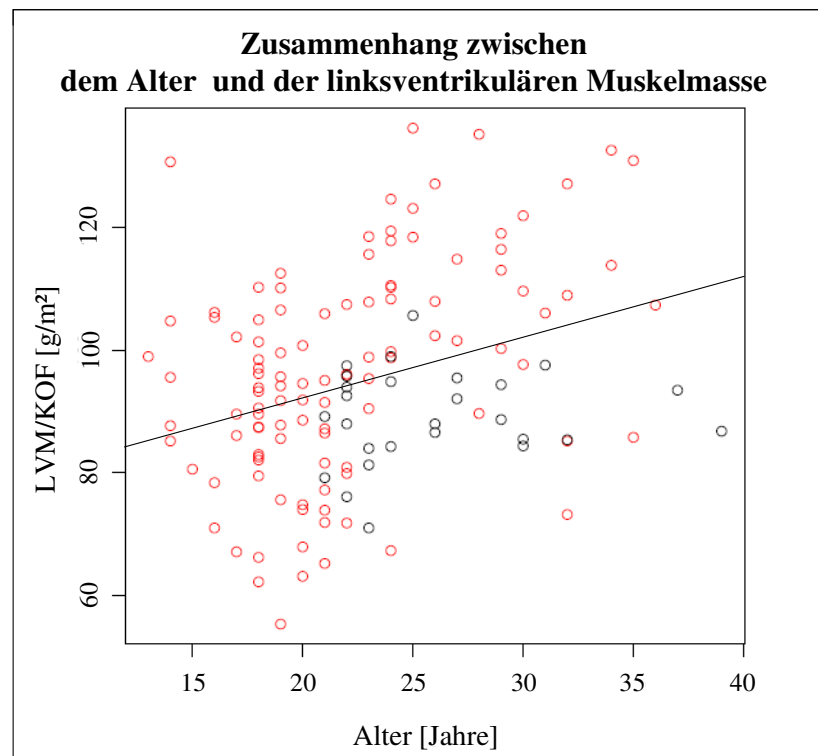
**Abb.4.20:** Zusammenhang zwischen dem Alter der Probanden und dem relativen Herzvolumen. Dargestellt ist das relative Herzvolumen [ml/kg] in Abhängigkeit vom Alter [Jahre] der Probanden. Die untrainierten Kontrollen sind als schwarze Kreise dargestellt, die Sportler als rote Kreise.

Zusätzlich zeigten die älteren Probanden (Abb.4.20) durchschnittlich etwas größere Werte ( $+0,08 (\pm 0,3/0,03)$  ml/kg pro Jahr;  $p=0,011$ ). Seit wie vielen Jahren die Sportler bereits Leistungssport betrieben (Anzahl der Sportjahre) zeigte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf das relative Herzvolumen ( $p=0,87$ ). Dieses mehrdimensionale Modell besaß ein Bestimmtheitsmaß von  $r^2_{\text{adj}}=0,34$ ; d.h.  $\sim 34\%$  der Streuung des relativen Herzvolumens konnten bereits durch die lineare Abhängigkeit der Faktoren Training, Geschlecht und Alter erklärt werden.

Bei der LVM konnten wir dieselben Effekte beobachten: das Training (Ausdauertraining [h]/Woche) hatte einen signifikant erhöhenden Effekt (Abb.4.21) innerhalb des Sportlerkollektivs ( $+0,9 (\pm 2/0,2)$  g/m<sup>2</sup> pro h;  $p=0,00046$ ), sowie das Alter (Abb.4.22) der Probanden ( $+1,3 (\pm 3/0,3)$  g/m<sup>2</sup> pro Jahr;  $p=0,00012$ ).



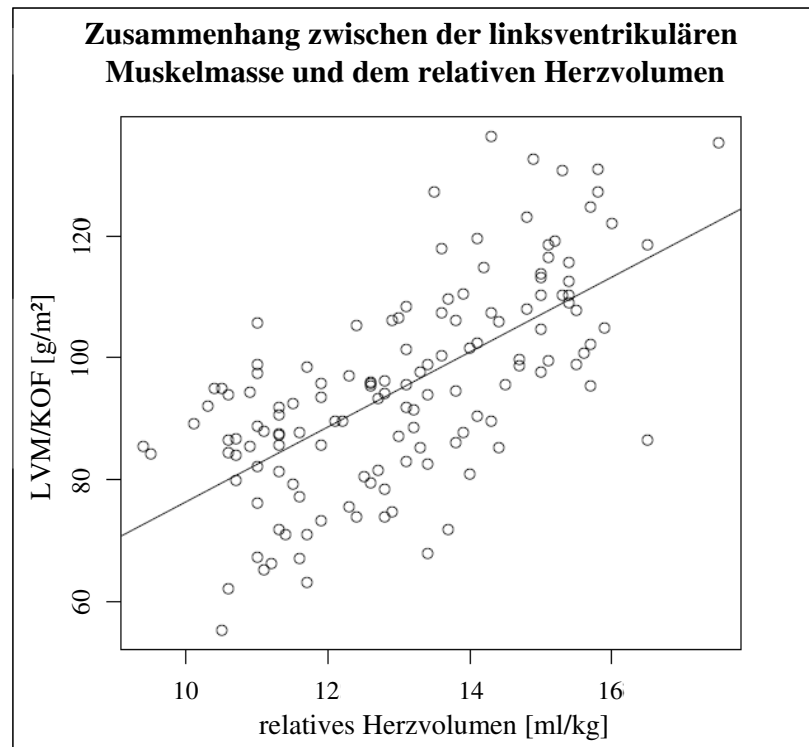
**Abb.4.21:** Zusammenhang zwischen dem Training und der linksventrikulären Muskelmasse. Dargestellt ist die LVM/KOF [g/m<sup>2</sup>] der Ausdauersportler in Abhängigkeit von der Anzahl der Trainingsstunden/Woche.



**Abb.4.22:** Zusammenhang zwischen dem Alter der Probanden und der linksventrikulären Muskelmasse. Dargestellt ist die LVM/KOF [g/m<sup>2</sup>] in Abhängigkeit vom Alter [Jahre] der Probanden. Die untrainierten Kontrollen sind als schwarze Kreise dargestellt, die Sportler als rote Kreise.

Die LVM war bei Frauen deutlich kleiner ( $-10,2 (\pm 17/3) \text{ g/m}^2$ ;  $p=0,0015$ ) als bei den Männern; die Anzahl der Sportjahre ergab keinen signifikanten Effekt ( $p=0,18$ ). In diesem Fall besaß das mehrdimensionale Modell ein Bestimmtheitsmaß von  $r^2_{\text{adj}}=0,33$ ; d.h. ~33% der Streuung der linksventrikulären Muskelmasse konnten bereits durch die lineare Abhängigkeit der Faktoren Training, Geschlecht und Alter erklärt werden.

Bei einer Überprüfung der Korrelation der beiden Parameter LVM und relatives Herzvolumen (Abb.4.23) stellte sich Folgendes heraus:



**Abb.4.23:** Zusammenhang zwischen der linksventrikulären Muskelmasse und dem relativen Herzvolumen.

In diesem Streudiagramm ist der Zusammenhang zwischen der LVM/KOF und dem relativen Herzvolumen dargestellt.  $R^2_{\text{adj}}=0,43$ .

Das Modell besaß ein Bestimmtheitsmaß von  $r^2_{\text{adj}}=0,43$ , d.h. 43% der Varianz des relativen Herzvolumens konnten durch die LVM erklärt werden.

Aufgrund dieser allgemeinen Zusammenhänge, erfolgte eine Adjustierung des linearen statistischen Modells um die Parameter Training, Geschlecht und Alter, um möglichst saubere statistische Aussagen über den Zusammenhang der Polymorphismen mit den echokardiographischen Parametern zu erhalten.

Der Einfluss der Polymorphismen wurde mit Hilfe von ANOVA-Modellen überprüft (s. Material und Methodik 3.2.3.2).

#### 4.2.2 Polymorphismen im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

##### 4.2.2.1 Die Genotyp- und Allelverteilungen

Die Genotypfrequenzen der RAAS-Polymorphismen innerhalb unseres Untersuchungskollektivs wurden mittels  $\chi^2$ -Test auf ein Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG) untersucht (3.2.3.1). Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.4 dargestellt. Zusätzlich wurde mit Hilfe des  $\chi^2$ -Tests überprüft, ob sich die Genotypfrequenzen unserer männlichen Sportler von denen unserer männlichen Kontrollen, bzw. ob sich die der weiblichen Sportler von denen der männlichen Sportler signifikant unterscheiden.

**Tab.4.4:** Genotyp- und Allelfrequenzen (b=beobachtet; e=erwartet) der RAAS-Polymorphismen innerhalb des Untersuchungskollektivs. Prüfung auf eventuelle Abweichungen vom HWG (p-Werte).

AGT M235T		Genotypen [%]			Allele [%]		p
		M/M	M/T	T/T	M	T	
Kontrollen (♂)	b	<b>30</b>	<b>55</b>	<b>15</b>	<b>57</b>	<b>43</b>	>0,3
	e	32,5	49	18,5	55	39	
Sportler gesamt	b	<b>33</b>	<b>42</b>	<b>25</b>	<b>54</b>	<b>46</b>	>0,2
	e	29	50	21	57	50	
♀ Sportler	b	<b>31</b>	<b>43</b>	<b>26</b>	<b>53</b>	<b>47</b>	>0,3
	e	28	50	22	55	50	
♂ Sportler	b	<b>33</b>	<b>42</b>	<b>25</b>	<b>54</b>	<b>46</b>	>0,2
	e	29	50	21	57	50	
AGT T174M		T/T	T/M	M/M	T	M	
Kontrollen (♂)	b	<b>70</b>	<b>30</b>	<b>0</b>	<b>85</b>	<b>15</b>	>0,2
	e	72	26	2	84	16	
Sportler gesamt	b	<b>73</b>	<b>25</b>	<b>2</b>	<b>85,5</b>	<b>14,5</b>	~1
	e	73	25	2	85,5	14,5	
♀ Sportler	b	<b>77</b>	<b>20</b>	<b>3</b>	<b>87</b>	<b>13</b>	>0,7
	e	76	22	2	87	17	
♂ Sportler	b	<b>71</b>	<b>28</b>	<b>1</b>	<b>85</b>	<b>15</b>	>0,7
	e	72	26	2	84	10	
ACE I/D		I/I	I/D	D/D	I	D	
Kontrollen (♂)	b	<b>30↑</b>	<b>37↓</b>	<b>33↑</b>	<b>48,5</b>	<b>51,5</b>	<0,05
	e	23,5	50	26,5	54	57	
Sportler gesamt	b	<b>30</b>	<b>46</b>	<b>24</b>	<b>53</b>	<b>47</b>	>0,7
	e	28	50	22	54	49	
♀ Sportler	b	<b>37</b>	<b>43</b>	<b>20</b>	<b>58,5</b>	<b>41,5</b>	>0,3
	e	34	49	17	61	44	
♂ Sportler	b	<b>26</b>	<b>48</b>	<b>26</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	>0,9
	e	25	50	25	51	51	
B2BKR 9bpI/D		I/I	I/D	D/D	I	D	
Kontrollen (♂)	b	<b>37</b>	<b>44</b>	<b>19</b>	<b>59</b>	<b>41</b>	>0,7
	e	35	48	17	60	43	
Sportler gesamt	b	<b>20</b>	<b>53</b>	<b>27</b>	<b>46,5</b>	<b>53,5</b>	>0,8
	e	22	50	28	45	52	
♀ Sportler	b	<b>8↓</b>	<b>66↑</b>	<b>26↓</b>	<b>41</b>	<b>59</b>	<0,001
	e	17	48	35	28	51	
♂ Sportler	b	<b>25</b>	<b>47</b>	<b>28</b>	<b>48,5</b>	<b>51,5</b>	>0,8
	e	23	50	27	50	52	

CMA -1903G/A		A/A	G/A	G/G	A	G	
Kontrollen (♂)	b	37	37	26	55,5	44,5	<0,1
	e	31	49	20	61	51	
Sportler gesamt	b	30	50	20	55	45	~1
	e	30	50	20	55	45	
♀ Sportler	b	29	54	17	56	44	>0,7
	e	31	50	19	54	41	
♂ Sportler	b	31	49	20	55,5	44,5	~1
	e	31	49	20	55,5	44,6	
AT <sub>1</sub> R 1166A/C		A/A	A/C	C/C	A	C	
Kontrollen (♂)	b	44	41	15	64,5	35,5	>0,5
	e	41,5	46	12,5	66	38	
Sportler gesamt	b	45	44	11	67	33	~1
	e	45	44	11	67	33	
♀ Sportler	b	52	34	14	69	31	>0,1
	e	47	43	10	72	37	
♂ Sportler	b	42	49	9	66,5	33,5	>0,5
	e	44	45	11	65	30	
AT <sub>2</sub> R 1675G/A		A/A	G/A	G/G	A	G	
Kontrollen (♂)	b				44	56	/
	e						
♀ Sportler	b	29↑	37↓	34↑	47,5	52,5	<0,05
	e	22	50	28	53	58	
♂ Sportler	b				51	49	/
	e						
CYP11B2 -344C/T		C/C	C/T	T/T	C	T	
Kontrollen (♂)	b	26↑	33↓	41↑	42,5	57,5	<0,01
	e	18	49	33	50	64	
Sportler gesamt	b	23	47	30	46,5	53,5	>0,8
	e	22	50	28	48	54	
♀ Sportler	b	20	49	31	44,5	55,5	~1
	e	20	49	31	44,5	55,5	
♂ Sportler	b	25	46	29	48	52	>0,7
	e	23	50	27	50	53	

Bei dem **AGT M235T-Polymorphismus** befanden sich alle Genotypfrequenzen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Allerdings unterschieden sich die Genotypfrequenzen unserer männlichen Sportler signifikant von denen unserer Kontrollen ( $p < 0,01$ ): es konnte eine Verschiebung der M/T-Heterozygoten zu den T/T-Homozygoten beobachtet werden. Der Vergleich der beiden Sportlergruppen zeigte keinen signifikanten Unterschied ( $p > 0,9$ ).

Auch bei dem **AGT T174M-Polymorphismus** befanden sich alle Genotypfrequenzen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Allerdings kam der AGT 174M/M-Genotyp innerhalb der Kontrollpopulation nicht vor. Der Vergleich unserer Gruppen untereinander zeigte weder einen signifikanten Unterschied zwischen den männlichen Sportlern und den männlichen Kontrollen ( $p > 0,9$ ), noch zwischen den beiden Sportlergruppen ( $p < 0,1$ ).



Die Genotypfrequenzen des **I/D-Polymorphismus** im **ACE-Gen** waren bei unseren Kontrollen nicht im HWG ( $p < 0,05$ ): die Heterozygoten (I/D) waren deutlich unterrepräsentiert (37% statt 50%  $\rightarrow$  -26%), wohingegen die beiden homozygoten Genotypen I/I (30% statt 23,5%  $\rightarrow$  +27%) und D/D (33% statt 26,5%  $\rightarrow$  +24%) etwa zu gleichen Teilen häufiger vorkamen. Bei den Sportlern lag ein HWG vor. Beim Vergleich der Gruppen untereinander zeigten sich nur tendenzielle Abweichungen zwischen den männlichen Sportlern und den Kontrollen ( $p < 0,1$ ). Die beiden Sportlergruppen unterschieden sich jedoch signifikant ( $p < 0,05$ ): die weiblichen Sportler zeigten deutlich mehr I/I-Homozygote als die männlichen Sportler, dafür waren die I/D-Heterozygoten und D/D-Homozygoten etwas unterrepräsentiert.

Die Genotypfrequenzen des **B2BKR 9bpI/D-Polymorphismus** befanden sich zwar bei den Kontrollen und den männlichen Sportlern im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, jedoch bei den weiblichen Sportlern nicht ( $p < 0,001$ ). Hier konnte man deutlich mehr I/D-Heterozygote finden (66% statt 48%  $\rightarrow$  +37,5%), wobei die I/I-Homozygoten nur etwa halb so häufig vorkamen, wie anhand der Allelfrequenzen zu erwarten wäre (8% statt 17%  $\rightarrow$  -53%). Auch die Anzahl der D/D-Homozygoten war geringer als erwartet (26% statt 35%  $\rightarrow$  -25%). Darüber hinaus brachte der Vergleich der Gruppen untereinander folgende signifikante Abweichungen: unsere männlichen Sportler zeigten im Vergleich zu unseren Kontrollen eine Verschiebung der Genotypfrequenzen zugunsten des D-Allels ( $p < 0,025$ ). Die I/I-Homozygoten waren unter-, die I/D-Heterozygoten und vor allem die D/D-Homozygoten überrepräsentiert. Beim Vergleich der Sportlergruppen untereinander ( $p < 0,0001$ ) konnten wir bei den weiblichen Sportlern sogar nur etwa 1/3 so viele I/I-Homozygote finden, wie bei den männlichen Sportlern. Hier erfolgte die Verschiebung aber hauptsächlich zugunsten der I/D-Heterozygoten. Die D/D-Homozygoten waren beinahe konstant.

Bei dem **CMA -1903G/A-Polymorphismus** waren sowohl die Genotypfrequenzen der Kontrollen, als auch die der Sportler im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Allerdings ergab der Vergleich der Gruppen untereinander erneut einen signifikanten Unterschied zwischen der männlichen Sportlergruppe und unseren männlichen Kontrollen ( $p < 0,05$ ): Die G/A-Heterozygoten waren bei den männlichen Sportlern stark überrepräsentiert, wohingegen die beiden homozygoten Formen zu gleichen Teilen unterrepräsentiert waren. Die Genotypfrequenzen der beiden Sportlergruppen unterschieden sich nicht signifikant ( $p > 0,5$ ).

Auch bei dem **AT<sub>1</sub>R 1166A/C-Polymorphismus** waren alle Gruppen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Jedoch zeigte sich beim Vergleich der Gruppen untereinander ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Sportlergruppen ( $p < 0,01$ ): die beiden homozygoten Formen waren bei den weiblichen Sportlern über-, die A/C-Heterozygoten unterrepräsentiert. Die männlichen Sportler und die männlichen Kontrollen unterscheiden sich nicht signifikant ( $p > 0,1$ ).

Die Genotypfrequenzen des X-chromosomalen **AT<sub>2</sub>R 1675G/A-Polymorphismus** befanden sich hingegen bei unseren weiblichen Sportlern nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ( $p < 0,05$ ): man konnte deutlich weniger G/A-Heterozygote finden als erwartet (37% statt 50%  $\rightarrow$  -26%), dafür aber mehr A/A- (29% statt 22%  $\rightarrow$  +31%) und G/G- (34% statt 28%  $\rightarrow$  +21%) Homozygote. Aufgrund des fehlenden Allels bei den Männern konnte hier kein HWG innerhalb der Männer-Gruppen (Kontrollen und männliche Sportler) überprüft werden. Beim Vergleich untereinander zeigten weder die männlichen Sportler und die Kontrollen ( $p > 0,1$ ), noch die beiden Sportlergruppen ( $p > 0,3$ ) signifikante Abweichungen bezüglich ihrer Allelfrequenzen.

Bei dem **-344C/T-Polymorphismus** der **Aldosteron-Synthase (CYP11B2)** waren die Genotypfrequenzen der Sportler im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, die der Kontrollen hingegen nicht ( $p < 0,01$ ). In der Kontrollgruppe waren deutlich weniger C/T-Heterozygote zu finden als erwartet (33% statt 49%  $\rightarrow$  -32%); die Homozygoten C/C (26% statt 18%  $\rightarrow$  +44%) und T/T (41% statt 33%  $\rightarrow$  +24%) waren dafür überrepräsentiert. Zusätzlich zeigte der Vergleich zwischen den Kontrollen und den männlichen Sportlern einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,025$ ): während die Häufigkeiten der C/C-Homozygoten fast identisch waren, waren auch hier die C/T-Heterozygoten bei den Kontrollen deutlich unter-, die T/T-Homozygoten überrepräsentiert. Die beiden Sportlergruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander ( $p \sim 0,5$ ).

#### 4.2.2.2 Zusammenhang zwischen den einzelnen RAAS-Polymorphismen und den Herzparametern

##### Einfluss auf das relative Herzvolumen

Wie in Tab.4.5 zu sehen ist, hatte keiner der untersuchten RAAS-Polymorphismen einen statistisch signifikanten Einfluss auf das relative Herzvolumen.

**Tab.4.5:** Statistischer Zusammenhang (p-Werte) zwischen den RAAS-Polymorphismen und dem relativen Herzvolumen

<b>Polymorphismus</b>	<b>p</b>
CYP11B2 -344C/T	0,2
AT <sub>1</sub> R 1166A/C	0,5
AGT M235T	0,6
AT <sub>2</sub> R 1675G/A	0,8
B2BKR 9bpI/D	0,8
AGT T174M	0,9
ACE I/D	0,9
CMA -1903G/A	0,9

##### Einfluss auf die linksventrikuläre Muskelmasse

In Tabelle 4.6 kann man erkennen, dass der **CYP11B2 -344C/T-Polymorphismus** als einziger der untersuchten RAAS-Polymorphismen tendenziell einen Einfluss auf die LVM zeigte ( $p=0,07$ ). Bei allen anderen RAAS-Polymorphismen konnte kein signifikanter Zusammenhang mit der linksventrikulären Muskelmasse nachgewiesen werden ( $p>0,3$ ).

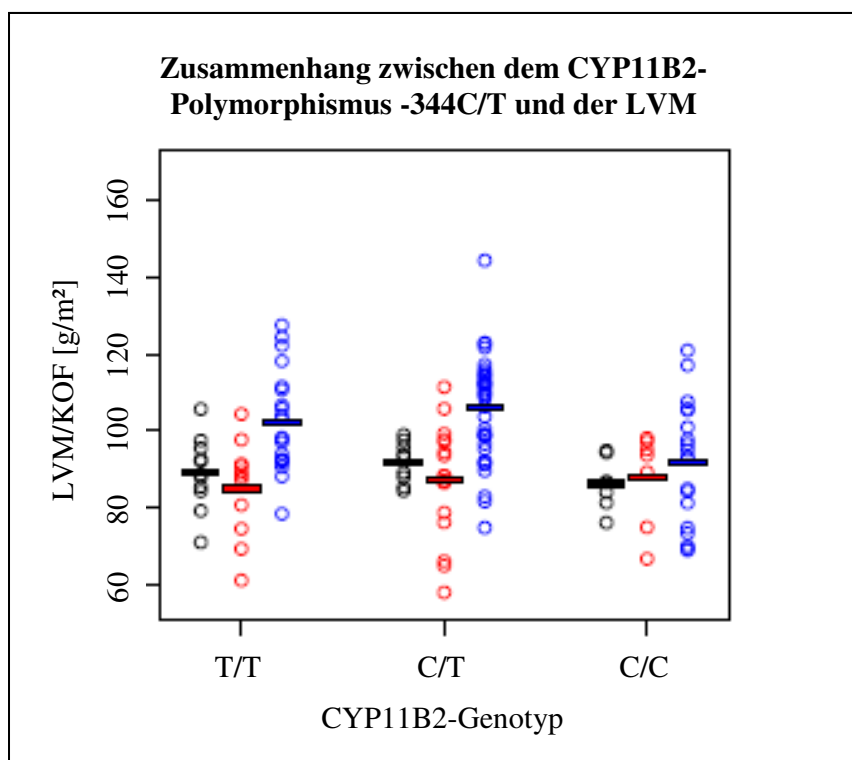
**Tab.4.6:** Statistischer Zusammenhang (p-Werte) zwischen den RAAS-Polymorphismen und der LVM bei den Ausdauersportlern

<b>Polymorphismus</b>	<b>p</b>
CYP11B2 -344C/T	0,07
CMA -1903G/A	0,3
ACE I/D	0,4
AT <sub>1</sub> R 1166A/C	0,6
AGT T174M	0,7
B2BKR 9bpI/D	0,7
AT <sub>2</sub> R 1675G/A	0,8
AGT M235T	0,8

Bei einer detaillierteren Betrachtung des Zusammenhangs zwischen dem CYP11B2 -344C/T-Polymorphismus und der LVM stellte sich folgendes heraus:

**Tab.4.7:** Mittelwerte  $\pm$ SD/SE (n=Anzahl der Probanden) der LVM unserer Probanden, aufgeteilt nach den Genotypen des CYP11B2 -344C/T-Polymorphismus.

	LVM/KOF [g/m <sup>2</sup> ]	T/T	C/T	C/C
Kontrollen (♂)	89 $\pm$ 8/1,5 (n=27)	89 $\pm$ 9/3 (n=11)	92 $\pm$ 5/2 (n=9)	86 $\pm$ 7/3 (n=7)
Sportler gesamt	97 $\pm$ 18/2 (n=110)	97 $\pm$ 19/3 (n=32)	99 $\pm$ 16/2 (n=52)	91 $\pm$ 17/3 (n=26)
♀ Sportler	87 $\pm$ 13/2 (n=35)	82 $\pm$ 13/4 (n=11)	88 $\pm$ 14/3 (n=17)	89 $\pm$ 12/4 (n=7)
♂ Sportler	101 $\pm$ 18/2 (n=75)	104 $\pm$ 18/4 (n=21)	104 $\pm$ 15/2 (n=35)	92 $\pm$ 19/4 (n=19)



**Abb.4.24:** Zusammenhang zwischen dem CYP11B2-Polymorphismus -344C/T und der LVM innerhalb des Untersuchungskollektivs (adjustiert nach Alter und Training). Balken = Mittelwerte.  
 ● Kontrollen    ● weibliche Sportler    ● männliche Sportler

Bei der Kontrollgruppe zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem CYP11B2 -344C/T-Polymorphismus und der LVM. Bei der Sportlergruppe konnte ein geschlechtsspezifischer Unterschied beobachtet werden (Abb.4.24): der C/C-Genotyp war bei den männlichen Sportlern mit einer signifikant kleineren LVM assoziiert als die beiden Genotypen C/T und T/T ( $-10,7 (\pm 19/4) \text{ g/m}^2$ ;  $p=0,02$ ). Das Modell besaß bei der männlichen Sportlergruppe ein Bestimmtheitsmaß von  $r^2_{\text{adj}}=0,34$ ; d.h.  $\sim 34\%$  der Streuung der linksventrikulären Muskelmasse konnten durch die lineare Abhängigkeit

der Faktoren Training, Alter und Genotypen des CYP11B2 -344C/T-Polymorphismus erklärt werden.

Bei den weiblichen Sportlern war kein signifikanter Effekt zu beobachten ( $p > 0,3$ ).

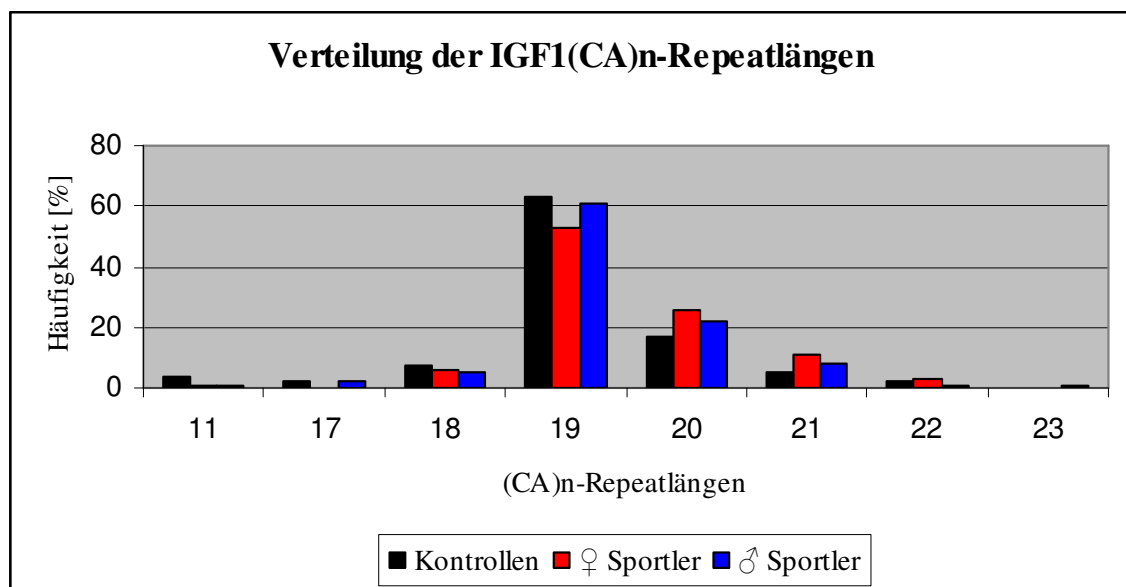
#### 4.2.3 Polymorphismen im IGF1-Signalweg

##### 4.2.3.1 Der IGF1(CA)n-Repeatpolymorphismus

###### 4.2.3.1.1 Die Genotyp- und Allelverteilungen

Innerhalb unseres Untersuchungskollektivs reichten die Repeatlängen des IGF1(CA)n-Repeatpolymorphismus von 11-22 (CA)-Wiederholungen bei den Kontrollen und den weiblichen Sportlern, und von 11-23 bei den männlichen Sportlern. Der Median lag bei allen drei Gruppen bei 19. Die Mittelwerte betragen 18,9 bei den Kontrollen, 19,3 bei den männlichen Sportlern und 19,4 bei den weiblichen Sportlern. Damit besaßen die Kontrollen durchschnittlich etwas kürzere Repeatlängen als die Sportler.

In Abb.4.25 ist die Verteilung der IGF1(CA)n-Repeatlängen dargestellt.



**Abb.4.25:** Verteilung der IGF1(CA)n-Repeatlängen innerhalb des Untersuchungskollektivs. Dargestellt sind die Häufigkeiten der Allele getrennt nach Kontrollen, weiblichen Sportlern und männlichen Sportlern.

Das 19-Allel, das als Wildtyp angesehen wird, kam sowohl bei den Kontrollen (63%) und den weiblichen Sportlern (53%) als auch bei den männlichen Sportlern (61%) am häufigsten vor. Das zweithäufigste Allel war das 20-Allel (Kontrollen: 17%; ♀ Sportler:

26%; ♂ Sportler: 22%). Alle restlichen Allele kamen deutlich seltener vor, wobei Allel 23 lediglich bei einem männlichen Sportler zu finden war.

Die unterschiedlichen Allele des IGF1(CA)n-Repeat-Polymorphismus werden in der Literatur anhand der Anzahl der (CA)-Wiederholungen (n) meist nur in die beiden Gruppen n=19 und n≠19 unterteilt (Allen et al., 2002; Bleumink et al., 2005; Rosen et al., 1998; Vaessen et al., 2001). Daraus ergibt sich die Unterteilung in die drei Genotypen homozygoter Wildtyp (19/19), heterozygot für den Wildtyp und ein anderes Allel (19/≠19) und Nicht-Träger des Wildtyps (≠19/≠19). Aus diesem Grund wurden die acht unterschiedlichen Allele innerhalb unseres Untersuchungskollektivs (Allele 11, 17, 18, 19, 20, 21, 22 und 23) ebenfalls in diese drei Genotypen unterteilt (Tab.4.8) und mittels  $\chi^2$ -Test auf ein Hardy-Weinberg-Gleichgewicht untersucht. Zusätzlich erfolgte mit Hilfe des  $\chi^2$ -Tests der Vergleich der Genotypfrequenzen unserer Gruppen untereinander.

**Tab.4.8:** Genotyp- und Allelfrequenzen (b=beobachtet; e=erwartet) des (CA)n-Repeatpolymorphismus im IGF1-Gen innerhalb des Untersuchungskollektivs. Prüfung auf eventuelle Abweichungen vom HWG (p-Werte).

IGF1(CA)n-Repeat		Genotypen [%]			Allele [%]		p
		19/19	19/≠19	≠19/≠19	19	≠19	
Kontrollen (♂)	b	41	44	15	63	37	>0,9
	e	40	46	14	64	38	
Sportler gesamt	b	36	44	20	58	42	>0,5
	e	34	49	17	60	44	
♀ Sportler	b	37↑	31,5↓	31,5↑	53	47	<0,01
	e	28	50	22	60	56	
♂ Sportler	b	36	49	15	61	39	>0,975
	e	37	48	15	60	39	

Die Genotypfrequenzen unserer Kontrollgruppe und unserer männlichen Sportlergruppe befanden sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, die der Sportlerinnen jedoch nicht ( $p < 0,01$ ). Hier zeigten sich deutlich weniger 19/≠19-Heterozygote als man anhand der Allelfrequenzen erwarten würde (31,5% statt 50% → -37%). Dafür waren mehr Homozygote für 19/19 (+32%) als auch "Homozygote" für ≠19/≠19 (+43%), zu finden.

Der Vergleich der Gruppen untereinander ergab zusätzlich hochsignifikante Abweichungen zwischen den weiblichen und den männlichen Sportlern ( $p < 0,0001$ ): auch im Vergleich zu den männlichen Sportlern zeigten die weiblichen Sportler signifikant weniger 19/≠19-Heterozygote, dafür aber prozentual mehr als doppelt so viele ≠19/≠19-"Homozygote". Die 19/19-Homozygoten kamen in beiden Gruppen fast gleich häufig vor. D.h. es konnte eine Verschiebung zu den Nicht-Wildtyp-Allelen

innerhalb der weiblichen Sportlergruppe beobachtet werden. Zwischen den männlichen Sportlern und den Kontrollen konnte kein signifikanter Zusammenhang beobachtet werden ( $p > 0,5$ ).

#### 4.2.3.1.2 Zusammenhang zwischen dem IGF1(CA)n-Repeatpolymorphismus und den Herzparametern

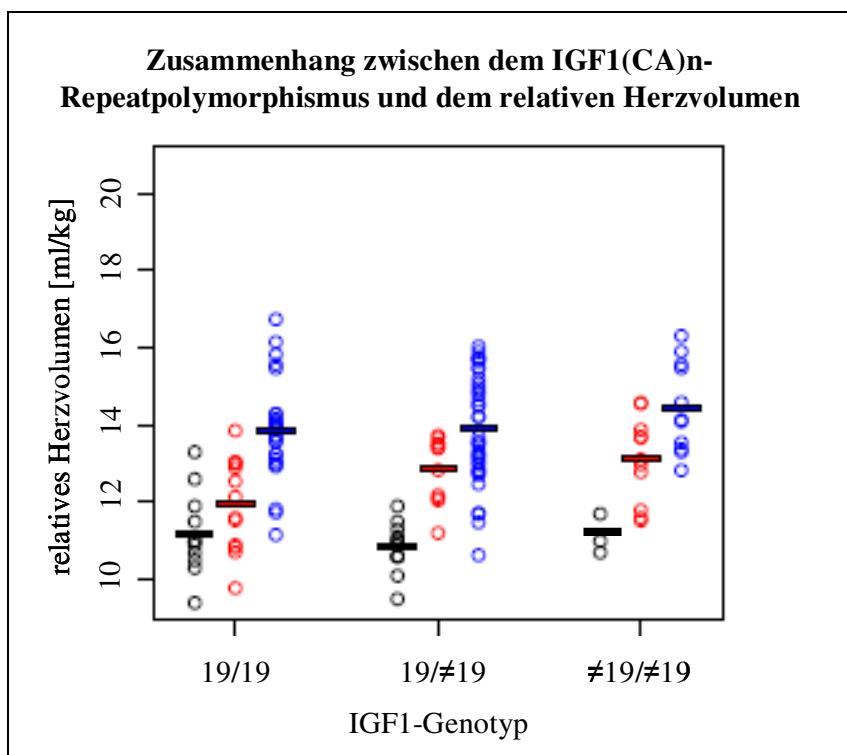
##### Einfluss auf das relative Herzvolumen

Die statistische Analyse ergab lediglich einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem IGF1(CA)n-Repeatpolymorphismus und dem relativen Herzvolumen der Ausdauersportler. Nicht-Träger des Wildtyps ( $\neq 19/\neq 19$ ) hatten im Durchschnitt ein um  $0,8 (\pm 1/0,3)$  ml/kg größeres relatives Herzvolumen als Probanden mit dem 19/19-Genotyp ( $p = 0,03$ ;  $r^2_{\text{adj}} = 0,36$ ).

Bei getrennter Betrachtung der männlichen und weiblichen Ausdauersportler stellte sich jedoch heraus, dass dieser Zusammenhang nur bei den weiblichen Sportlern statistisch signifikant war (Abb.4.26).

**Tab.4.9:** Mittelwerte  $\pm$ SD/SE (n=Anzahl der Probanden) des relativen Herzvolumens unserer Probanden, aufgeteilt nach Genotypen des IGF1(CA)n-Repeatpolymorphismus.

	<b>Herzvolumen [ml/kg]</b>	<b>19/19</b>	<b>19/<math>\neq</math>19</b>	<b><math>\neq</math>19/<math>\neq</math>19</b>
Kontrollen (♂)	11,0 $\pm$ 1/0,2 (n=27)	11,2 $\pm$ 1/0,3 (n=11)	10,8 $\pm$ 1/0,3 (n=12)	11,1 $\pm$ 0,5/0,2 (n=4)
Sportler gesamt	13,5 $\pm$ 1/0,1 (n=110)	13,2 $\pm$ 1/0,2 (n=40)	13,7 $\pm$ 2/0,3 (n=48)	13,7 $\pm$ 1/0,2 (n=22)
♀ Sportler	12,6 $\pm$ 1/0,2 (n=35)	12,1 $\pm$ 1/0,3 (n=13)	12,7 $\pm$ 1/0,3 (n=11)	13,0 $\pm$ 1/0,3 (n=11)
♂ Sportler	13,9 $\pm$ 1/0,1 (n=75)	13,7 $\pm$ 1/0,2 (n=27)	14,0 $\pm$ 2/0,3 (n=37)	14,5 $\pm$ 1/0,3 (n=11)



**Abb.4.26:** Zusammenhang zwischen dem IGF1(CA)n-Repeatpolymorphismus und dem relativen Herzvolumen innerhalb des Untersuchungskollektivs (adjustiert nach Alter und Training). Balken = Mittelwerte.

○ Kontrollen    ● weibliche Sportler    ● männliche Sportler

Bereits das Vorliegen eines Nicht-WT-Allels (19/≠19) war bei den weiblichen Sportlern mit einem größeren relativen Herzvolumen assoziiert (+0,9 ( $\pm 1/0,4$ ) ml/kg;  $p=0,053$ ). Nicht-Trägerinnen des Wildtyps (≠19/≠19) zeigten sogar ein um 1,1 ( $\pm 1/0,4$ ) ml/kg größeres Herzvolumen als Trägerinnen des 19/19-Genotyps ( $p=0,02$ ;  $r^2_{\text{adj}}=0,27$ ). Die männlichen Sportler, die Nicht-Träger des WT-Allels (≠19/≠19) waren, zeigten zwar ebenfalls ein etwas größeres Herzvolumen, allerdings nicht signifikant ( $p=0,2$ ).

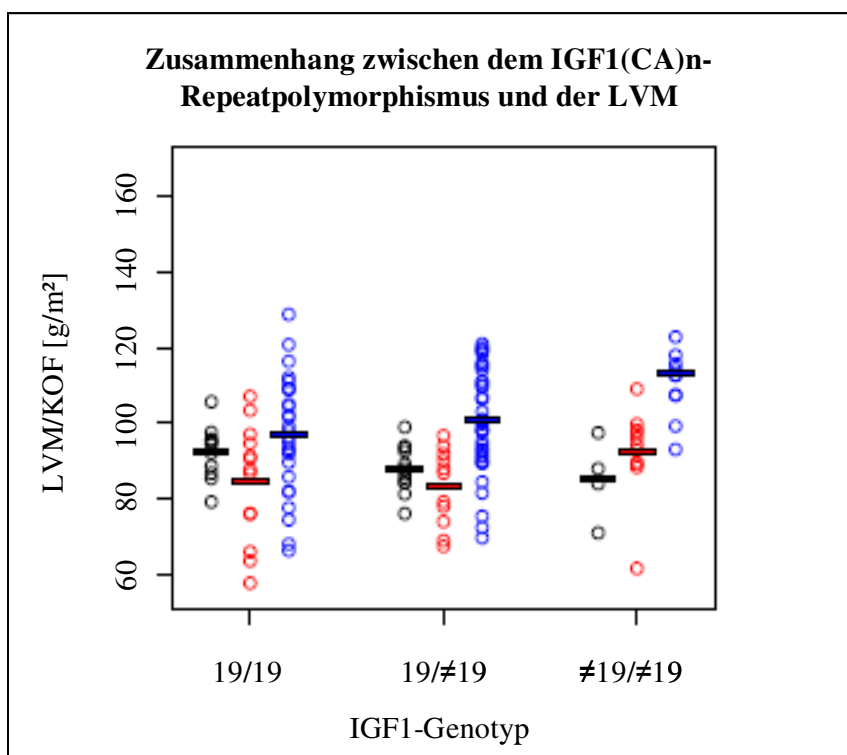
#### Einfluss auf die linksventrikuläre Muskelmasse

Während innerhalb der Kontrollgruppe kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem IGF1(CA)n-Repeatpolymorphismus und der LVM zu erkennen war, zeigte sich jedoch ein hoch-signifikanter Zusammenhang innerhalb der Sportlergruppe: Sportler, die Nicht-Träger des WT-Allels (≠19/≠19) waren, besaßen durchschnittlich eine um 12,6 ( $\pm 14/3$ ) g/m<sup>2</sup> größere LVM als homozygote Träger des Wildtyps (19/19), mit einer Signifikanz von  $p=0,001$  ( $r^2_{\text{adj}}=0,38$ ).



**Tab.4.10:** Mittelwerte  $\pm$ SD/SE (n=Anzahl der Probanden) der LVM unserer Probanden, aufgeteilt nach Genotypen des IGF1(CA)n-Repeatpolymorphismus.

	LVM/KOF [g/m <sup>2</sup> ]	19/19	19/≠19	≠19/≠19
Kontrollen (♂)	89 $\pm$ 8/1,5 (n=27)	92 $\pm$ 7/2 (n=11)	88 $\pm$ 6/2 (n=12)	85 $\pm$ 11/5,5 (n=4)
Sportler gesamt	97 $\pm$ 18/2 (n=110)	93 $\pm$ 18/3 (n=40)	97 $\pm$ 18/3 (n=48)	102 $\pm$ 15/3 (n=22)
♀ Sportler	87 $\pm$ 13/2 (n=35)	86 $\pm$ 15/4 (n=13)	82 $\pm$ 11/3 (n=11)	91 $\pm$ 12/4 (n=11)
♂ Sportler	101 $\pm$ 18/2 (n=75)	96 $\pm$ 18/3 (n=27)	102 $\pm$ 17/3 (n=37)	113 $\pm$ 10/3 (n=11)



**Abb.4.27:** Zusammenhang zwischen dem IGF1(CA)n-Repeatpolymorphismus und der LVM innerhalb des Untersuchungskollektivs (adjustiert nach Alter und Training). Balken = Mittelwerte.

● Kontrollen    ● weibliche Sportler    ● männliche Sportler

Bei einer geschlechtsspezifischen Betrachtung stellte sich jedoch nur bei den männlichen Sportlern ein signifikanter Zusammenhang heraus (Abb.4.27). Die männlichen Sportler, die ein Nicht-WT-Allel trugen (19/≠19), zeigten nur eine leichte Vergrößerung der LVM (+3,5 ( $\pm$ 24/4) g/m<sup>2</sup>; p=0,35) im Vergleich zu den homozygoten WT-Trägern (19/19). Diejenigen, die kein WT-Allel trugen (≠19/≠19) hatten eine durchschnittlich um 16,4 ( $\pm$ 16/5) g/m<sup>2</sup> größere LVM als Träger des 19/19-Genotyps (p=0,003; r<sup>2</sup><sub>adj</sub>=0,32). Bei den weiblichen Sportlern konnten zwar ebenfalls leicht erhöhte Werte bei Nicht-Trägerinnen des WT-Allels (≠19/≠19) beobachtet werden, allerdings nicht statistisch signifikant (p=0,2). Diese Befunde weichen von denjenigen

beim relativen Herzvolumen ab, das bei den weiblichen Sportlern signifikant erhöht war.

#### 4.2.3.2 Der IGF1R 3174G/A-Polymorphismus

##### *4.2.3.2.1 Die Genotyp- und Allelverteilungen*

Die Genotyp- und Allelverteilungen des 3174G/A-Polymorphismus im IGF1-Rezeptor-Gen innerhalb unseres Untersuchungskollektivs sind in folgender Tabelle dargestellt:

**Tab.4.11:** Genotyp- und Allelfrequenzen (b=beobachtet; e=erwartet) des IGF1R 3174G/A-Polymorphismus innerhalb des Untersuchungskollektivs. Prüfung auf eventuelle Abweichungen vom HWG (p-Werte).

IGF1R 3174G/A		Genotypen [%]			Allele [%]		p
		G/G	G/A	A/A	G	A	
Kontrollen (♂)	b	26	48	26	50	50	>0,9
	e	25	50	25	51	51	
Sportler gesamt	b	25	54	21	52	48	>0,7
	e	27	50	23	50	46	
♀ Sportler	b	23	54	23	50	50	>0,7
	e	25	50	25	48	48	
♂ Sportler	b	26	54	20	53	47	>0,7
	e	28	50	22	51	45	

Beim 3174G/A-Polymorphismus des IGF1-Rezeptors befanden sich sowohl die Genotypfrequenzen der Kontrollgruppe, als auch die der Sportlergruppen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Auch der Vergleich der Gruppen untereinander zeigte weder zwischen den männlichen Sportlern und den Kontrollen ( $p>0,3$ ), noch zwischen den beiden Sportlergruppen ( $p>0,5$ ) signifikante Abweichungen der Genotypfrequenzen.

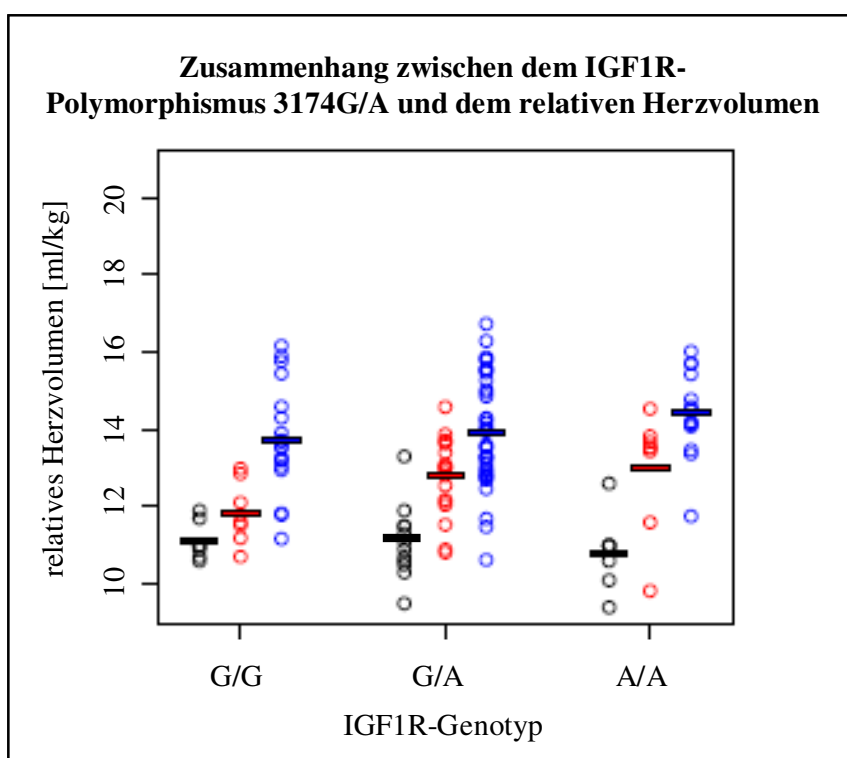
##### *4.2.3.2.2 Zusammenhang zwischen dem IGF1R 3174G/A-Polymorphismus und den Herzparametern*

###### Einfluss auf das relative Herzvolumen

Die statistische Analyse ergab einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem IGF1R 3174G/A-Polymorphismus und dem relativen Herzvolumen der Ausdauersportler, nicht aber der Kontrollen. Sportler mit dem A/A-Genotyp hatten im Schnitt ein um 0,8 ( $\pm 1/0,3$ ) ml/kg größeres relatives Herzvolumen als Sportler mit dem G/G-Genotyp ( $p=0,02$ ). Bei Vorliegen eines A-Allels (G/A) zeigte sich zwar ebenfalls ein etwas größeres Herzvolumen als bei G/G-Homozygoten, allerdings nicht statistisch signifikant ( $p=0,15$ ). Das Bestimmtheitsmaß für dieses Modell betrug  $r^2_{adj}=0,36$ .

**Tab.4.12:** Mittelwerte  $\pm$ SD/SE (n=Anzahl der Probanden) des relativen Herzvolumens unserer Probanden, aufgeteilt nach Genotypen des IGF1R 3174G/A-Polymorphismus.

	Herzvolumen [ml/kg]	G/G	G/A	A/A
Kontrollen (♂)	11,0 $\pm$ 1/0,2 (n=27)	11,1 $\pm$ 0,5/0,2 (n=7)	11,1 $\pm$ 1/0,3 (n=13)	10,8 $\pm$ 1/0,4 (n=7)
Sportler gesamt	13,5 $\pm$ 1/0,1 (n=110)	13,1 $\pm$ 2/0,4 (n=28)	13,6 $\pm$ 1/0,1 (n=59)	14,0 $\pm$ 2/0,4 (n=23)
♀ Sportler	12,6 $\pm$ 1/0,2 (n=35)	11,6 $\pm$ 1/0,3 (n=8)	12,9 $\pm$ 1/0,2 (n=19)	13,0 $\pm$ 1/0,3 (n=8)
♂ Sportler	13,9 $\pm$ 1/0,1 (n=75)	13,7 $\pm$ 1/0,2 (n=20)	14,0 $\pm$ 1/0,2 (n=40)	14,4 $\pm$ 2/0,5 (n=15)



**Abb.4.28:** Zusammenhang zwischen dem IGF1R-Polymorphismus 3174G/A und dem relativen Herzvolumen innerhalb des Untersuchungskollektivs (adjustiert nach Alter und Training).

Balken = Mittelwerte.

● Kontrollen    ● weibliche Sportler    ● männliche Sportler

Bei getrennter Betrachtung der männlichen und weiblichen Ausdauersportler (Abb.4.28) stellte sich jedoch heraus, dass nur bei den weiblichen Sportlern ein signifikant größeres Herzvolumen mit Vorhandensein von mindestens einem A-Allel vorlag (G/A: +1,0 ( $\pm$ 2/0,4) ml/kg mit  $p=0,03$ ; A/A: +1,3 ( $\pm$ 1/0,5) ml/kg mit  $p=0,02$ ). Das Bestimmtheitsmaß für dieses Modell betrug  $r^2_{\text{adj}}=0,26$ .

Die männlichen Sportler zeigten zwar bei Vorliegen eines A-Allels ebenfalls ein etwas größeres Herzvolumen, jedoch nicht signifikant ( $p>0,1$ ).

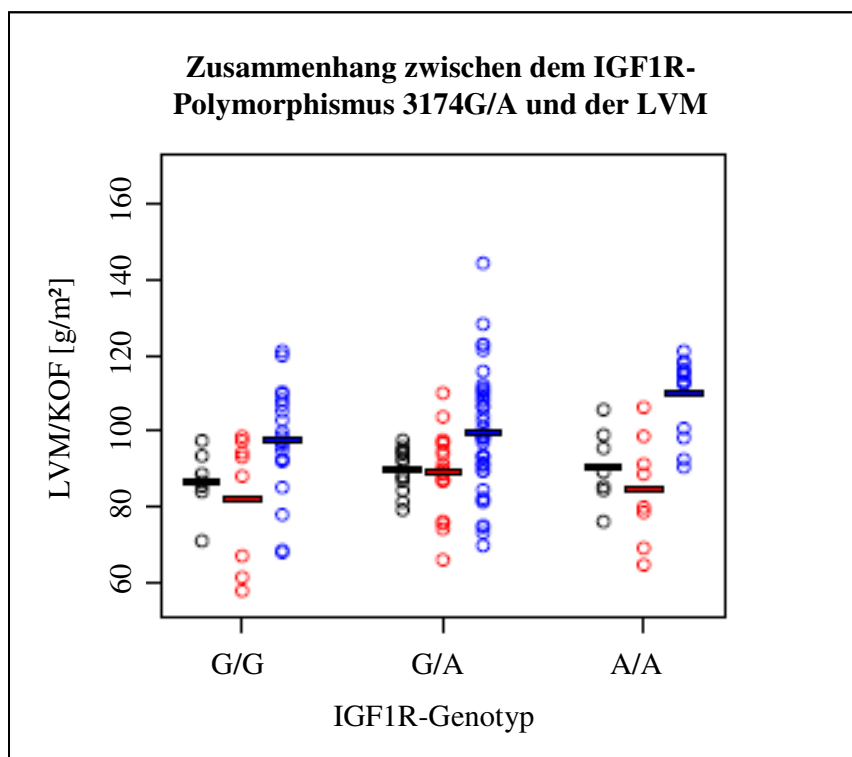
### Einfluss auf die linksventrikuläre Muskelmasse

Auch bei der linksventrikulären Muskelmasse stellte sich innerhalb des Sportlerkollektivs ein signifikanter Zusammenhang mit dem IGF1R 3174G/A-Polymorphismus heraus, während die Kontrollen auch hier keinen signifikanten Zusammenhang zeigten.

Das Vorliegen eines A-Allels war bei den Sportlern bereits mit einer leicht erhöhten LVM assoziiert, wenn auch nicht signifikant ( $p=0,2$ ). Sportler, die homozygot für das A-Allel waren, zeigten eine durchschnittlich um  $9,3 (\pm 19/4)$  g/m<sup>2</sup> größere LVM als die G/G-Homozygoten, mit einer Signifikanz von  $p=0,02$  ( $r^2_{\text{adj}}=0,34$ ).

**Tab.4.13:** Mittelwerte  $\pm$ SD/SE (n=Anzahl der Probanden) der LVM unserer Probanden, aufgeteilt nach Genotypen des IGF1R 3174G/A-Polymorphismus.

	<b>LVM/KOF [g/m<sup>2</sup>]</b>	<b>G/G</b>	<b>G/A</b>	<b>A/A</b>
<b>Kontrollen (♂)</b>	89 $\pm$ 8/1,5 (n=27)	87 $\pm$ 8/3 (n=7)	90 $\pm$ 6/2 (n=13)	91 $\pm$ 10/4 (n=7)
<b>Sportler gesamt</b>	97 $\pm$ 18/2 (n=110)	92 $\pm$ 18/3 (n=28)	97 $\pm$ 17/2 (n=59)	101 $\pm$ 19/4 (n=23)
<b>♀ Sportler</b>	87 $\pm$ 13/2 (n=35)	79 $\pm$ 15/5 (n=8)	90 $\pm$ 13/3 (n=19)	85 $\pm$ 11/4 (n=8)
<b>♂ Sportler</b>	101 $\pm$ 18/2 (n=75)	97 $\pm$ 16/4 (n=20)	100 $\pm$ 18/3 (n=40)	110 $\pm$ 16/4 (n=15)



**Abb.4.29:** Zusammenhang zwischen dem IGF1R-Polymorphismus 3174G/A und der LVM innerhalb des Untersuchungskollektivs (adjustiert nach Alter und Training). Balken = Mittelwerte.  
 ○ Kontrollen    ● weibliche Sportler    ● männliche Sportler

Wie in Abb.4.29 zu erkennen, war der Zusammenhang zwischen dem 3174G/A-Polymorphismus im IGF1-Rezeptor und der linksventrikulären Muskelmasse ebenfalls geschlechtsunterschiedlich. Die getrennte Betrachtung der Geschlechter ergab, dass männliche Sportler mit dem A/A-Genotyp durchschnittlich eine um 12,8 ( $\pm 19/5$ ) g/m<sup>2</sup> größere LVM besaßen als diejenigen mit dem G/G-Genotyp ( $p=0,01$ ), während sich die LVM der G/A-Träger von der der G/G-Trägern nicht signifikant unterschied ( $+2$  ( $\pm 25/4$ ) g/m<sup>2</sup>;  $p=0,56$ ). Das Bestimmtheitsmaß für dieses Modell betrug  $r^2_{\text{adj}}=0,30$ . Bei den weiblichen Sportlern konnte kein signifikanter Effekt festgestellt werden ( $p>0,1$ ).

#### 4.2.3.3 Der Deletions-Polymorphismus im Myostatin-Gen (GDF8)

##### 4.2.3.3.1 Die Genotyp- und Allelverteilungen

Die Genotyp- und Allelverteilungen des bisher unbeachteten GDF8 IVS1+88\_90delA-Polymorphismus innerhalb unseres Untersuchungskollektivs sind in folgender Tabelle dargestellt:

**Tab.4.14:** Genotyp- und Allelfrequenzen (b=beobachtet; e=erwartet) des GDF8 A/delA-Polymorphismus innerhalb des Untersuchungskollektivs. Prüfung auf eventuelle Abweichungen vom HWG (p-Werte).

GDF8 IVS1+88_90delA		Genotypen [%]			Allele [%]		p
		A/A	A/-	-/-	A	-	
<b>Kontrollen</b> (♂)	<b>b</b>	<b>59</b>	<b>37</b>	<b>4</b>	<b>78</b>	<b>22</b>	>0,7
	<b>e</b>	61	34	5	77	20	
<b>Sportler gesamt</b>	<b>b</b>	<b>72</b>	<b>23</b>	<b>5</b>	<b>83,5</b>	<b>16,5</b>	>0,3
	<b>e</b>	70	27	3	85	22	
♀ <b>Sportler</b>	<b>b</b>	<b>68</b>	<b>23↓</b>	<b>9↑</b>	<b>80</b>	<b>20</b>	<0,01
	<b>e</b>	64	32	4	82	30	
♂ <b>Sportler</b>	<b>b</b>	<b>74</b>	<b>22</b>	<b>4</b>	<b>85</b>	<b>15</b>	>0,2
	<b>e</b>	72	26	2	86	20	

Bei dem IVS1+88\_90delA-Polymorphismus im Myostatin-Gen (GDF8; rs11333758) befand sich wiederum die Gruppe der Sportlerinnen als einzige nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ( $p<0,01$ ). In dem weiblichen Untersuchungskollektiv konnte man mehr als doppelt so viele homozygote Träger des Deletions-Allels finden als erwartet (9% statt 4%  $\rightarrow +125\%$ ), wohingegen die Heterozygoten deutlich unterrepräsentiert waren (23% statt 32%  $\rightarrow -28\%$ ). Auch der Vergleich der Gruppen untereinander ergab folgende signifikanten Unterschiede: die männlichen Sportler zeigten im Vergleich zu den männlichen Kontrollen eine Verschiebung zugunsten des A-Allels ( $p<0,01$ ). Die A/A-Homozygoten waren über-, die Heterozygoten unterrepräsentiert, während die prozentualen Häufigkeiten der Homozygoten für das Deletionsallel (-/-) identisch waren. Zusätzlich unterschieden sich auch die beiden

Sportlergruppen signifikant voneinander ( $p < 0,05$ ). Hierbei zeigte sich eine Verschiebung zugunsten des Deletionsallels bei den weiblichen Sportlern. Sie zeigten prozentual mehr als doppelt so viele homozygote Träger des Deletions-Allels als die männliche Sportlergruppe, wohingegen die A/A-Träger unterrepräsentiert waren.

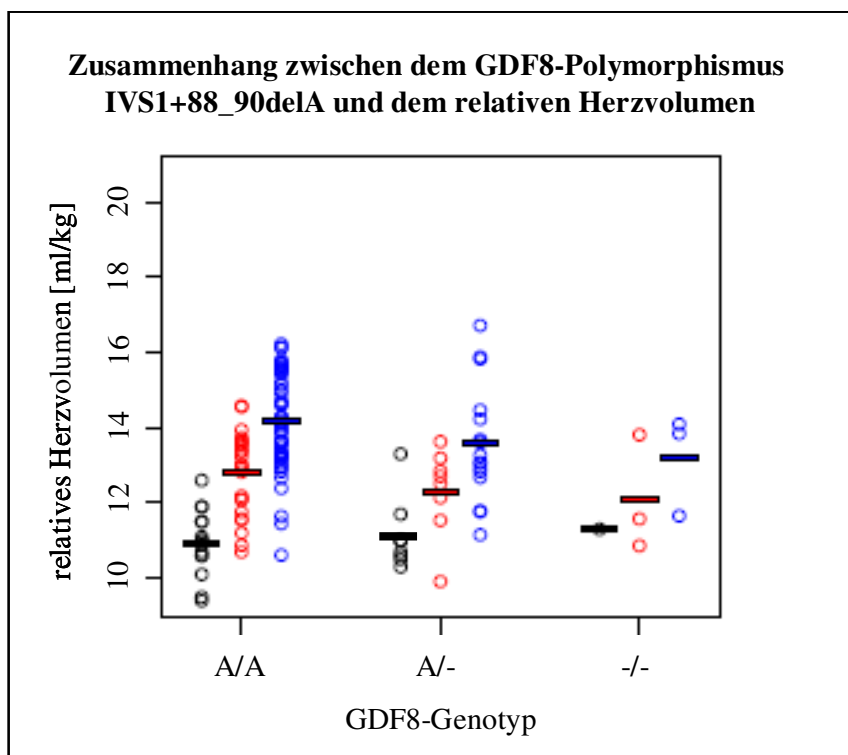
#### 4.2.3.3.2 Zusammenhang zwischen dem GDF8 IVS1+88\_90delA-Polymorphismus und den Herzparametern

##### Einfluss auf das relative Herzvolumen

Bei dem GDF8-Polymorphismus konnte bei Vorliegen eines Deletions-Allels (A/-) tendenziell ein durchschnittlich kleineres relatives Herzvolumen innerhalb der Sportler-Gruppe beobachtet werden ( $-0,54 (\pm 1/0,3)$  ml/kg mit  $p=0,06$ ). Jedoch wurde auch nach getrennter Betrachtung der Geschlechter (Abb.4.30) der Zusammenhang nicht signifikant ( $\text{♀}$  Sportler:  $p=0,4$ ;  $\text{♂}$  Sportler:  $p=0,12$ ).

**Tab.4.15:** Mittelwerte  $\pm$ SD/SE ( $n$ =Anzahl der Probanden) des relativen Herzvolumens unserer Probanden, aufgeteilt nach Genotypen des Polymorphismus im Myostatin-Gen (GDF8).

	<b>Herzvolumen [ml/kg]</b>	<b>A/A</b>	<b>A/-</b>	<b>-/-</b>
Kontrollen ( $\text{♂}$ )	11,0 $\pm$ 1/0,2 (n=27)	10,9 $\pm$ 1/0,2 (n=16)	11,1 $\pm$ 1/0,3 (n=10)	11,3 (n=1)
Sportler gesamt	13,5 $\pm$ 1/0,1 (n=110)	13,7 $\pm$ 1/0,1 (n=79)	13,1 $\pm$ 1/0,2 (n=25)	12,1 $\pm$ 1/0,4 (n=6)
$\text{♀}$ Sportler	12,6 $\pm$ 1/0,2 (n=35)	12,7 $\pm$ 1/0,2 (n=24)	12,3 $\pm$ 1/0,3 (n=8)	12,0 $\pm$ 1/0,6 (n=3)
$\text{♂}$ Sportler	13,9 $\pm$ 1/0,1 (n=75)	14,2 $\pm$ 1/0,1 (n=55)	13,4 $\pm$ 1/0,2 (n=17)	12,3 $\pm$ 1/0,6 (n=3)



**Abb.4.30:** Zusammenhang zwischen dem GDF8-Polymorphismus IVS1+88\_90delA und dem relativen Herzvolumen innerhalb des Untersuchungskollektivs (adjustiert nach Alter und Training). Balken = Mittelwerte.

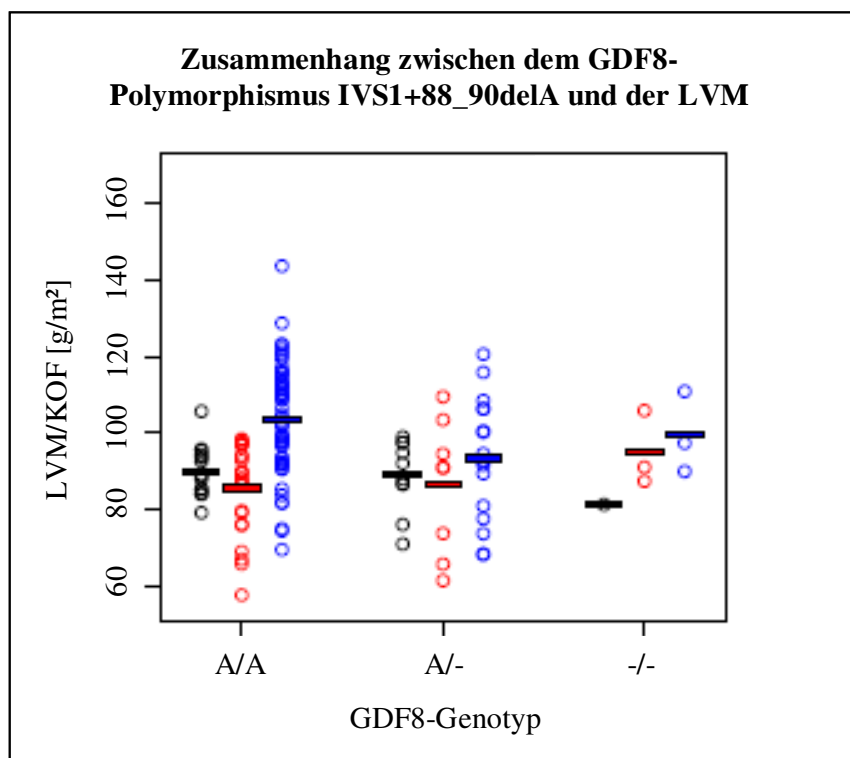
○ Kontrollen    ● weibliche Sportler    ● männliche Sportler

#### Einfluss auf die linksventrikuläre Muskelmasse

In Hinblick auf die linksventrikuläre Muskelmasse stellte sich ein signifikanter Zusammenhang mit dem GDF8-Polymorphismus innerhalb des Sportlerkollektivs heraus. Sportler mit einem Deletions-Allel (A/-) hatten durchschnittlich eine um 6,9 ( $\pm 15/3$ ) g/m<sup>2</sup> kleinere linksventrikuläre Muskelmasse als homozygote Träger des Wildtyps (A/A) ( $p=0,04$ ;  $r^2_{\text{adj}}=0,34$ ). Die Kontrollen zeigten auch hier keinen signifikanten Zusammenhang.

**Tab.4.16:** Mittelwerte  $\pm$ SD/SE (n=Anzahl der Probanden) der LVM unserer Probanden, aufgeteilt nach Genotypen des Polymorphismus im Myostatin-Gen (GDF8).

	<b>LVM/KOF [g/m<sup>2</sup>]</b>	<b>A/A</b>	<b>A/-</b>	<b>-/-</b>
<b>Kontrollen (♂)</b>	89 $\pm$ 8/1,5 (n=27)	90 $\pm$ 6/1,5 (n=16)	89 $\pm$ 9/3 (n=10)	81 (n=1)
<b>Sportler gesamt</b>	97 $\pm$ 18/2 (n=110)	99 $\pm$ 18/2 (n=79)	91 $\pm$ 16/3 (n=25)	91 $\pm$ 11/4 (n=6)
<b>♀ Sportler</b>	87 $\pm$ 13/2 (n=35)	85 $\pm$ 13/3 (n=24)	87 $\pm$ 16/6 (n=8)	93 $\pm$ 6/3 (n=3)
<b>♂ Sportler</b>	101 $\pm$ 18/2 (n=75)	105 $\pm$ 17/2 (n=55)	92 $\pm$ 16/4 (n=17)	90 $\pm$ 17/10 (n=3)



**Abb.4.31:** Zusammenhang des GDF8-Polymorphismus IVS1+88\_90delA mit der LVM innerhalb des Untersuchungskollektivs (adjustiert nach Alter und Training). Balken = Mittelwerte.

○ Kontrollen    ● weibliche Sportler    ● männliche Sportler

Der Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus und der LVM wurde bei geschlechtsspezifischer Betrachtung der Sportlergruppe sogar noch deutlicher (Abb.4.31). Männliche Sportler mit dem Genotyp A/- zeigten eine durchschnittlich um 10,3 ( $\pm 16/4$ ) g/m<sup>2</sup> kleinere LVM als diejenigen mit dem A/A-Genotyp ( $p=0,015$ ). Die homozygoten Träger des Deletions-Allels (-/-) besaßen zwar ebenfalls eine kleinere LVM als die A/A-Homozygoten, allerdings nicht statistisch signifikant ( $p=0,6$ ). Die geringen Zahlen lassen hier keine statistische Bewertung zu. Das Bestimmtheitsmaß für dieses Modell betrug  $r^2_{adj}=0,29$ .

Bei den weiblichen Sportlern zeigte sich kein signifikanter Effekt ( $p>0,3$ ).

Dieser bisher nicht beachtete Polymorphismus im GDF8-Gen scheint trotz seiner Position inmitten eines Introns einen Einfluss auf die LVM zu haben. Deshalb wurden die ersten 200bp in Intron1 des GDF8-Gens mittels Sequenzabgleich ([www.ensemble.org](http://www.ensemble.org)) auf Konservierung überprüft. Hierbei stellte sich heraus, dass dieser Sequenzbereich bei den Säugern evolutionsbiologisch hoch konserviert ist (z.B. Mensch-Maus: 79%, Mensch-Ratte: 80,5%, Mensch-Rind: 82%, Mensch-Rhesusaffe: 97%, Mensch-Schimpanse: 99,5%). Interessanterweise scheint das Deletions-Allel bei diesen Säugetieren die wildtypische Form zu sein, denn es sind bei den untersuchten



Spezies lediglich zwei Adenine (AA) an Position 88-90 in Intron1 angegeben anstatt wie beim Menschen drei (AAA). So sind beispielsweise die Sequenzen von Mensch und Schimpanse in diesem Bereich zu 100% identisch, bis auf die Adenin-Deletion an Position 88-90 beim Schimpansen.

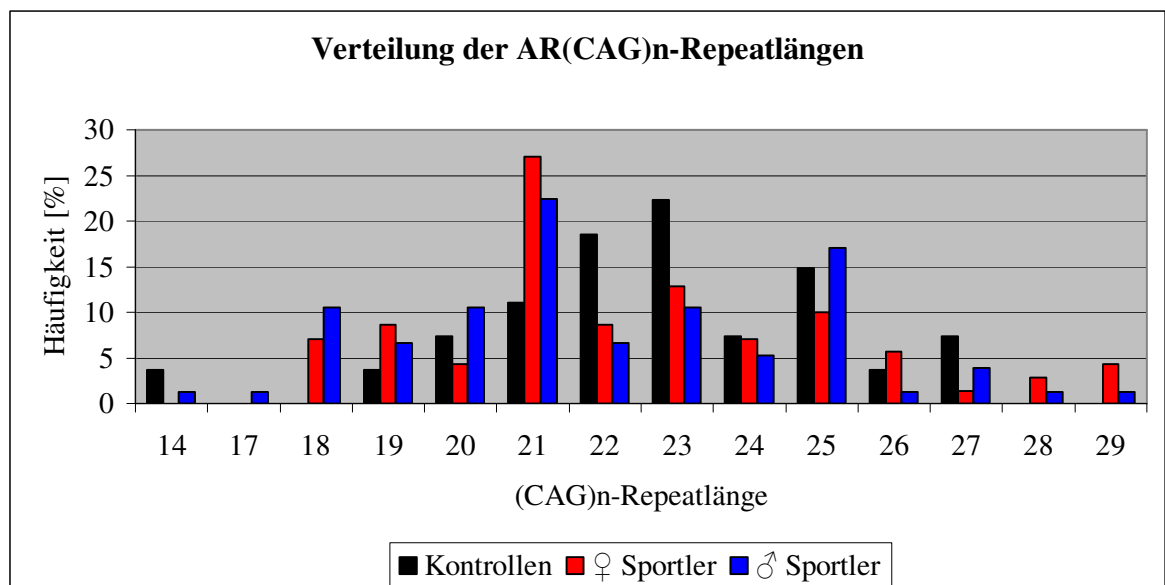
#### 4.2.4 Polymorphismen in assoziierten Signalwegen

##### 4.2.4.1 Die Polymorphismen im X-chromosmalen Androgen-Rezeptor-Gen (AR)

###### 4.2.4.1.1 Die Genotyp- und Allelverteilungen

Innerhalb der Normalbevölkerung reichen die Repeatlängen des (CAG)<sub>n</sub>-Repeatpolymorphismus von 9-37 CAG-Wiederholungen, wobei bei Europäern 21 Wiederholungen am häufigsten gefunden wurden (Edwards et al., 1992).

Innerhalb unserer untersuchten Population reichten sie von 14 bis 27 bei den Kontrollen, von 18 bis 29 bei den weiblichen Sportlern und von 14 bis 29 bei den männlichen Sportlern. Der Median lag bei den Kontrollen bei 23, bei den weiblichen Sportlern bei 22 und bei den männlichen Sportlern bei 21. Der Mittelwert des (CAG)<sub>n</sub>-Repeats lag bei den Kontrollen bei 22,7, bei den weiblichen Sportlern bei 22,4 und bei den männlichen Sportlern bei 21,9. D.h. die Repeatlängen waren bei den Sportlern im Schnitt etwas kleiner als bei den Kontrollen.

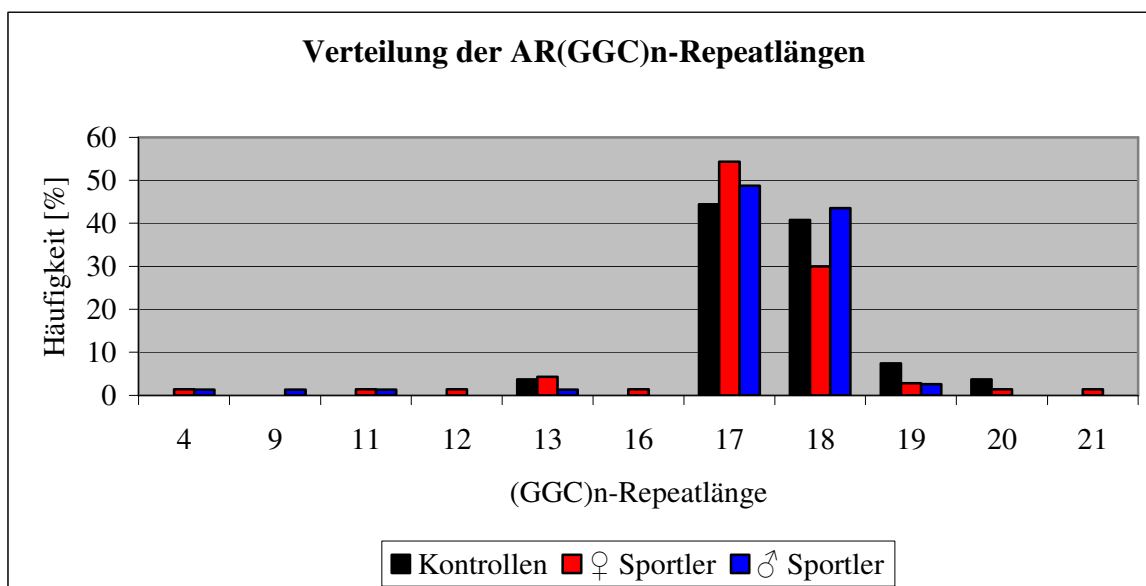


**Abb.4.32:** Verteilung der AR(CAG)<sub>n</sub>-Repeatlängen innerhalb unseres Untersuchungskollektivs. Dargestellt sind die Häufigkeiten der Allele getrennt nach Kontrollen, weiblichen Sportlern und männlichen Sportlern.

Die Abb.4.32 zeigt die Allel-Verteilungen des AR(CAG)n-Repeatpolymorphismus in unserem gesamten Untersuchungskollektiv.

Die Repeatlängen beim (GGC)n-Repeatpolymorphismus, die normalerweise zwischen 3-30 GGC-Wiederholungen liegen (Binnie et al., 2005; Sleddens et al., 1993), reichten von 13 bis 20 bei den Kontrollen, von 4 bis 21 bei den weiblichen Sportlern und von 4 bis 19 bei den männlichen Sportlern. Der Median lag bei den Kontrollen zwischen 17 und 18, und bei den Sportlern jeweils bei 17. Der Mittelwert des (GGC)n-Repeats lag bei den Kontrollen bei 17,5, bei den weiblichen Sportlern bei 16,9 und bei den männlichen Sportlern bei 17, d.h. die Repeatlängen waren auch bei dem (GGC)n-Repeatpolymorphismus bei den Sportlern im Schnitt kleiner als bei den Kontrollen.

Die Abb.4.33 zeigt die Verteilung der (GGC)n-Repeatlängen innerhalb unserer Population.



**Abb.4.33:** Verteilung der AR(GGC)n-Repeatlängen innerhalb des Untersuchungskollektivs. Dargestellt sind die Häufigkeiten der Allele getrennt nach Kontrollen, weiblichen Sportlern und männlichen Sportlern.

Die Allele 17 und 18 kamen innerhalb unserer Population am häufigsten vor. Anhand von Abb.4.33 kann man erkennen, dass die kürzeren (<13) nur innerhalb des Sportlerkollektivs zu finden waren (Ding et al., 2005).

Zur Erleichterung der Auswertung wurden unsere Repeatlängen wie in früheren Arbeiten folgendermaßen eingeteilt: die (CAG)n-Repeatlängen <22 wurden als “short“ (S) klassifiziert, diejenigen  $\geq 22$  als “long“ (L). Beim (GGC)n-Repeat wurden die Repeatlängen  $\leq 17$  mit “short“ (S) bezeichnet, die >17 als “long“ (L) (Binnie et al., 2005; Suter et al., 2003).

**Tab.4.17:** Genotyp- und Allelfrequenzen (b=beobachtet; e=erwartet) des (CAG)n- und (GGC)n-Polymorphismus im X-chromosomalen Androgen-Rezeptor-Gen innerhalb des Untersuchungskollektivs. Prüfung auf eventuelle Abweichungen vom HWG (p-Werte).

Einteilung der Genotypen beim (CAG)n-Repeat: S = n<22; L = n≥22;

Einteilung der Genotypen beim (GGC)n-Repeat: S = n≤17; L = n>17

AR (CAG)n-Repeat		Genotypen [%]			Allele [%]		p
		S/S	S/L	L/L	S	L	
<b>Kontrollen (♂)</b>	<b>b</b>				<b>26</b>	<b>74</b>	/
♀ <b>Sportler</b>	<b>b</b>	<b>23</b>	<b>48</b>	<b>29</b>	<b>47</b>	<b>53</b>	>0,9
	<b>e</b>	22	50	28	48	53	
♂ <b>Sportler</b>	<b>b</b>				<b>53</b>	<b>47</b>	/
<b>AR (GGC)n-Repeat</b>							
<b>Kontrollen (♂)</b>	<b>b</b>				<b>48</b>	<b>52</b>	/
♀ <b>Sportler</b>	<b>b</b>	<b>40</b>	<b>49</b>	<b>11</b>	<b>64,5</b>	<b>35,5</b>	>0,7
	<b>e</b>	41	46	13	63	33	
♂ <b>Sportler</b>	<b>b</b>				<b>54</b>	<b>46</b>	/

Sowohl bei dem (CAG)n- als auch bei dem (GGC)n-Polymorphismus im X-chromosomalen AR-Gen konnte lediglich die Gruppe der Sportlerinnen auf Vorliegen eines Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes überprüft werden, da sich bei den Männergruppen aufgrund des fehlenden Allels keine Erwartungs-Werte ermitteln ließen. In beiden Fällen befanden sich die Genotypfrequenzen der Sportlerinnen im HWG.

Beim Vergleich der Allelfrequenzen der Gruppen untereinander konnten wir beim (CAG)n-Repeat ein hochsignifikantes Abweichen der männlichen Sportlergruppe von der männlichen Kontrollgruppe feststellen ( $p < 0,0001$ ): die kurzen Allele (S) kamen bei den männlichen Sportlern mehr als doppelt so häufig vor wie bei den Kontrollen. Auf der anderen Seite waren die langen Allele (L) bei den männlichen Sportlern unterrepräsentiert. Die beiden Sportlergruppen unterschieden sich nicht signifikant ( $p > 0,2$ ).

Beim (GGC)n-Repeat zeigte sich zwischen den beiden Sportlergruppen ein signifikanter Unterschied zwischen den Allelfrequenzen ( $p < 0,05$ ): die weiblichen Sportler zeigten mehr kurze (S) und weniger lange (L) Allele als die männlichen Sportler. Die männlichen Sportler unterschieden sich von den Kontrollen nicht signifikant ( $p > 0,2$ ).

#### 4.2.4.1.2 Zusammenhang zwischen den Polymorphismen im Androgen-Rezeptor-Gen und den Herzparametern

Die statistische Analyse ergab, dass die Länge der beiden Repeatpolymorphismen (CAG)n und (GGC)n im AR-Gen weder einen signifikanten Zusammenhang mit dem relativen Herzvolumen ( $p = 0,3$  bzw.  $p = 0,9$ ) noch mit der linksventrikulären Muskelmasse ( $p = 0,75$  bzw.  $p = 0,7$ ) der Probanden aufwies.

#### 4.2.4.2 Die Polymorphismen im Gen des B-Typ natriuretischen Peptids (BNP)

##### 4.2.4.2.1 Die Genotyp- und Allelverteilungen

Innerhalb der polymorphen Region im nichttranslatierten Bereich von **Exon1** des BNP-Gens mit der WT-Sequenz ... $(CAG)_7$  AAG  $(CAG)_4$ ... (rs35519114) konnten in dieser Studie vier unterschiedliche Allele identifiziert werden, deren Häufigkeiten innerhalb unseres Untersuchungskollektivs folgendermaßen verteilt waren: der Wildtyp lag bei 98% der Kontrollen und 96,5% der Sportler vor. Die unterschiedlichen Mutationsallele M1, M2 und M3 kamen im gesamten Untersuchungskollektiv nur heterozygot in Kombination mit dem Wildtyp vor: bei den Kontrollen lediglich der Genotyp WT/M1 bei 4% der Probanden und bei den Sportlern WT/M1 bei 4%, WT/M2 bei 2% und WT/M3 bei 1% (Tab.4.18).

**Tab.4.18:** Genotyp- und Allelfrequenzen (b=beobachtet; e=erwartet) des Polymorphismus im 1. Exon des BNP-Gens innerhalb des Untersuchungskollektivs. Prüfung auf eventuelle Abweichungen vom HWG (p-Werte).

BNP Exon1		Genotypen [%]				Allele [%]				p
		WT/WT	WT/M1	WT/M2	WT/M3	WT	M1	M2	M3	
Kontrollen (♂)	b	96	4	0	0	98	2	0	0	~1
	e	96	4	0	0	98	2	0	0	
Sportler gesamt	b	93	4	2	1	96,5	2	1	0,5	~1
	e	93	4	2	1	96,5	2	1	0,5	
♀ Sportler	b	88	6	3	3	94	3	1,5	1,5	~1
	e	88	6	3	3	94	3	1,5	1,5	
♂ Sportler	b	95	4	1	0	97,5	2	0,5	0	~1
	e	95	4	1	0	97,5	2	0,5	0	

Die Überprüfung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts mittels  $\chi^2$ -Test ergab, dass sich alle untersuchten Gruppen im HWG befanden. Darüber hinaus konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypfrequenzen der unterschiedlichen Gruppen festgestellt werden, weder zwischen den männlichen Sportlern und den Kontrollen ( $p>0,99$ ), noch zwischen den beiden Sportlergruppen ( $p>0,1$ ).

Innerhalb der polymorphen Region im nichttranslatierten Bereich von **Exon3** des BNP-Gens mit der Sequenz ...TTTTTTTAATGT... (rs35458601 bzw. rs3527557) konnten drei unterschiedliche Allele identifiziert werden, deren Häufigkeiten innerhalb unseres Untersuchungskollektivs folgendermaßen verteilt waren: der Wildtyp lag bei 61% der Kontrollen und bei 60% der Sportler vor. Sowohl Mutationsallel M1 als auch M2 kamen im Untersuchungskollektiv heterozygot in Kombination mit dem Wildtyp vor. Nur Allel M2 lag zusätzlich in homozygoter Form vor (Tab.4.19). Überraschenderweise

kam der Genotyp WT/M2 sowohl bei den Kontrollen (52%) als auch bei den Sportlern (42%) am häufigsten vor.

**Tab.4.19:** Genotyp- und Allelfrequenzen (b=beobachtet; e=erwartet) des Polymorphismus im 3.Exon des BNP-Gens innerhalb des Untersuchungskollektivs. Prüfung auf eventuelle Abweichungen vom HWG (p-Werte).

BNP Exon3		Genotypen [%]					Allele [%]			p
		WT/WT	WT/M1	WT/M2	M1/M2	M2/M2	WT	M1	M2	
Kontrollen (♂)	b	33	4	52	0	11	61	2	37	>0,1
	e	37	2	45	2	14	57	2	33	
Sportler gesamt	b	37	4	42	4	13	60	4	36	>0,9
	e	36	5	43	3	13	60	4	36	
♀ Sportler	b	23↓	3	63↑	3	8↓	56	3	41	<0,025
	e	31	3	46	3	17	48	3	28	
♂ Sportler	b	43	5	33	4	15	62	4,5	33,5	>0,3
	e	38	6	42	3	11	65	4,5	38	

Der  $\chi^2$ -Test ergab, dass sich außer der weiblichen Sportlergruppe alle Gruppen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befanden. Bei den Sportlerinnen kamen deutlich mehr WT/M2-Heterozygote (63% statt 46%  $\rightarrow$  +37%) und etwa die Hälfte weniger M2/M2-Homozygote (8% statt 17%  $\rightarrow$  -53%) vor als anhand der Allelfrequenzen erwartet ( $p < 0,025$ ). Darüber hinaus waren auch die homozygoten WT-Trägerinnen unterrepräsentiert (23% statt 31%  $\rightarrow$  -25%). Der Vergleich der männlichen Sportler mit den männlichen Kontrollen zeigte, dass bei den Sportlern die WT/WT- und M2/M2-Homozygoten, sowie die M1/M2-Heterozygoten über-, die WT/M2-Heterozygoten stattdessen unterrepräsentiert waren ( $p < 0,025$ ). Die beiden Sportlergruppen untereinander zeigten ebenfalls signifikante Abweichungen ( $p < 0,0001$ ): auch hier waren die WT/WT- und M2/M2-Homozygoten der männlichen Sportler im Vergleich zu den weiblichen Sportlern stark überrepräsentiert, die WT/M2-Heterozygoten stattdessen stark unterrepräsentiert.

#### 4.2.4.2.2 Zusammenhang zwischen den Polymorphismen im BNP-Gen und den Herzparametern

Aufgrund der geringen Allelfrequenz der Mutations-Allele des Polymorphismus im 1. Exon des BNP-Gens, und der daraus resultierenden verschwindend kleinen Fallzahlen, wurden nur die Zusammenhänge des Polymorphismus im 3. Exons mit den Herzparametern statistisch untersucht. Die statistische Analyse ergab, dass der Polymorphismus im 3. Exon des BNP-Gens weder eine signifikante Assoziation mit dem relativen Herzvolumen ( $p=0,2$ ) noch mit der linksventrikulären Muskelmasse ( $p=0,6$ ) der Probanden aufwies.

#### 4.2.4.3 Der G389R-Polymorphismus im $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor (ADRB1)

##### 4.2.4.3.1 Die Genotyp- und Allelverteilungen

Die Genotyp- und Allelfrequenzen des ADRB1 G389R-Polymorphismus innerhalb unseres Untersuchungskollektivs sind in Tab.4.20 dargestellt.

**Tab.4.20:** Genotyp- und Allelfrequenzen (b=beobachtet; e=erwartet) des ADRB1 G389R-Polymorphismus innerhalb des Untersuchungskollektivs. Prüfung auf eventuelle Abweichungen vom HWG (p-Werte).

ADRB1 G389R		Genotypen [%]			Allele[%]		p
		G/G	G/R	R/R	G	R	
<b>Kontrollen (♂)</b>	<b>b</b>	<b>4</b>	<b>41</b>	<b>55</b>	<b>24,5</b>	<b>75,5</b>	>0,5
	<b>e</b>	6	37	57	20	74	
<b>Sportler gesamt</b>	<b>b</b>	<b>6</b>	<b>37</b>	<b>57</b>	<b>24,5</b>	<b>75,5</b>	~1
	<b>e</b>	6	37	57	24,5	75,5	
♀ <b>Sportler</b>	<b>b</b>	<b>3</b>	<b>40</b>	<b>57</b>	<b>23</b>	<b>77</b>	>0,5
	<b>e</b>	5	36	59	17	75	
♂ <b>Sportler</b>	<b>b</b>	<b>8</b>	<b>36</b>	<b>56</b>	<b>26</b>	<b>74</b>	>0,8
	<b>e</b>	7	38	55	28	74	

Der  $\chi^2$ -Test ergab, dass sich sowohl die Kontroll-Gruppe, als auch die Sportler-Gruppe im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befanden. Auch der Vergleich der Genotypfrequenzen der Gruppen untereinander zeigte weder zwischen den männlichen Sportlern und den Kontrollen ( $p=0,1$ ), noch zwischen den beiden Sportlergruppen ( $p>0,1$ ) signifikante Unterschiede. Allerdings lagen bei den männlichen Sportlern prozentual mehr als doppelt so viele G/G-Homozygote vor wie bei den anderen beiden Gruppen.

##### 4.2.4.3.2 Zusammenhang zwischen dem ADRB1 G389R-Polymorphismus und den Herzparametern

Die statistische Analyse zeigte weder einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem ADRB1 G389R-Polymorphismus und dem relativen Herzvolumen ( $p=0,8$ ) noch mit der linksventrikulären Muskelmasse ( $p=0,6$ ).

#### 4.2.4.4 Der 5bpI/D-Polymorphismus im Troponin T-Gen (TNNT2)

##### 4.2.4.4.1 Die Genotyp- und Allelverteilungen

Die Genotyp- und Allelfrequenzen des TNNT2 5bpI/D-Polymorphismus sind in folgender Tabelle dargestellt:

**Tab.4.21:** Genotyp- und Allelfrequenzen (b=beobachtet; e=erwartet) des TNNT2 5bpI/D-Polymorphismus innerhalb des Untersuchungskollektivs. Prüfung auf eventuelle Abweichungen vom HWG (p-Werte).

TNNT2 5bpI/D		Genotypen [%]			Allele[%]		p
		I/I	I/D	D/D	I	D	
<b>Kontrollen (♂)</b>	<b>b</b>	<b>26</b>	<b>44</b>	<b>30</b>	<b>48</b>	<b>52</b>	>0,3
	e	23	50	27	51	52	
<b>Sportler gesamt</b>	<b>b</b>	<b>16</b>	<b>42</b>	<b>42</b>	<b>37</b>	<b>63</b>	>0,5
	e	14	46	40	40	64	
♀ <b>Sportler</b>	<b>b</b>	<b>17</b>	<b>34</b>	<b>49</b>	<b>34</b>	<b>66</b>	<0,1
	e	12	45	43	41	70	
♂ <b>Sportler</b>	<b>b</b>	<b>16</b>	<b>46</b>	<b>38</b>	<b>39</b>	<b>61</b>	>0,9
	e	15	48	37	40	61	

Die Überprüfung des TNNT2 5bpI/D-Polymorphismus mittels  $\chi^2$ -Test ergab, dass sich die Kontrollgruppe und die Sportlergruppen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befanden. Allerdings brachte der Vergleich der Gruppen untereinander folgende signifikanten Abweichungen: bei den männlichen Sportlern konnte im Vergleich mit den männlichen Kontrollen eine signifikante Verschiebung zugunsten des D-Allels beobachtet werden ( $p < 0,05$ ). Die I/I-Träger waren bei den Sportlern unter-, die I/D- und v.a. die D/D-Träger überrepräsentiert. Bei den weiblichen Sportlern war die Verschiebung zugunsten des D-Allels noch deutlicher. Hier kamen signifikant mehr D/D-Träger vor als bei den männlichen Sportlern, dafür waren die I/D-Träger unterrepräsentiert ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.4.4.2 Zusammenhang zwischen dem TNNT2 5bpI/D-Polymorphismus und den Herzparametern

Die statistische Analyse ergab weder einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem TNNT2 5bpI/D-Polymorphismus und dem relativen Herzvolumen ( $p = 0,4$ ) noch mit der linksventrikulären Muskelmasse ( $p = 0,7$ ).

### 4.3 Zusammenhang zwischen der Kombination von Polymorphismen und einer physiologischen Herzhypertrophie

Bei dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), dem IGF1-Signalweg und den assoziierten Signalwegen handelt es sich um ein großes Netzwerk von miteinander interagierenden Faktoren. Deshalb erschien es möglich, dass sich bestimmte Polymorphismen gegenseitig beeinflussen und in Kombination einen signifikanten Effekt auf die Herzparameter haben könnten, den sie isoliert betrachtet nicht haben, bzw. dass der signifikante Einfluss noch verstärkt werden könnte.

Aufgrund der offenbar geschlechtsspezifisch unterschiedlichen Wirkung der Polymorphismen wurden weibliche und männliche Ausdauersportler getrennt betrachtet. Limitierend bei den weiblichen Sportlern (n=35) waren allerdings die zu kleinen Fallzahlen, weswegen im Folgenden nur die männlichen Ausdauersportler betrachtet wurden.

Hierbei wurde ein vereinfachtes statistisches Modell benutzt, bei dem der Mittelwert der LVM der Träger einer bestimmten Polymorphismen-Kombination mit dem Mittelwert der LVM der Nicht-Träger dieser Polymorphismen-Kombination verglichen wurde. Dabei wurden die Daten wiederum nach den Faktoren Training und Alter adjustiert.

#### 4.3.1 Kombinationen von Polymorphismen innerhalb des RAAS

Die statistische Analyse verschiedener Polymorphismen-Kombinationen ergab, dass sich einige der untersuchten RAAS-Polymorphismen in ihrer Wirkung gegenseitig verstärkten.

In Tab.4.22 sind diejenigen Polymorphismen-Kombinationen des RAAS aufgelistet, die einen signifikanten Zusammenhang mit der linksventrikulären Muskelmasse zeigten.

**Tab.4.22:** Genotyp-Kombinationen von RAAS-Polymorphismen im Zusammenhang mit der LVM bei den männlichen Ausdauersportlern. Mittelwerte  $\pm$ SD/SE.

Genotyp-Kombination	LVM/KOF [g/m <sup>2</sup> ] (nicht-adjustiert)		Effekt auf die LVM/KOF [g/m <sup>2</sup> ] (adjustiert nach Training und Alter)	p
	Träger	Nicht-Träger		
AGT 235 T/T      AT <sub>2</sub> R A	119 $\pm$ 12/3	99 $\pm$ 17/2	+12,7 $\pm$ 18/5	0,03
AGT 235 M/M      CYP11B2 C/C	89 $\pm$ 21/7	102,5 $\pm$ 16/2	-19,7 $\pm$ 16/6	0,001



Die beiden Polymorphismen AGT M235T und AT<sub>2</sub>R 1675G/A waren, wie zuvor erwähnt, für sich genommen nicht signifikant mit der LVM assoziiert (beide p=0,8). In Kombination zeigte sich jedoch ein signifikanter Zusammenhang mit der LVM der männlichen Ausdauersportler: diejenigen, die den T/T-Genotyp im AGT-Gen kombiniert mit dem A-Allel des X-chromosomalen AT<sub>2</sub>R-Gens trugen (10%) besaßen eine um durchschnittlich 12,7 ( $\pm 18/5$ ) g/m<sup>2</sup> größere LVM als Nicht-Träger dieser Kombination (p=0,03).

Der -344C/T-Polymorphismus der Aldosteron-Synthase hatte bereits für sich einen signifikanten Zusammenhang mit der LVM bei den männlichen Sportlern gezeigt: Probanden mit dem C/C-Genotyp besaßen durchschnittlich eine um 10,7 ( $\pm 19/4$ ) g/m<sup>2</sup> kleinere LVM als diejenigen mit mindestens einem T-Allel (p=0,02). Dieser Effekt wurde durch die Kombination mit dem AGT 235 M/M-Genotyp noch verstärkt: bei Trägern dieser Kombination (8%) konnte man im Schnitt eine um 19,7 ( $\pm 16/6$ ) g/m<sup>2</sup> kleinere LVM finden als bei Nicht-Trägern (p=0,001).

#### 4.3.2 Kombinationen von Polymorphismen innerhalb des IGF1-Signalwegs

Innerhalb des IGF1-Signalwegs zeigten sowohl der IGF1(CA)<sub>n</sub>-Repeatpolymorphismus und der IGF1-Rezeptor-Polymorphismus 3174G/A, als auch der bisher unbeachtete IVS1+88\_90delA-Polymorphismus im GDF8-Gen einen signifikanten Zusammenhang mit der linksventrikulären Muskelmasse der männlichen Ausdauersportler.

Einige der Kombinationen innerhalb des IGF1-Signalwegs stellten sich zwar als signifikant heraus, die kombinierten Effekte waren jedoch nicht stärker als die der Einzelpolymorphismen. Dies war v.a. der Fall bei Kombinationen zwischen dem IGF1-Repeatpolymorphismus und dem IGF1-Rezeptor-Polymorphismus.

Lagen beide Polymorphismen jedoch jeweils mit dem Genotyp A/- des GDF8-Polymorphismus kombiniert vor, zeigte sich eine Verstärkung der Effekte der Einzelpolymorphismen (Tab.4.23).

**Tab.4.23:** Zusammenhang der Genotyp-Kombinationen der Polymorphismen im IGF1-Signalweg mit der LVM bei den männlichen Ausdauersportlern. Mittelwerte  $\pm$ SD/SE.

Genotyp-Kombination		LVM/KOF [g/m <sup>2</sup> ] (nicht-adjustiert)		Effekt auf die LVM/KOF [g/m <sup>2</sup> ] (adjustiert nach Training und Alter)	p	
Pol	+	Pol2	Träger			Nicht-Träger
IGF1 19/19		GDF8 A/-	84 $\pm$ 16/5	103 $\pm$ 17/2	-16,6 $\pm$ 19/5	0,003
IGF1R G/G		"	84 $\pm$ 16/5	103 $\pm$ 17/2	-15,2 $\pm$ 19/6	0,01

Wie zuvor erwähnt hatten Träger des IGF1 19/19-Genotyps eine durchschnittlich um 16,4 ( $\pm 16/5$ ) g/m<sup>2</sup> kleinere LVM gezeigt als Nicht-Träger des Wildtyps ( $\neq 19/\neq 19$ ;  $p=0,003$ ), Probanden mit dem GDF8-Genotyp A/- im Schnitt eine um 10,3 ( $\pm 16/4$ ) g/m<sup>2</sup> kleinere LVM als Träger des A/A-Genotyps ( $p=0,015$ ). Die 12% der männlichen Ausdauersportler, die beide Genotypen in Kombination trugen, zeigten eine durchschnittlich um 16,6 ( $\pm 19/5$ ) g/m<sup>2</sup> kleinere LVM als Nicht-Träger der Kombination ( $p=0,003$ ).

Die Kombination des GDF8-Genotyps A/- mit dem IGF1R G/G-Genotyp, der für sich alleine genommen eine im Schnitt um 12,8 ( $\pm 19/5$ ) g/m<sup>2</sup> kleinere LVM als der A/A-Genotyp gezeigt hatte ( $p=0,01$ ), war bei den männlichen Ausdauersportlern (10%) mit durchschnittlich um 15,2 ( $\pm 19/6$ ) g/m<sup>2</sup> kleineren Werten assoziiert im Vergleich zu Nicht-Trägern dieser Kombination ( $p=0,01$ ).

#### 4.3.3 Kombinationen von Polymorphismen unabhängig vom Signalweg

Die statistische Analyse von Polymorphismen-Kombinationen der verschiedenen Signalwege untereinander ergab folgende Zusammenhänge:

**Tab.4.24:** Genotyp-Kombinationen der Polymorphismen der verschiedenen Signalwege im Zusammenhang mit der LVM bei den männlichen Ausdauersportlern. Mittelwerte  $\pm$ SD/SE.

Genotyp-Kombination		LVM/KOF [g/m <sup>2</sup> ] (nicht-adjustiert)		Effekt auf die LVM/KOF [g/m <sup>2</sup> ] (adjustiert nach Training und Alter)	p
Pol1	+ Pol2	Träger	Nicht-Träger		
IGF1R A/A	AGT 174 T/T	115 $\pm$ 13/3	99 $\pm$ 17/2	+13,8 $\pm$ 19/5	0,004
"	ACE D/D	116 $\pm$ 8/2	100 $\pm$ 18/2	+15,6 $\pm$ 18/6	0,01
"	TNNT2 D/D	117 $\pm$ 13/4	100 $\pm$ 17/2	+16,5 $\pm$ 23/7	0,03
CYP11B2 C/C	GDF8 A/-	85 $\pm$ 14/4	103 $\pm$ 17/2	-15,8 $\pm$ 19/5	0,005
"	IGF1 19/19	83 $\pm$ 15/5	103 $\pm$ 17/2	-20,8 $\pm$ 19/7	0,003

Wie Tab.4.24 zeigt wurden die Effekte des IGF1R 3174G/A-Polymorphismus auch durch Kombination mit verschiedenen Polymorphismen anderer Signalwege verstärkt: der IGF1R A/A-Genotyp war bei männlichen Ausdauersportlern für sich alleine bereits mit einer durchschnittlich um 12,8 ( $\pm 19/5$ ) g/m<sup>2</sup> größeren LVM assoziiert als der G/G-Genotyp ( $p=0,01$ ). Träger des IGF1R A/A-Genotyps, kombiniert mit dem AGT 174 T/T-Genotyp (17%), der für sich genommen keine signifikante Assoziation mit der LVM gezeigt hatte ( $p=0,7$ ), besaßen eine im Schnitt um 13,8 ( $\pm 19/5$ ) g/m<sup>2</sup> größere LVM ( $p=0,004$ ) als Nicht-Träger der Kombination. Probanden, die sowohl den IGF1R A/A-

---

Genotyp, als auch den ACE D/D-Genotyp trugen (10%), der isoliert betrachtet keinen signifikanten Zusammenhang mit der LVM gezeigt hatte ( $p=0,4$ ), besaßen eine durchschnittlich um  $15,6 (\pm 18/6)$  g/m<sup>2</sup> größere LVM als Nicht-Träger der Kombination ( $p=0,01$ ). Lag der IGF1R A/A-Genotyp mit dem TNNT2 D/D-Genotyp (isoliert betrachtet:  $p=0,7$ ) kombiniert vor (8%), dann konnte eine durchschnittlich um  $16,5 (\pm 23/7)$  g/m<sup>2</sup> größere LVM beobachtet werden als bei Nicht-Trägern der Genotyp-Kombination ( $p=0,03$ ).

Auch der Zusammenhang des CYP11B2 -344C/T-Polymorphismus mit der LVM wurde durch Kombination mit anderen Genotypen noch deutlicher: für sich alleine hatte der CYP11B2 C/C-Genotyp bei männlichen Ausdauersportlern eine im Schnitt um  $10,7 (\pm 19/4)$  g/m<sup>2</sup> kleinere LVM gezeigt als der C/T- und der T/T-Genotyp ( $p=0,02$ ), der GDF8-Genotyp A/- eine um  $10,3 (\pm 16/4)$  g/m<sup>2</sup> kleinere als der A/A-Genotyp ( $p=0,015$ ). Probanden, die beide Genotypen in Kombination trugen (12%) waren dagegen mit durchschnittlich um  $15,8 (\pm 19/5)$  g/m<sup>2</sup> kleineren Werten der LVM assoziiert als Nicht-Träger ( $p=0,005$ ). Träger der Kombination (8%) CYP11B2 C/C mit dem homozygoten IGF1-Wildtyp (19/19), der für sich alleine mit einer im Schnitt um  $16,4 (\pm 16/5)$  g/m<sup>2</sup> kleineren LVM assoziiert gewesen war als die "homozygoten"  $\neq 19/\neq 19$ -Genotypen ( $p=0,003$ ), zeigten durchschnittlich eine um  $20,8 (\pm 19/7)$  g/m<sup>2</sup> kleinere LVM im Vergleich zu Nicht-Trägern der Kombination ( $p=0,003$ ).

## 5. Diskussion

Langjähriges, intensives sportliches Training mit hohem Ausdaueranteil kann sowohl zu einem vergrößerten Herzvolumen als auch zu einer Hypertrophie des Herzmuskels (exzentrische Hypertrophie) als Anpassungsreaktion auf die erhöhte Volumenlast führen. Im Gegensatz zur Herzvergrößerung während der fötalen Entwicklung, die durch Zellvermehrung (Hyperplasie) entsteht, wird die postnatale Herzvergrößerung hauptsächlich durch eine Vergrößerung (Hypertrophie) der Kardiomyozyten verursacht.

Ein Sportherz, als trainingsinduzierter kardialer Phänotyp, kann sich individuell sehr unterschiedlich ausprägen. Dies wurde auch innerhalb unseres Untersuchungskollektivs von Spitzenausdauersportlern (Kaderathleten) beobachtet: trotz eines ausreichend großen Umfangs an Ausdauertraining ( $14 \pm 5$ h/Woche) besaßen bezüglich des Herzvolumens nur 75% der männlichen und 63% der weiblichen Athleten ein Sportherz (Abb.4.18). Außerdem konnten beträchtliche individuelle Schwankungen bei der linksventrikulären Muskelmasse der Sportler beobachtet werden ( $65$ - $136$ g/m<sup>2</sup> bei den männlichen Sportlern;  $55$ - $113$ g/m<sup>2</sup> bei den weiblichen Sportlern). Die Arbeitsgruppe um Karjalainen et al. (1997) hatte in diesem Zusammenhang bereits gezeigt, dass durch einen unterschiedlichen Trainingsumfang lediglich etwa 11% der Variabilität der linksventrikulären Muskelmasse bei männlichen Sportlern erklärt werden können. Es wird vermutet, dass mehr als 60% der Schwankungen eine unterschiedliche genetische Veranlagung zugrunde liegen (Verhaaren et al., 1991).

In den letzten Jahren haben sich zahlreiche Studien mit der Suche nach Faktoren beschäftigt, die eine hypertrophische Antwort bei Kardiomyozyten auslösen. Dabei hat sich herausgestellt, dass neben der mechanischen Belastung verschiedene Hormone, wie z.B. AngiotensinII (AngII) oder der „Insulin-like growth factor 1“ (IGF1), unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden induzieren können, die dann zur verstärkten Expression Hypertrophie-assoziiierter Gene führen. Essenziell ist hierbei die Erhöhung der Konzentration an sarcomeren Proteinen: die Neubildung von Sarcomeren in den Myozyten in paralleler Anordnung, die zur Zunahme der ventrikulären Wanddicke führt, bzw. hintereinander angeordnet, was eine Verlängerung der Myozyten und Vergrößerung des Ventrikelvolumens verursacht, ermöglicht die Anpassungsreaktion des Herzmuskels (Catalucci et al., 2008). Das Ergebnis kann je nach Stimulus (Druck- bzw. Volumenbelastung) entweder eine physiologische, wie im Falle des Sportherzens, oder auch eine pathologische (z.B. durch Bluthochdruck, Klappeninsuffizienz oder Aortenstenose) Myokardhypertrophie sein.

Seit einiger Zeit wird allgemein angenommen, dass manche Signalwege bevorzugt bei einer physiologischen Hypertrophie aktiviert werden, andere bevorzugt bei einer pathologischen. So wird für Hormone, die über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wirken, wie z.B. AngII eher ein pathologischer Einfluss angenommen, für Wachstumsfaktoren, die an Enzym-gekoppelte Rezeptoren binden, wie z.B. IGF1 eher ein physiologischer, wobei fließende Übergänge bestehen können.

Polymorphismen in Genen innerhalb dieser Signalwege, die sich auf die Struktur oder die Regulation dieser Gene und ihrer Genprodukte auswirken, könnten einen modulierenden Einfluss auf die hypertrophische Antwort der Kardiomyozyten ausüben. Eine Vielzahl von Studien hat sich wegen der klinischen Bedeutung bereits mit dem Zusammenhang zwischen genetischen Polymorphismen und einer pathologischen Herzhypertrophie beschäftigt. Weniger ist jedoch über die Zusammenhänge mit einer physiologischen Herzhypertrophie wie dem Sporthertz bekannt, das Gegenstand der vorliegenden Studie ist.

Da eine Vielzahl von Genen an der Entstehung einer Herzhypertrophie beteiligt sind, sollte in dieser Studie eine möglichst große Bandbreite an bekanntermaßen interagierenden Genen bzw. Genprodukten auf Polymorphismen und deren Zusammenhang mit einer physiologischen Herzhypertrophie untersucht werden. Das Untersuchungskollektiv von 35 weiblichen und 75 männlichen Ausdauersportlern, sowie 27 untrainierten männlichen Kontrollen, wurde auf 16 Polymorphismen in 14 unterschiedlichen Genen untersucht und deren Assoziation mit der echokardiographisch bestimmten Herzgröße, d.h. dem relativen Herzvolumen sowie der linksventrikulären Muskelmasse überprüft.

### **5.1. Allgemeine Zusammenhänge**

Wie zu erwarten, konnte in dieser Studie der in der Literatur beschriebene fördernde Einfluss des Ausdauertrainings auf eine Sporthertzentwicklung bestätigt werden (Karjalainen et al., 1997, 1999; Scharhag et al., 2002, 2003): die männlichen Ausdauersportler zeigten durchschnittlich ein um 26% größeres relatives Herzvolumen sowie eine um 13% größere linksventrikuläre Muskelmasse (LVM) als die untrainierten männlichen Kontrollpersonen. Die Werte der weiblichen Sportler waren im Durchschnitt um 10% bzw. 14% kleiner als die der männlichen Sportler. Von Karjalainen et al. (1999) wurde bereits beschrieben, dass durch das Geschlecht ein Großteil der Variabilität der Herzmasse erklärt werden kann. Diese grundsätzlichen

Geschlechtsunterschiede könnten u.a. auf die kleinere Körpergröße und die geringere Körpermasse der Frauen zurückführbar sein (Pelliccia et al., 2002a). Deshalb liegen die kardialen Werte für Frauen 10-20% unterhalb derjenigen der Männer. Interessanterweise zeigen sich diese geschlechtsabhängigen und belastungsunabhängigen Unterschiede in der Herzgröße erst nach der Pubertät: Jungen und Mädchen besitzen bei der Geburt, bzw. bei Beendigung der Kardiomyozytenproliferation, sowohl dieselbe Anzahl an Kardiomyozyten, als auch eine vergleichbare Myozytengröße. Deshalb wird angenommen, dass die männlichen Myozyten einen stärkeren Grad an Hypertrophie während des normalen postnatalen Wachstums durchlaufen als die weiblichen (Grandi et al., 1992; Leinwand, 2003). Dies lässt vermuten, dass die Geschlechtshormone einen essenziellen Einfluss auf das Herzwachstum haben könnten. Im Einklang damit wurde beobachtet, dass eine Östrogen-Behandlung einer Kardiomyozyten-Hypertrophie entgegenwirkt, d.h. sie abschwächt (Babiker et al., 2002).

Unabhängig davon konnte in unserer Studie ein signifikanter Einfluss des Alters beobachtet werden: durchschnittlich besaßen ältere Probanden sowohl ein etwas größeres Herzvolumen als auch eine etwas größere LVM. Ähnliche Befunde hatte bereits die Arbeitsgruppe um Grandi et al. (1992) gezeigt.

Aufgrund dieser allgemeinen Zusammenhänge wurden die multivariaten statistischen ANOVA-Modelle zur Ermittlung der Zusammenhänge zwischen den Polymorphismen und dem kardialen Phänotyp um die Faktoren Geschlecht, Alter und Training korrigiert (s. Abb.5.1).

## **5.2 Zusammenhänge zwischen den einzelnen genetischen Polymorphismen und dem Sportherz**

### **5.2.1 Die RAAS-Polymorphismen**

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) ist eine Kaskade von Proteinen und Enzymen, die zur Bildung der beiden Haupt-Effektor-Moleküle AngiotensinII (AngII) und Aldosteron führt. Diese beiden Hormone können sowohl systemisch (endokrin) auf das kardiovaskuläre System einwirken, als auch lokal (parakrin bzw. autokrin) direkt auf das Myokard. Bei den RAAS-Genen sind zahlreiche biallelische Polymorphismen bekannt, denen eine mögliche (patho-)physiologische Bedeutung zukommt. Zu diesen gehören die in unserer Studie untersuchten acht RAAS-

---

Polymorphismen AGT M235T, AGT T174M, ACE I/D, CMA -1903A/G, B2BKR 9bpI/D, AT<sub>1</sub>R 1166A/C, AT<sub>2</sub>R 1675G/A und CYP11B2 -344C/T.

Zur Überprüfung, ob bestimmte Genotypen einem Selektionsdruck unterliegen, d.h. einen Vorteil bzw. Nachteil für den Träger bedeuten, wurden die Genotypfrequenzen unserer Untersuchungsgruppen sowohl untereinander verglichen, als auch auf Vorliegen eines Hardy-Weinberg-Gleichgewichts (HWG) untersucht (4.2.2.1). Darüber hinaus soll an dieser Stelle der Vergleich der Genotypfrequenzen unserer Untersuchungsgruppen mit solchen der europäischen Normalbevölkerung diskutiert werden (s. Tab.5.1):

Die Genotypfrequenzen des **M235T**-Polymorphismus im **Angiotensinogen-Gen (AGT)** waren zwar bei all unseren Gruppen im HWG, jedoch unterschieden sich die Häufigkeiten unserer männlichen Sportler signifikant von denen unserer männlichen Kontrollen: es war eine Verschiebung zugunsten des T/T-Genotyps zu beobachten. Allerdings zeigte der Vergleich mit einer großen (n=9184) europäischen Vergleichspopulation aus Männern und Frauen (Sethi et al., 2003) keine signifikanten Abweichungen zu einer unserer Gruppen, auch wenn bei unseren beiden Sportlergruppen der T/T-Genotyp tendenziell häufiger auftauchte. Dies könnte für einen schwachen Selektionsvorteil für Träger des T/T-Genotyps innerhalb unserer Sportlergruppen sprechen. Dies ist insofern von Interesse, als dass der T/T-Genotyp allgemein als „pro-LVH“-Modifizierer angesehen wird (Ortlepp et al., 2002). Die Ergebnisse unserer Studie bezüglich des Zusammenhangs dieses Polymorphismus und der LVM werden später diskutiert.

Die Genotypfrequenzen des **AGT T174M**-Polymorphismus unserer Untersuchungsgruppen zeigten hingegen weder signifikante Abweichungen beim Vergleich untereinander noch zu denen der europäischen Vergleichspopulation (Sethi et al., 2003). Darüber hinaus waren sie im HWG. Dies spricht dafür, dass es keinen Selektionsdruck für oder gegen ein bestimmtes Allel des Polymorphismus gibt.

Bei dem Polymorphismus im Gen des bereits intensiv untersuchten Angiotensinkonversionsenzym (**ACE I/D**) wurde zwar ein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypfrequenzen unserer beiden Sportlergruppen festgestellt, allerdings unterschied sich keine unserer Gruppen signifikant von solchen der europäischen Normalbevölkerung (Ortlepp et al., 2002). Allerdings konnte tendenziell bei unseren weiblichen Sportlern eine Verschiebung zugunsten des I-Allels beobachtet werden. Die Überprüfung des HWG zeigte lediglich bei unseren Kontrollen einen signifikanten Unterschied zwischen beobachteter und erwarteter Häufigkeit der Genotypen. Da es

sich bei unseren Kontrollen und den weiblichen Sportlern um sehr kleine Populationen handelt muss man allerdings von einem Fehler der kleinen Zahl ausgehen.

Ähnliches gilt für den Polymorphismus im Gen des **Bradykinin-Rezeptors**. Hier lag zwar bei allen Gruppen ein HWG vor, allerdings zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Genotypfrequenzen unserer männlichen Kontrollen und denen unserer männlichen Sportler, sowie mit solchen der männlichen kaukasischen Normalbevölkerung (Dhamrait et al., 2003). Die Genotypfrequenzen der weiblichen Sportler unterschieden sich sogar hochsignifikant von denjenigen unserer männlichen Sportler, sowie von der männlichen Vergleichspopulation: in beiden Fällen kam der I/I-Genotyp nur etwa 1/3 so häufig vor wie in diesen beiden Vergleichspopulation, der I/D-Genotyp war dafür deutlich überrepräsentiert. Die D/D-Homozygoten waren nahezu unverändert. Die Genotypfrequenzen unserer männlichen Sportler entsprachen ungefähr denen der Vergleichspopulation (s. Tab.5.1). Auch in diesem Fall müssen wir aufgrund der kleinen Fallzahl der Kontrollen und der weiblichen Sportler von einem Fehler der kleinen Zahl ausgehen. Es gibt in der Literatur jedoch Hinweise darauf, dass der Polymorphismus im Bradykinin-Rezeptor die Ausdauerleistungsfähigkeit beeinflusst: so wird vermutet, dass das D-Allel, das mit einer erhöhten Expression des Rezeptors assoziiert ist, u.a. über vermehrte Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) und eine Erhöhung des zytoplasmatischen Calciums eine höhere metabolische Effizienz des Skelettmuskels bewirkt. Dies könnte zu einer verbesserten Ausdauerleistungsfähigkeit führen (Williams et al., 2004). Somit könnte die beobachtete Verschiebung zugunsten der I/D-Heterozygoten (Heterosiseffekt) bzw. des D-Allels theoretisch auf einen Selektionsvorteil bei den weiblichen Sportlern hindeuten. Diese Hypothese sollte jedoch mit Vorsicht betrachtet werden. Da die Verschiebung bei den von uns untersuchten männlichen Sportlern nicht beobachtet wurde, könnte der Effekt sowohl hormonell bedingt (s. unten), als auch ein Fehler der kleinen Zahl sein.

Bei dem Polymorphismus im Gen der **Chymase A** waren unsere Untersuchungspopulationen alle im HWG, jedoch wurde auch hier ein signifikantes Abweichen der Genotypfrequenzen unserer Kontrollgruppe sowohl von denen unserer männlichen Sportler, als auch von solchen der europäischen Normalbevölkerung (Blast, HapMap European) festgestellt. Bei unseren Sportlergruppen wurde dies nicht beobachtet.

Ähnliches konnten wir auch bei den Polymorphismen im AT<sub>1</sub>- und im AT<sub>2</sub>-Rezeptor feststellen: sowohl die Genotypfrequenzen des autosomalen **AT<sub>1</sub>R**, als auch die



---

Allelfrequenzen des X-chromosomalen **AT<sub>2</sub>R** unserer Kontrollpopulation zeigten einen signifikanten Unterschied zu solchen der europäischen Normalbevölkerung (Ortlepp et al., 2002; Schmieder et al., 2001). Dies war bei den weiblichen Sportlern nicht zu beobachten. Dafür waren die weiblichen Sportler bezüglich des AT<sub>2</sub>R-Polymorphismus nicht im HWG: es waren deutlich weniger G/A-Heterozygote zu finden als erwartet, wobei beide homozygoten Formen häufiger vorkamen.

Interessanterweise wurde beim AT<sub>1</sub>R-Polymorphismus ein signifikantes Abweichen der Genotypfrequenzen unserer männlichen Sportler von der Normalbevölkerung (Ortlepp et al., 2002) beobachtet: die A/C-Heterozygoten waren deutlich überrepräsentiert, während die A/A-Homozygoten unterrepräsentiert waren. Die C/C-Homozygoten waren unverändert. Darüber hinaus unterschieden sie sich signifikant von denen unserer weiblichen Sportler. Dies könnte auf einen Heterosiseffekt bei den männlichen Sportlern hindeuten, d.h. die Leistungsfähigkeit würde nur bei Vorliegen beider Allele zunehmen, wobei man hier hormonelle Einflüsse vermuten könnte.

Bei dem Polymorphismus im Gen der **Aldosteron-Synthase** entsprachen die Genotypfrequenzen unserer Kontrollen weder denen unserer männlichen Sportler, noch denen der europäischen Vergleichspopulation (Barbato et al., 2004), noch lagen sie im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Unsere beiden Sportlergruppen zeigten keine Auffälligkeiten.

Bezüglich der RAAS-Polymorphismen deuten unsere Ergebnisse auf zu kleine Fallzahlen unserer Kontroll- und Sportlerinnengruppe hin. Die Ergebnisse müssen bei diesen beiden Gruppen deshalb mit Vorbehalt betrachtet werden.

**Tab.5.1:** Vergleich der Genotypfrequenzen der RAAS-Polymorphismen unserer Untersuchungspopulationen mit solchen der europäischen Normalbevölkerung

	Abweichung zur europäischen Normalbevölkerung (eigene Befunde/Literatur)		p
	Genotypfrequenzen [%]	Allelfrequenzen [%]	
<b>AGT M235T</b> <sup>1</sup>			
Kontrollen (♂)	M/M: 30/35; M/T: 55/48; T/T: 15/17	M: 57/59; T: 43/41	>0,5
♀ Sportler	M/M: 31/35; M/T: 43/48; T/T: 26/17	M: 53/59; T: 47/41	<0,1
♂ Sportler	M/M: 33/35; M/T: 42/48; T/T: 25/17	M: 54/59; T: 46/41	<0,1
<b>AGT T174M</b> <sup>2</sup>			
Kontrollen (♂)	T/T: 70/77; T/M: 30/22; M/M: 0/1	T: 85/88; M: 15/12	<0,1
♀ Sportler	T/T: 77/77; T/M: 20/22; M/M: 3/1	T: 87/88; M: 13/12	>0,1
♂ Sportler	T/T: 71/77; T/M: 28/22; M/M: 1/1	T: 85/88; M: 15/12	>0,3
<b>ACE I/D</b> <sup>3</sup>			
Kontrollen (♂)	I/I: 30/28; I/D: 37/43; D/D: 33/29	I: 48,5/50; D: 51,5/50	>0,2
♀ Sportler	I/I: 37/28; I/D: 43/43; D/D: 20/29	I: 58,5/50; D: 41,5/50	<0,1
♂ Sportler	I/I: 26/28; I/D: 48/43; D/D: 26/29	I: 50/50; D: 50/50	>0,5
<b>B2BKR 9bpI/D</b> <sup>4</sup>			
Kontrollen (♂)	I/I: 37/26; I/D: 44/50; D/D: 19/24	I: 59/51; D: 41/49	<0,05
♀ Sportler	I/I: 8/26; I/D: 66/50; D/D: 26/24	I: 41/51; D: 59/49	<0,001
♂ Sportler	I/I: 25/26; I/D: 47/50; D/D: 28/24	I: 48,5/51; D: 51,5/49	>0,5
<b>CMA -1903G/A</b> <sup>5</sup>			
Kontrollen (♂)	A/A: 37/34; G/A: 37/49; G/G: 26/17	A: 55,5/59; G: 44,5/41	<0,025
♀ Sportler	A/A: 29/34; G/A: 54/49; G/G: 17/17	A: 56/59; G: 44/41	>0,5
♂ Sportler	A/A: 31/34; G/A: 49/49; G/G: 20/17	A: 55,5/59; G: 44,5/41	>0,5
<b>AT1R 1166A/C</b> <sup>6</sup>			
Kontrollen (♂)	A/A: 44/57; A/C: 41/34; C/C: 15/9	A: 64,5/74; C: 35,5/26	<0,025
♀ Sportler	A/A: 52/57; A/C: 34/34; C/C: 14/9	A: 69/74; C: 31/26	>0,1
♂ Sportler	A/A: 42/57; A/C: 49/34; C/C: 9/9	A: 66,5/74; C: 33,5/26	<0,01
<b>AT2R 1675G/A</b> <sup>7</sup>			
Kontrollen (♂)	/	A: 44/57; G: 56/43	<0,01
♀ Sportler	/	A: 47,5/57; G: 52,5/43	<0,1
♂ Sportler	/	A: 51/57; G: 49/43	>0,2
<b>CYP11B2 -344C/T</b> <sup>8</sup>			
Kontrollen (♂)	C/C: 26/22; C/T: 33/47; T/T: 41/31	C: 42,5/45; T: 57,5/55	<0,025
♀ Sportler	C/C: 20/22; C/T: 49/47; T/T: 31/31	C: 44,5/45; T: 55,5/55	>0,8
♂ Sportler	C/C: 25/22; C/T: 46/47; T/T: 29/31	C: 48/45; T: 52/55	>0,7

<sup>1</sup> und <sup>2</sup> Vergleich mit Sethi et al., 2003 (♀+♂); <sup>3</sup> und <sup>6</sup> Vergleich mit Ortlepp et al., 2002 (♀+♂); <sup>4</sup> Vergleich mit Dhamrait et al., 2003 (♂); <sup>5</sup> Vergleich mit Blast (HapMap European (♀+♂)); <sup>7</sup> Vergleich mit Schmieder et al., 2001 (♂); <sup>8</sup> Vergleich mit Barbato et al., 2004 (♀+♂).

Drei dieser acht RAAS-Polymorphismen sind bereits von anderen Autoren an ähnlich großen Gruppen von Ausdauerathleten untersucht worden (s. Tab.5.2): AGT M235T, ACE I/D und AT<sub>1</sub>R 1166A/C (Diet et al., 2001; Karjalainen et al., 1999). Bezüglich des AGT-Polymorphismus zeigte der Vergleich der Genotypfrequenzen unserer gesamten Sportlergruppe weder mit der Sportlergruppe von Diet et al. (p>0,2), noch mit der von Karjalainen et al. (p>0,05) signifikante Abweichungen. Dennoch waren bei unseren Sportlern tendenziell mehr T/T-Träger und dafür weniger M/T-Träger zu finden, als bei

den beiden anderen Sportlergruppen. In Hinblick auf den ACE-Polymorphismus unterschied sich unsere Population jedoch signifikant von der von Diet et al. ( $p < 0,001$ ), die aus 83 männlichen Sportlern bestand: unsere Population zeigte fast doppelt so viele I/I-Homozygote wie die Vergleichspopulation; dafür waren unsere I/D-Heterozygoten und D/D-Homozygoten etwas unterrepräsentiert. Im Vergleich mit der gemischten Sportlergruppe von Karjalainen et al., die sich aus 50 männlichen und 30 weiblichen Athleten zusammensetzte, fanden wir bei dem ACE-Polymorphismus jedoch keinen signifikanten Unterschied ( $p > 0,1$ ). Dafür zeigten sich signifikante Abweichungen bei der Überprüfung des AT<sub>1</sub>R-Polymorphismus ( $p < 0,025$ ): in unserer Population waren fast doppelt so viele C/C-Homozygote zu finden wie bei Karjalainen et al.. Unsere A/C-Heterozygoten waren überrepräsentiert, unsere A/A-Homozygoten unterrepräsentiert. Der Vergleich mit der Population von Diet et al. ergab bei diesem Polymorphismus hingegen keinen signifikanten Unterschied ( $p > 0,1$ ).

**Tab. 5.2:** Vergleich der Genotypfrequenzen der Polymorphismen AGT M235T, ACE I/D und AT<sub>1</sub>R 1166A/C unserer Ausdauerathleten mit denen anderer Ausdauerathleten (signifikant unterschiedliche Gruppen sind fett dargestellt).

Polymorphismen	unsere Population (35♀+75♂ Sportler)	Diet et al., 2001 (83♂ Sportler)	Karjalainen et al., 1999 (30♀+50♂ Sportler)
	Genotypfrequenzen [%]		
<b>AGT M235T</b>			
M/M	33	31	30
M/T	42	49	52
T/T	25	19	18
<b>ACE I/D</b>			
I/I	<b>30</b>	<b>16</b>	22,5
I/D	<b>46</b>	<b>54</b>	47,5
D/D	<b>24</b>	<b>30</b>	30
<b>AT<sub>1</sub>R 1166A/C</b>			
A/A	<b>45</b>	53	<b>58,5</b>
A/C	<b>44</b>	35	<b>35</b>
C/C	<b>11</b>	12	<b>6,5</b>

Obwohl das RAAS bei körperlichem Training aktiviert wird und sich zahlreiche Studien bereits mit der Untersuchung von RAAS-Polymorphismen und deren Einfluss hauptsächlich auf die pathologische, aber auch auf die physiologische Herzhypertrophie beschäftigt haben, sind die Ergebnisse über deren Zusammenhang mit einer Herzvergrößerung kontrovers. Dies ist wohl wesentlich darauf zurückzuführen, dass die Polymorphismen meist nur einzeln und an unterschiedlichen Populationen untersucht worden sind. Da es sich bei dem RAAS aber um ein Netzwerk von Faktoren handelt, erschien es uns sinnvoll, die acht wichtigsten RAAS-Polymorphismen an ein und

demselben Untersuchungskollektiv in Hinblick auf eine physiologische Herzhypertrophie zu analysieren. Bei unserer Analyse ließ sich allerdings lediglich für den Polymorphismus im Gen der Aldosteron-Synthase (CYP11B2) für sich allein bewertet ein signifikanter Einfluss auf die linksventrikuläre Muskelmasse bei Ausdauersportlern nachweisen.

Der fehlende Zusammenhang zwischen nahezu allen untersuchten RAAS-Polymorphismen und einer physiologischen Herzhypertrophie könnte ein Hinweis darauf sein, dass dieser Signalweg eher bei der Entwicklung einer pathologischen Herzhypertrophie eine Rolle spielt. Auch die Arbeitsgruppe um Linhart et al. (2000) konnte bei jungen normotensiven Männern aus der Normalbevölkerung keinen signifikanten Einfluss des ACE I/D- und des AGT M235T-Polymorphismus auf die LV-Struktur und -Funktion finden. Hinweise auf Zusammenhänge der RAAS-Polymorphismen mit einer pathologischen Myokardhypertrophie wurden jedoch bereits mehrfach beschrieben: AGT T174M (Wong et al., 1996), AGT M235T (Ishanov et al., 1997), ACE I/D (Marian et al., 1993; Pfeufer et al., 1996; Yoneya et al., 1995), CMA-1903A/G (Ortlepp et al., 2002), B2BKR 9bpI/D (Shneider et al., 2004), AT<sub>1</sub>R 1166A/C (Amant et al., 1997; Ortlepp et al., 2002; Osterop et al., 1998) und AT<sub>2</sub>R 1675G/A (Alfakhi et al., 2004).

AngII bindet an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR) AT<sub>1</sub>R, was zur Dissoziation der G $\alpha$ q-Untereinheit des GTP-bindenden Gq-Proteins und zur Aktivierung von downstream Signal-Molekülen wie der Phospholipase C (PLC) und der Proteinkinase C (PKC) führt (s. Abb.2.2). Dadurch wird die Expression Hypertrophie-assoziiierter Gene induziert. Eine mäßig erhöhte Expression (~4fach) von G $\alpha$ q führt bei transgenen Mäusen zu einer stabilen Form der Kardiomyozyten-Hypertrophie mit normaler Herzfunktion. Eine übermäßige Expression (~25fach) bzw. Stimulation führt allerdings nicht nur zu einer hypertrophischen Antwort der Kardiomyozyten sondern auch zu einer Kardiomyozyten-Apoptose (Adams et al., 1998; Sabri et al., 2002). Auch eine kardiale Überexpression des AT<sub>1</sub>-Rezeptors führt bei transgenen Mäusen neben einer Herzhypertrophie zusätzlich zu einer Herzinsuffizienz (Paradis et al., 2000). Der Untergang von Herzmuskelzellen wurde bei einer physiologischen Hypertrophie wie dem Sportherz jedoch nicht berichtet. Passend hierzu wurde gezeigt, dass eine AT<sub>1</sub>R-Blockade eine durch ständige Druck-Überbelastung (pathologischer Stimulus) induzierte Hypertrophie hemmt, nicht aber eine trainingsinduzierte (physiologischer Stimulus) Hypertrophie. Dies spricht dafür, dass die dauerhafte Aktivierung von G-

---

Protein-gekoppelten Rezeptoren eine pathologische Hypertrophie induziert (Geenen et al., 1996).

Das RAAS wird zwar durch eine erhöhte hämodynamische Last im Herzen aktiviert, aber der Reiz bei einem physiologischen Stimulus wie dem Ausdauertraining könnte zu schwach sein, um eine dauerhafte Erhöhung der Konzentration der RAAS-Komponenten auszulösen, durch die es zu einer messbar unterschiedlichen Auswirkung der RAAS-Polymorphismen auf die hypertrophische Antwort der Kardiomyozyten käme.

Dies scheint allerdings, nach unseren Ergebnissen, beim Aldosteron nicht der Fall zu sein. Aldosteron, dessen Synthese und Freisetzung durch AngII stimuliert wird und das somit das Endglied des RAAS darstellt, wird in der Nebenniere gebildet und reguliert über seine renale Wirkung den Salz- und Wasserhaushalt des Körpers. Anscheinend wirkt Aldosteron, ähnlich wie AngII, nicht nur indirekt, sondern auch direkt im Herz. Dort wirkt es über kardiale Mineralocorticoid-Rezeptoren (MRs) auf das Myokard ein und kann eine Kardiomyozyten-Hypertrophie sowie eine kardiale Fibrose induzieren (Silvestre et al., 1998). Ob allerdings Aldosteron auch im Herz gebildet wird, ist noch umstritten (Gomez-Sanchez et al., 2004; Young et al., 2001).

Aldosteron vermittelt seine physiologische Wirkung v.a über die Modulation der Expression anderer Gene. Deren Aktivierung durch Aldosteron erfolgt durch die Bindung des aufgrund seines Lipidcharakters membrangängigen Steroids an zytosolische Rezeptoren, die Mineralocorticoid-Rezeptoren. An den Rezeptor gebunden wird der Aldosteron-MR-Komplex in den Kern transloziert und wirkt dort als Transkriptionsfaktor. Als Interaktionsdomäne mit der DNA nutzt der Komplex das „steroid-response element“ (SRE) (Stockand, 2002). Dadurch wird die Protein-Synthese allerdings erst nach mehreren Stunden induziert. Diese MR-vermittelten Effekte werden als „genomische“ Effekte bezeichnet. Interessanterweise kann Aldosteron, anscheinend über die MRs, eine Verstärkung des AngII-induzierten Signaling verursachen (Mazak et al., 2004).

Neben den „genomischen“ Effekten kann Aldosteron jedoch auch innerhalb von Minuten erfolgende schnelle Effekte in verschiedenen Geweben wie beispielsweise dem Herz oder dem Gefäßsystem auslösen, die als „nicht-genomische“ Effekte bezeichnet werden (Lösel et al., 2002; Chai and Danser, 2006). Diese „nicht-genomischen“ Effekte werden anscheinend über spezifische Membranrezeptoren wie z.B. den AT<sub>1</sub>-Rezeptor vermittelt und schließen u.a. die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und der

Proteinkinase C (PKC) ein (Christ et al., 1993; 1995), die, wie bereits erwähnt, eine hypertrophische Antwort der Kardiomyozyten auslösen können (s. Abb.2.2).

Darüber hinaus induziert Aldosteron in einem positiven Feedback eine vermehrte Bildung der Angiotensin-Rezeptoren und steigert die ACE-Aktivität im Gewebe. Somit scheint Aldosteron als „Verstärker“ von AngII zu wirken (Robert et al., 1999). Es wird mittlerweile sogar vermutet, dass manche biologischen Effekte, die bisher AngII zugeschrieben wurden, erst durch das Zusammenspiel mit Aldosteron zustande kommen.

Aufgrund dessen ist Aldosteron eines der wichtigsten Hormone, die eine Kardiomyozyten-Hypertrophie induzieren können, wobei dies, wie erwähnt, sowohl indirekt über eine Erhöhung der Druck- und Volumenlast, als auch durch direkte trophische Wirkung auf die Herzmuskelzellen erfolgen kann (Delles et al., 2003; Schunkert et al., 1997). Eine Studie von Schlaich et al. (2000) zeigte, dass Aldosteron beim Menschen die linksventrikuläre Muskelmasse auch ohne signifikante Blutdruckerhöhung vermehren kann.

In mehreren Arbeiten wurde ein Zusammenhang zwischen dem -344C/T-Polymorphismus im Gen der Aldosteron-Synthase (CYP11B2), dem Schlüsselenzym der Aldosteron-Synthese, und der LVM beim Menschen festgestellt; allerdings widersprechen sich die Ergebnisse bezüglich der Bedeutung der beiden allelischen Formen (Delles et al., 2001; Kupari et al., 1998; Ortlepp et al., 2001; Stella et al., 2004). Ein möglicher Zusammenhang zwischen einer trainingsinduzierten Vergrößerung der LVM und diesem Polymorphismus wurde anscheinend bisher noch nicht untersucht.

Die Ergebnisse unserer Studie sprechen allerdings dafür, dass der CYP11B2-Polymorphismus auch bei einer physiologischen Herzhypertrophie eine Rolle spielen könnte (s. Abb.5.1): homozygote Träger des C-Allels (C/C) zeigten eine deutlich kleinere LVM als Träger der anderen beiden Genotypen (C/T und T/T). Dies war allerdings nur bei den männlichen Ausdauersportlern zu beobachten.

Der CYP11B2-Polymorphismus liegt innerhalb der Promotor-Region, wobei das T-Allel anscheinend mit einem höheren Aldosteron-Spiegel assoziiert ist. Dies wird allerdings kontrovers diskutiert (Barbato et al., 2004; Stella et al., 2004; Takai et al., 2002). Somit könnte das Ergebnis unserer Studie dadurch erklärt werden, dass Träger von mindestens einem T-Allel (T/T oder C/T) eine höhere Aldosteron-Konzentration besitzen als Träger des C/C-Genotyps, was u.a. von Barbato et al. (2004) auch

beschrieben worden ist. Möglicherweise wird durch den CYP11B2 -344C/T-Polymorphismus die Bindungsstelle des steroidogenen Transkriptionsfaktors SF-1 innerhalb der Promotor-Region beeinflusst. Die geringere Aldosteron-Bildung und die damit einhergehende schwächere hypertrophische Antwort der Kardiomyozyten wären somit eine Erklärung für die kleinere LVM bei C/C-Trägern.

Überraschenderweise scheint dieser Zusammenhang jedoch geschlechtsunterschiedlich zu sein: die weiblichen Ausdauersportler zeigten keine Assoziation zwischen den Genotypen des CYP11B2-Polymorphismus und den Herzparametern Herzvolumen und LVM.

Dies unterstützt die Vermutung, dass Geschlechtshormone einen Einfluss auf das RAAS haben. Dies wurde bereits von unterschiedlichen Arbeitsgruppen vermutet bzw. gezeigt: Freshour et al. (2002) zeigten, dass die ventrikuläre ACE-Konzentration bei männlichen Mäusen 1,5-2mal höher ist als bei weiblichen. Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass durch orale Einnahme von Östrogen Angiotensinogen hoch reguliert wird, wohingegen Renin, ACE und der AT<sub>1</sub>-Rezeptor herunterreguliert werden (Fischer et al., 2002). Im Einklang damit steht die mehrfache Beobachtung, dass sich genetische Polymorphismen im RAAS bei Männern stärker auswirken als bei Frauen: in einer Studie von Chai et al. (2006) an 79 Patienten mit einer hypertrophen Kardiomyopathie (HCM) wurde, ähnlich wie in unserer Studie, eine Assoziation zwischen einer größeren LVM und dem Vorliegen eines T-Allels des CYP11B2-Polymorphismus bei männlichen Patienten, nicht aber bei weiblichen Patienten festgestellt. Russo et al. (2007) fanden bei einer Population von 1604 Europäern sogar eine geschlechts- und altersabhängige Assoziation zwischen dem CYP11B2-Polymorphismus und dem Blutdruck: hierbei war das C-Allel signifikant mit einem etwas höheren Blutdruck und auch mit dem Auftreten von Bluthochdruck bei jungen Männern assoziiert, nicht jedoch bei Frauen oder älteren Männern (>47 Jahre).

Trotz der Hinweise auf eine geschlechtsunterschiedliche Wirkung des CYP11B2 -344C/T-Polymorphismus, muss unser Ergebnis aufgrund der kleinen Fallzahl an weiblichen Probanden (n=35) mit Vorsicht betrachtet werden.

### 5.2.2 Die Polymorphismen im IGF1-Signalweg

Wachstumsfaktoren spielen eine wichtige Rolle beim postnatalen Wachstum des Herzens, wobei dem „Insulin-like growth factor 1“ (IGF1) anscheinend eine Schlüsselrolle zukommt. Sowohl IGF1, als auch sein Rezeptor (IGF1R) werden im fötalen und im adulten Herz exprimiert. IGF1 verursacht eine Erhöhung der kardialen DNA- und Protein-Synthese, reduziert den Protein-Abbau, beeinflusst die früh postnatal abgeschlossene Proliferation der Kardiomyozyten und deren Reifung, sowie die hypertrophische Antwort der reifen Kardiomyozyten und wirkt darüber hinaus anti-apoptotisch (Delafontaine and Brink, 2000; Fuller et al., 1992; Reiss et al., 1996; Ren et al., 1999). Außerdem beeinflusst IGF1 die funktionellen Veränderungen, die bei einer Hypertrophie entstehen, durch seine Fähigkeit die Nachlast des Herzens zu reduzieren und positiv inotrop wirksam zu sein. Dies erfolgt u.a. durch Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und der Synthese kontraktile Proteine (Shahi et al., 1992). Zusätzlich bewirkt IGF1 über Stimulation der endothelialen NO-Produktion eine Vasodilatation und aktiviert die Angiogenese. Somit hat IGF1 neben seinem allgemeinen Einfluss auf das Wachstum und den Metabolismus des Körpers einen spezifischen Einfluss auf das Herz. Im Einklang damit stellten Shahi et al. (1992) eine positive Korrelation zwischen der IGF1-Konzentration und der linksventrikulären Masse sowie der Schlagkraft fest.

In unserer Studie wurde im IGF1-Signalweg sowohl ein bereits bekannter Polymorphismus im IGF1-Gen, als auch im IGF1-Rezeptor-Gen untersucht: der (CA)<sub>n</sub>-Repeatpolymorphismus innerhalb der Promotor-Region des IGF1-Gens und ein Basenaustausch G → A an Position 3174 im IGF1R. Beide Polymorphismen zeigen laut Literatur einen Zusammenhang mit der Serum-IGF1-Konzentration. Da jedoch die Konzentration im Serum nicht die lokale IGF1-Konzentration im Gewebe widerspiegelt, die darüber hinaus auch durch die gewebeunterschiedliche Expression der spezifischen Bindungsproteine (IGFBPs) beeinflusst wird (Ren et al., 1999; Yazdanpanah et al., 2006), ist bisher noch unklar, wie sich der IGF1- und der IGF1R-Polymorphismus auf die IGF1-Konzentration im Herzgewebe auswirken.

Bezüglich des Polymorphismus im **IGF1**-Gen lieferte unsere Studie folgende Ergebnisse: es gab keinen Hinweis darauf, dass einer der Genotypen des IGF1-Polymorphismus in der Kontrollgruppe oder der männlichen Sportlergruppe einen Selektionsvorteil bzw. –Nachteil für dessen Träger bietet: die Genotypfrequenzen beider Gruppen (Kontrollen:  $p > 0,2$ ; ♂ Sportler:  $p > 0,1$ ) entsprachen denen einer großen



europäischen Kontrollgruppe aus Männern und Frauen (n=1320; Bleumink et al., 2005) und waren im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Allerdings unterschieden sich die Genotypfrequenzen unserer Kontrollen und männlichen Sportler untereinander signifikant (s. 4.2.3.1). Die Genotypfrequenzen unserer weiblichen Sportlergruppe zeigten, wie bereits bei einigen der RAAS-Polyomorphismen beobachtet, signifikante Abweichungen von denen der europäischen Normalbevölkerung: wir konnten ~3x so viele Nicht-Träger des WT-Allels (d.h.  $\neq 19/\neq 19$ ) finden als die Arbeitsgruppe um Bleumink ( $p < 0,0001$ ). Die 19/19-Homozygoten, sowie die 19/ $\neq 19$ -Heterozygoten waren hingegen unterrepräsentiert. Zusätzlich lagen die Genotypfrequenzen des IGF1-Polymorphismus bei den weiblichen Sportlern nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht: auch hier waren vor allem die  $\neq 19/\neq 19$ -„Homozygoten“ überrepräsentiert. Dies könnte für einen Selektionsvorteil der  $\neq 19/\neq 19$ -Genotypen bei den weiblichen Sportlern sprechen. Allerdings muss auch an einen Fehler der kleinen Zahl gedacht werden, denn in einer Studie von Kostek et al. (2005) an älteren Probanden wurde beobachtet, dass Träger des 19-Allels (WT) durch Krafttraining signifikant mehr profitierten als Nicht-Träger.

Bei unseren männlichen Ausdauersportlern fanden wir einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem IGF1-Polymorphismus und der linksventrikulären Muskelmasse, nicht dagegen bei den weiblichen. Innerhalb des männlichen Sportlerkollektivs zeigten die „homozygoten“ Träger für Nicht-WT-Allele ( $\neq 19/\neq 19$ ) eine signifikant größere linksventrikuläre Muskelmasse als die homozygoten WT-Träger (19/19).

Bei den weiblichen Sportlern zeigte sich stattdessen ein signifikanter Zusammenhang zwischen den Nicht-WT-Allelen ( $\neq 19$ ) und einem größeren relativen Herzvolumen. Die Ergebnisse der weiblichen Sportlergruppe sollten jedoch nicht überbewertet werden, da es sich aufgrund der kleinen Fallzahl (n=35) hierbei möglicherweise um einen Zufallsbefund handelt.

Der IGF1-Repeatpolymorphismus ist innerhalb der Promotor-Region des IGF1-Gens nur 1kb upstream vom Transkriptionsstart lokalisiert, wo spezifische regulatorische Elemente zu finden sind (McCarthy et al., 1997). Seine funktionelle Relevanz ist noch unklar, aber es wird vermutet, dass die Länge des Repeats die Expression des Gens in irgendeiner Weise beeinflussen könnte. Die Anzahl der CA-Einheiten liegt zwischen 10 und 24, wobei das 19-Allel bei Kaukasiern am häufigsten vorkommt und als Wildtyp angesehen wird (Allen, et al., 2002; Frayling et al., 2002; Rosen et al., 1998; Vaessen et

al., 2001). Der Einfluss des Polymorphismus auf die Serum-IGF1-Konzentration wird in der Literatur kontrovers beschrieben: es wurde gezeigt, dass homozygote Träger des Wildtyps (19/19) eine höhere (Vaessen et al., 2001), eine niedrigere (Frayling et al., 2002; Rosen et al., 1998), oder sogar eine ähnliche (Allen et al., 2002) IGF1-Konzentration aufweisen als Träger anderer Allele ( $\neq 19/\neq 19$ ).

In unserer Studie erfolgte keine Bestimmung des IGF1-Spiegels im Serum der Probanden. Aufgrund der in der Literatur beschriebenen kontroversen Ergebnisse bezüglich der Serum-IGF1-Konzentration kann davon ausgegangen werden, dass der Serum-IGF1-Spiegel erst recht kein zuverlässiger Indikator für die lokale IGF1-Konzentration ist. Um die für uns wichtige Information über den Einfluss beider Polymorphismen auf die kardiale IGF1-Konzentration zu erhalten, wäre die Entnahme von Herzbiopsien notwendig gewesen, was für unsere Probanden nicht zumutbar war. Auch eine koronarangiographische Blutentnahme (Neri Serneri et al., 2001; s. unten) wäre nicht zu diskutieren gewesen. Da diese Informationen fehlen, können unsere Ergebnisse nur folgendermaßen interpretiert werden:

Wenn die Nicht-WT-Allele ( $\neq 19$ ) mit einer höheren kardialen IGF1-Konzentration assoziiert sind, könnte dies bei Nicht-Trägern des Wildtyp-Allels ( $\neq 19/\neq 19$ ) eine stärkere hypertrophische Antwort der Kardiomyozyten induzieren als bei Trägern des WT-Allels (19).

Ist hingegen das WT-Allel (19) mit einer höheren IGF1-Konzentration assoziiert, so könnte bei Trägern mindestens eines 19-Allels gerade ein Schwellenwert der IGF1-Konzentration erreicht werden, der zusätzlich die Aktivierung des negativen Regulators Myostatin induziert. Myostatin könnte dann der IGF1-induzierten Myokardhypertrophie entgegenwirken, und auf diese Weise eine Vergrößerung der LVM verhindern.

Bezüglich des Polymorphismus im Gen des **IGF1-Rezeptors** konnten wir folgende Beobachtungen machen: bei der Überprüfung eines Selektionsvorteils zugunsten eines bestimmten Genotyps stellte sich heraus, dass sich sowohl die Kontrollgruppe, als auch unsere beiden Sportlergruppen in ihren Genotypfrequenzen weder signifikant untereinander (s. 4.2.3.2), noch von solchen der europäischen Normalbevölkerung (Garcia et al., 2006) unterschieden (Kontrollen:  $p > 0,1$ ; ♀ Sportler:  $p > 0,1$ ; ♂ Sportler:  $p > 0,2$ ), und alle im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht lagen.

Da es sich bei dem IGF1R 3174G/A-Polymorphismus in Exon16 um einen „stummen“, d.h. die Aminosäuresequenz nicht verändernden Polymorphismus handelt, ist er

weniger gut untersucht als der IGF1-Repeatpolymorphismus. In einer Studie von Bonafé et al. (2003) wird jedoch beschrieben, dass das A-Allel anscheinend mit einer geringeren Konzentration an freiem IGF1 im Plasma assoziiert ist als das G-Allel.

In unserer Studie besaßen die männlichen Sportler, die Träger des A/A-Genotyps waren, eine signifikant größere LVM als die Träger des G/G-Genotyps. Die männlichen Kontrollen, sowie die weiblichen Sportler zeigten wiederum keinen signifikanten Zusammenhang bezüglich der LVM. Allerdings konnte bei den weiblichen Sportlern, ähnlich wie bei dem IGF1-Polymorphismus, ein signifikant größeres Herzvolumen bei Vorliegen von mindestens einem A-Allel beobachtet werden. Auch hierbei ist die Möglichkeit eines Zufallsbefunds nicht auszuschließen.

Wie können die Zusammenhänge mit der LVM erklärt werden? Das A-Allel im IGF1R-Polymorphismus wurde bisher lediglich mit einer geringeren IGF1-Konzentration im Plasma in Verbindung gebracht. In unserer Studie ist es allerdings mit einer größeren LVM assoziiert. Dies könnte damit zusammenhängen, dass der IGF1-Rezeptor nicht nur die Wirkung von IGF1 vermittelt, sondern gleichzeitig die IGF1-Produktion reduziert (Balogh et al., 2006). Das A-Allel des IGF1R-Polymorphismus könnte somit mit einer höheren Aktivität bzw. Produktion des IGF1-Rezeptors assoziiert sein, was eine Verstärkung des negativen Feedbacks und dadurch eine geringere IGF1-Produktion verursachen könnte. Trotzdem wäre die intrazelluläre Signaltransduktion verstärkt, woraus eine stärkere hypertrophische Antwort der Kardiomyozyten bei männlichen A/A-Trägern resultieren könnte.

Somit scheinen sowohl der Polymorphismus im IGF1-, als auch der im IGF1-Rezeptor-Gen einen Einfluss auf das Maß der trainingsinduzierten Verdickung des Herzmuskels zu haben, bisher allerdings nur bei männlichen Ausdauersportlern (s. Abb.5.1).

Geschlechtsunterschiede in Hinblick auf den IGF1-Signalweg wurden bereits in anderen Studien beobachtet: so wirkt sich beispielsweise ein IGF1-Rezeptor-Mangel, der bei transgenen Mäusen zu einem verminderten postnatalen Organ- und v.a. Fettgewebewachstum führt, bei männlichen Tieren anscheinend doppelt so stark aus wie bei weiblichen (Holzenberger et al., 2001). Des Weiteren wurde in einer Studie an Jugendlichen zwischen 11 und 18 Jahren lediglich bei Jungen ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten IGF1-Konzentration und einem signifikant höheren Blutdruck in der Pubertät festgestellt, nicht jedoch bei Mädchen (Jiang et al., 1997).

Dies könnte dadurch erklärt werden, dass bei dem IGF1-Signalweg ebenfalls Geschlechts-Hormone eine wichtige Rolle spielen. Es ist bekannt, dass IGF1 die Synthese von Sex-Steroiden stimuliert und selbst von Geschlechtshormonen wie Testosteron und Östrogen in unterschiedlicher Weise beeinflusst wird (Undén et al., 2005). Testosteron beispielsweise stimuliert die IGF1-Produktion bei Jungen (Leung et al. 2004). In einer Studie von Fan et al. (2007) wurde zusätzlich gezeigt, dass umgekehrt der IGF1/PI3K-Signalweg den Androgen-Rezeptor (AR) aktivieren kann. Dies erfolgt über eine Inaktivierung des Transkriptionsfaktors Foxo1, einen Inhibitor des AR. Gleichzeitig reguliert Dihydrotestosteron (DHT) über Bindung an den AR die Expression des IGF1-Rezeptors hoch. Im Gegensatz dazu haben Östrogene einen inhibitorischen Effekt auf die IGF1-Sekretion (Daughaday, 2000): die Arbeitsgruppe um Sonnet et al. (2007) konnte zeigen, dass die orale Aufnahme von Östrogen zu einer signifikanten Reduktion des IGF1-Spiegels im Blut postmenopausaler Frauen führt. Die Geschlechts-Hormone wirken offenbar direkt auf den IGF1-Signalweg ein. Zusätzlich unterliegen die IGF1-Bindungsproteine (IGFBPs), die die wirksame Konzentration und die biologische Affinität von IGF1 beeinflussen, anscheinend ebenfalls einer Regulation durch Geschlechts-Hormone: so weisen Frauen beispielsweise, unabhängig vom Alter, eine höhere Konzentration an dem inhibitorischen IGFBP-1 auf als Männer. Bei Männern steigt der IGFBP-1-Spiegel mit dem Alter signifikant an. Außerdem konnte eine positive Korrelation zwischen Testosteron und IGFBP-1 bei Männern, bei Frauen hingegen eine negative Korrelation nachgewiesen werden. Der Zusammenhang zwischen IGFBP-1 und weiblichen Geschlechtshormonen ist noch nicht ausreichend untersucht (Ren et al., 1999; Undén et al., 2005).

#### Der Polymorphismus im Myostatin-Gen (GDF8):

Neben den beiden Komponenten, IGF1 und IGF1-Rezeptor, wurde in unserer Studie ein negativer Regulator des IGF1-Signalwegs auf Polymorphismen untersucht, das **Myostatin (GDF8)**. Myostatin ist ein Protein, dessen Funktion darin besteht, das Muskelwachstum zu begrenzen. Dies gilt anscheinend auch für den Herzmuskel. Durch unsere vollständige Analyse der Myostatin-Sequenz entdeckten wir die Bedeutung eines bisher in der Literatur unbeachteten Deletionspolymorphismus (GDF8 IVS1+88\_90delA), der innerhalb des 1. Introns lokalisiert ist. Bei 16,5% der untersuchten Sportler liegen in der Basenabfolge des ersten Introns an Position 88 bis 90 nur 2 Adenine vor statt, wie in den Genbanken verzeichnet, normal 3 Adenine (AAA → AA). Angaben bezüglich der Häufigkeit dieses Polymorphismus in der europäischen

Normalbevölkerung sind uns nicht bekannt. Die von uns untersuchten Gruppen zeigten signifikante Unterschiede: bei den männlichen Sportlern war im Vergleich zu den männlichen Kontrollen eine Verschiebung zugunsten des A-Allels zu beobachten. Die Homozygoten A/A waren über-, die Heterozygoten A/- hingegen unterrepräsentiert. Die prozentualen Häufigkeiten der wenigen Homozygoten -/- waren identisch. Auch die beiden Sportlergruppen unterschieden sich signifikant voneinander, wobei sich in diesem Fall eine Verschiebung zugunsten des Deletionsallels bei den weiblichen Sportlern zeigte. Sie zeigten prozentual mehr als doppelt so viele homozygote Träger des Deletions-Allels wie die männliche Sportlergruppe, wohingegen die A/A-Träger unterrepräsentiert waren. Die Heterozygoten waren bei beiden Sportlergruppen nahezu identisch. Bilanziell lag die Frequenz des Deletionsallels bei den männlichen Sportlern bei 15%, bei den weiblichen, deutlich vermehrt, bei 20,5%. Zusätzlich waren die weiblichen Sportler nicht mehr im HWG (s. 4.2.3.3).

Der GDF8-Polymorphismus zeigte bei den männlichen Ausdauersportlern einen signifikanten Zusammenhang mit der LVM ( $p=0,015$ ). Bereits heterozygote Träger eines Deletionsallels (A/-) besaßen eine signifikant kleinere LVM als Träger des homozygoten Wildtyps (A/A). Dies galt auch für die homozygoten Träger des Deletionsallels (-/-). Allerdings war dieser Zusammenhang statistisch nicht zu sichern (s. Abb.4.31). Die Frage einer möglichen Verstärkung des Effekts konnte aufgrund der kleinen Fallzahl ebenfalls nicht beurteilt werden: lediglich drei der männlichen Ausdauersportler besaßen den homozygoten Genotyp (-/-). Unsere Ergebnisse sprechen dafür, dass das Deletions-Allel (-) bei Männern eine Verstärkung des myostatischen Effekts verursachen könnte, was zu einer stärkeren Hemmung der durch IGF1-induzierten hypertrophischen Antwort der Kardiomyozyten auf den Trainingsreiz führen würde (Abb.5.1).

In der weiblichen Sportlergruppe konnte kein signifikanter Zusammenhang beobachtet werden, weder mit dem relativen Herzvolumen, noch mit der LVM. Wie im Folgenden diskutiert wird, können hierfür interferierende geschlechtsunterschiedliche Mechanismen verantwortlich sein. Aufgrund der kleinen Fallzahl muss bei der weiblichen Sportlergruppe jedoch auch ein Zufallsbefund in Betracht gezogen werden. Eine Überprüfung an einem größeren Untersuchungskollektiv ist unerlässlich.

Der signifikante Zusammenhang bei den männlichen Sportlern erscheint aufgrund der Lage des Polymorphismus inmitten eines Introns (88-90bp hinter Exon1) eher ungewöhnlich, da sich hier kein Einfluss auf eine Spleißstelle vermuten lässt. Ob der

Polymorphismus selbst tatsächlich funktionell relevant ist, z.B. die Transkription beeinflusst, oder sich in Assoziation bzw. Kopplung mit einem anderen funktionell bedeutsamen Polymorphismus befindet, muss durch weitere Studien überprüft werden. Der phylogenetische Vergleich dieses Intronbereichs zeigt jedenfalls eine sehr hohe Konservierung bei Säugern, was auf eine funktionelle Relevanz dieser Sequenz hindeutet. Besonders interessant ist, dass bei anderen Säugern, wie z.B. der Maus, dem Rind oder dem uns so nahe verwandten Schimpansen, anscheinend die A-Deletion (-) den Wildtyp darstellt, wohingegen es sich beim Menschen bei dem A-Allel um den Wildtyp handelt (s. 4.2.3.3.).

Dem Phänotyp nach zu urteilen könnte die Deletion entweder eine Erhöhung der Myostatin-Konzentration bewirken, oder einen qualitativen Einfluss auf das Myostatin-Protein haben. Jedenfalls könnte die Erhöhung des myostatischen Effekts zu einer Abschwächung der hypertrophischen Antwort der Kardiomyozyten auf den Trainingsreiz führen, so dass Träger des Deletionsallels eine kleinere LVM aufweisen als homozygote Träger des A-Allels.

Bei dem Myostatin-Polymorphismus zeigten sich Geschlechtsunterschiede, wie sie bereits bei den anderen beiden Polymorphismen des IGF1-Signalwegs diskutiert wurden: der Myostatin-Polymorphismus wirkt sich nach unseren Ergebnissen nur bei den männlichen Ausdauersportlern signifikant auf die linksventrikuläre Muskelmasse aus, nicht aber bei den weiblichen.

Ähnliches wurde bereits in einem transgenen Mausmodell beobachtet: eine erhöhte Expression von Myostatin führte lediglich bei den männlichen Tieren zu einer verminderten Skelett- und Herz-Muskelmasse, nicht aber bei den weiblichen (Reisz-Porszasz et al., 2003). Auch dies spricht nächstliegend für den Einfluss von Geschlechts-Hormonen. In der Literatur werden deutliche geschlechtsabhängige Unterschiede in der Myostatin-Proteinmenge beschrieben: so ist die Konzentration an aktivem Myostatin im Skelettmuskel bei männlichen Mäusen um 40-60% geringer als bei weiblichen. Hierbei handelt es sich anscheinend um ein posttranskriptionales oder posttranslationales Ereignis, da diese Unterschiede auf Ebene der mRNA nicht beobachtet werden konnten (McMahon et al., 2003). Dies könnte bedeuten, dass die Myostatin-Konzentration bei Frauen bereits so hoch ist, dass sie durch den Deletions-Polymorphismus nicht mehr wesentlich erhöht wird. Hierzu passen die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Mendler et al. (2007), dass Androgene anscheinend einen hemmenden Einfluss auf die Myostatin-Expression haben: nach einer Kastration wurde

bei männlichen Ratten eine signifikante Hochregulierung von aktivem Myostatin beobachtete, wohingegen eine anschließende Testosteron-Behandlung den Myostatin-Spiegel wieder normalisierte. Darüber hinaus wird Myostatin anscheinend von IGF1 und dem IGF1-Rezeptor aktiviert, die, wie bereits diskutiert, direkt durch Geschlechts-Hormone beeinflusst werden. Des Weiteren wurde in einer Studie von Siriatt et al. (2006) festgestellt, dass Myostatin auch selbst einen indirekten Einfluss auf den Androgen-Rezeptor haben könnte: die Untersuchung ergab, dass Myostatin ein negativer Regulator des Androgen-Rezeptor-assoziierten Proteins 70 (ARA70) im Skelettmuskel ist. ARA70 ist ein Co-Regulator, der das Transaktivierungspotential des AR verstärkt. Falls dies auch im Herzmuskel der Fall ist, könnte Myostatin über die Supprimierung der ARA70-Expression das AR-Signaling abschwächen, was dann auch zu einer Abschwächung der AR-vermittelten IGF1R-Expression führen könnte (s. oben). Auf diese Weise würde Myostatin sogar auf zwei unterschiedlichen Wegen regulierend in den IGF1-Signalweg eingreifen.

***Unsere neuartigen Ergebnisse deuten somit darauf hin, dass das Maß eines trainingsinduzierten linksventrikulären Wachstums entscheidend durch Polymorphismen im IGF1-Signalweg (IGF1-IGF1R-GDF8) beeinflusst wird.***

Im Einklang damit haben sich in den letzten Jahren tatsächlich immer mehr Hinweise ergeben, dass dem IGF1/PI3K-Signalweg eine besondere Rolle bei der Entwicklung einer physiologischen Herzhypertrophie zukommt. Zusätzlich dazu, dass eine erhöhte IGF1/PI3K-Aktivierung zu einer Myokardhypertrophie mit normaler bzw. sogar verbesserter Herzfunktion führt, konnte bei Leistungssportlern eine höhere kardiale Konzentration von IGF1, allerdings nicht von AngII, nachgewiesen werden, als bei Kontrollpersonen (McMullen et al., 2004; Neri Serneri et al., 2001). Darüber hinaus scheint dem IGF1/PI3K-Signalweg sogar eine kardioprotektive Rolle zuzukommen: so zeigte sich in einer Studie von McMullen et al. (2007), dass körperliches Training und eine erhöhte kardiale PI3K(p110 $\alpha$ )-Aktivität das Überleben in einem Maus-Modell für eine dilatative Kardiomyopathie um 15-20% verlängerte, wohingegen eine reduzierte PI3K-Aktivität die Lebensspanne drastisch um etwa 50% verkürzte. Darüber hinaus wurde durch die erhöhte PI3K-Aktivität ein pathologisches Herzwachstum abgeschwächt. Dies könnte zumindest teilweise durch einen „cross-talk“ zwischen dem IGF1-Signalweg und dem RAAS im Herz erklärt werden: AngII kann sowohl eine Erhöhung der IGF1- als auch der IGF1R-Expression im Myokard induzieren (Brink et

al., 1999). Außerdem vermittelt AngII über den G-Protein-gekoppelten AT<sub>1</sub>-Rezeptor die Phosphorylierung und somit die Transaktivierung des IGF1-Rezeptors, wobei dafür die Bindung von IGF1 an den IGF1R nicht notwendig zu sein scheint (Haddad et al., 2003; Zaharadka et al., 2004).

IGF1 kann seinerseits über Aktivierung von PI3K(p110 $\alpha$ ) Signalmoleküle „downstream“ von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) inhibieren, zu denen auch der AT<sub>1</sub>-Rezeptor gehört (McMullen et al., 2007). Somit könnte der IGF1-Signalweg, wenn er durch einen physiologischen Stimulus (z.B. Ausdauertraining) aktiviert wird, einer pathologischen Herzhypertrophie, die beispielsweise durch AngII ausgelöst wird, entgegenwirken.

### ***5.2.3 Polymorphismen in assoziierten Genen***

Neben dem RAAS und dem IGF1-Signalweg wurden in dieser Studie noch weitere, mit den beiden Signalwegen assoziierte Faktoren auf Polymorphismen und deren Zusammenhang mit einer physiologischen Herzhypertrophie untersucht. Hierzu gehörten der G389R-Polymorphismus im Gen des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors ( $\beta_1$ AR), der 5bpI/D-Polymorphismus im Troponin T-Gen (TNNT2) sowie die beiden Repeatpolymorphismen (CAG)<sub>n</sub> und (GGC)<sub>n</sub> im Gen des Androgen-Rezeptors (AR). Darüber hinaus wurde eine Mutationsanalyse der vollständigen kodierenden Sequenz des B-Typ natriuretischen Peptids (BNP) durchgeführt.

Es wurde bei unseren Ausdauersportlern kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Polymorphismen im  $\beta_1$ AR-Gen und im **Troponin T-Gen** und dem relativen Herzvolumen sowie der LVM gefunden. Anscheinend wirken sich diese Polymorphismen bei einer physiologischen Herzhypertrophie wie dem Sportler nicht aus. Beide lagen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Im Falle des Polymorphismus im  $\beta_1$ AR-Gen konnte auch bei einer pathologisch bedingten LVH kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden (Yuan et al., 2006). Der Polymorphismus im Troponin T-Gen hingegen zeigte in verschiedenen Studien eine Assoziation mit einer pathologischen Herzhypertrophie (Garcia-Castro et al., 2007; Komamura et al., 2004). Interessanterweise fanden wir in unserem Sportlerkollektiv (s. 4.2.4.4) ähnliche Genotypfrequenzen beim Troponin T-Polymorphismus wie in einer Gruppe japanischer Patienten, Männer und Frauen (n=151) mit konzentrischer LVH (Komamura et al., 2004). Bei den Patienten, wie auch bei unseren Sportlern, waren die Genotypfrequenzen zugunsten des D-Allels im



Vergleich zu der großen Kontrollgruppe (n=987) von Komamura et al. verschoben; als deutlicher Trend bei den Männern ( $p < 0,1$ ), hochsignifikant bei den Frauen ( $p < 0,001$ ).

Auch bei den beiden Repeatpolymorphismen **(CAG)n** und **(GGC)n** im **Androgen-Rezeptor** (AR), bei denen in unserer untersuchten Population ein Hardy-Weinberg-Gleichgewicht vorlag, zeigte sich bei unseren Ausdauersportlern keine signifikante Assoziation zwischen Repeat-Länge und dem relativen Herzvolumen oder der LVM. Aus der Literatur ergibt sich, dass diese beiden Repeatstrukturen im 1. Exon des Androgen-Rezeptors die Transaktivierungsfähigkeit des Rezeptors verändern. Je kürzer die repetitiven Sequenzen sind, desto stärker reagiert der Rezeptor auf definierte Konzentrationen von Testosteron, je länger sie sind, desto schwächer (Ding et al., 2004; 2005). Ein besonders aktiver Rezeptor täuscht dem Körper eine erhöhte Testosteronkonzentration vor. Es erfolgt so zu sagen ein „natürliches Doping“, denn eine erhöhte Testosteronkonzentration begünstigt die Muskelentwicklung und steigert die Erythropoese. Trotzdem ist es bisher unüblich, bei Sportlern die Aktivität des Androgen-Rezeptors zu bestimmen. In den bisherigen, meist onkologischen Studien wurde überwiegend nur der (CAG)n-Repeat und wesentlich weniger intensiv der (GGC)n-Repeat untersucht. Im Rahmen unserer Studie wurde ein Verfahren modifiziert, das es erlaubt, die Länge ( $\pm 1$  Repeat) beider variablen Strukturen gemeinsam zu bestimmen. Der Mittelwert der CAG-Allele unserer männlichen Hochleistungssportler war um knapp eine Repeateinheit kleiner als der unserer Kontrollen (21,9/22,7). Derjenige der weiblichen Sportler lag dazwischen (22,4). Der gleiche Trend fand sich bei dem (GGC)n-Repeat: männliche Kontrollen 17,5, männliche Sportler 17,0, weibliche Sportler 16,9.

Interessanterweise zeigte die Betrachtung der individuellen Befunde eine an den Mittelwerten nicht erkennbare Linksverschiebung der Allel-Verteilungen, d.h. bei den Sportlern fanden sich deutlich mehr kurze CAG-Allele ( $< 22$ ) ( $p < 0,0001$ ) als bei den Kontrollen (Abb.4.32). Darüber hinaus traten bei unseren männlichen Sportlern auch signifikant mehr kürzere Allele auf ( $p < 0,025$ ), als bei der männlichen Normalpopulation von Binnie et al. (2005). Bezüglich des (GGC)n-Repeats (Abb.4.33) konnten wir ebenfalls bei den Sportlern mehr kurze Allele ( $\leq 17$ ) finden, als bei unseren Kontrollen. Dies war besonders deutlich bei unserer weiblichen Sportlergruppe zu erkennen. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe von Binnie et al. lagen bei unseren Gruppen insgesamt jedoch signifikant weniger kurze Allele vor ( $p < 0,0001$ ). Dies könnte damit zusammenhängen, dass die (GGC)n-Allelverteilung bei Binnie et al. zwar unserer

ähnelt, aber um eine Wiederholung nach links versetzt ist. So ist in deren Studie das 16-Allel das häufigste, das 17-Allel das zweithäufigste. Bei uns ist das 17-Allel das häufigste und das 18-Allel das zweithäufigste. Bei Repeatanalysen müssen wir allgemein eine Abweichung von  $\pm 1$  Repeat einräumen. Dies könnte eine Erklärung für diese signifikante Abweichung, auch zwischen zwei Populationen, sein. Allgemein deuten unsere Ergebnisse jedoch darauf hin, dass die untersuchten Ausdauersportler durchschnittlich aktivere Androgen-Rezeptoren besitzen. Dies würde bedeuten, dass unsere Sportler bei durchschnittlich gleichem Testosteron-Spiegel leistungsfähiger sind als die Kontrollen. Allerdings sind die Zusammenhänge zwischen Repeatlänge und Rezeptoraktivität anscheinend nicht völlig linear: die Arbeitsgruppe um Ding et al. (2004) konnte nachweisen, dass nur bestimmte (CAG)<sub>n</sub>-Repeatlängen innerhalb des Bereichs von 14-25 Wiederholungen den Protein-Spiegel und die Transaktivierungsaktivität des Androgen-Rezeptors signifikant beeinflussen. Da die Repeatsequenzen translatiert werden und als Polyglutamin- bzw. Polyglycin-Sequenzen in der Transaktivierungsdomäne des Rezeptors liegen, könnte die Proteinfaltung diskontinuierlich verändert werden; sie muss kein lineares Phänomen darstellen. So zeigten die Autoren z.B. bei den Allelen 15 und 17 eine stärkere, bei Allel 21 eine schwächere Transaktivierungsaktivität, als aufgrund der Position in der Rangreihe zu erwarten. Dies spricht dafür, dass möglicherweise bei diesen beiden Repeatlängen ( $n=15$  und  $n=17$ ) ein signifikanter Einfluss auf die Herzgröße zu erwarten gewesen wäre. Lediglich einer unserer männlichen Sportler war Träger des 17-Allels. Das 15-Allel lag in unserem Untersuchungskollektiv überhaupt nicht vor. Deshalb müssten diese Zusammenhänge an einer deutlich größeren Population überprüft werden.

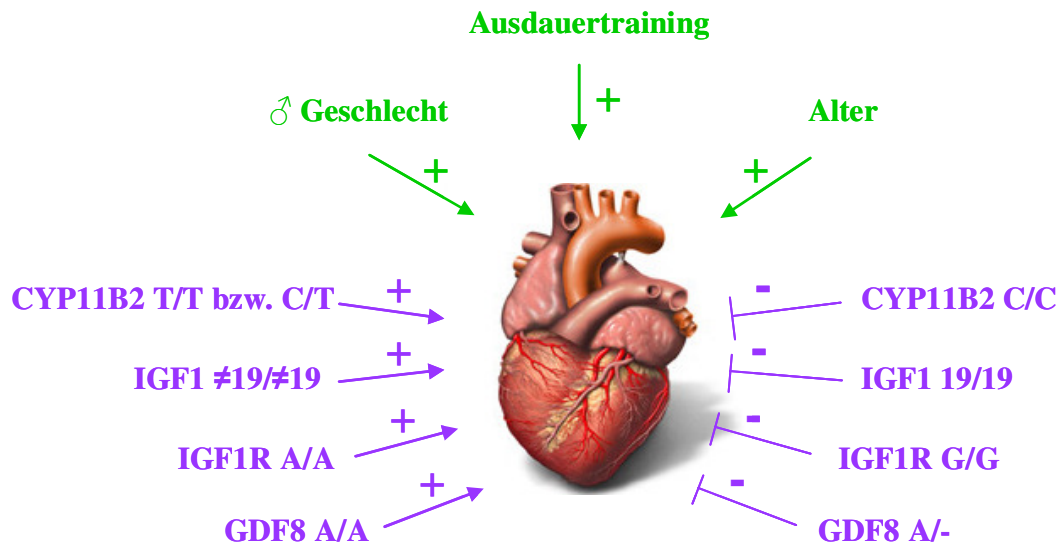
Zusätzlich zu den in der Literatur bereits beschriebenen Polymorphismen konnten in unserer Studie zwei polymorphe Regionen im Gen des B-Typ natriuretischen Peptids (BNP) identifiziert werden. Das BNP wirkt über Renin und die Aldosteron-Synthase hemmend auf das RAAS ein und wird u.a bei übermäßiger kardialer Aldosteron-Konzentration verstärkt exprimiert (Tsybouleva et al., 2004). Die beiden polymorphen Regionen liegen zwar in Exon1 bzw. Exon3, allerdings außerhalb der translatierten Sequenz (s. 4.2.4.2). Bei beiden Polymorphismen handelt es sich um Insertions-/Deletions-Polymorphismen. Bisher sind keine Arbeiten über eine pathophysiologische Bedeutung dieser Sequenzveränderungen bekannt. Der Polymorphismus im 1. Exon zeigte eine sehr geringe Frequenz der drei Mutationsallele (0,5-3%; s. Tab.4.18), weshalb eine statistische Analyse in Hinblick auf eine Sportherzentwicklung nicht aussagekräftig war. Der Polymorphismus im 3. Exon hingegen zeigte eine höhere

---

Allelfrequenz (bis zu 41% bei Mutationsallel M2; s. Tab.4.19) und wurde statistisch ausgewertet. Es konnte allerdings kein signifikanter Zusammenhang zwischen diesem Polymorphismus und dem relativen Herzvolumen, sowie der LVM beobachtet werden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass beide Sequenzveränderungen nicht funktionell relevant sind. Darüber hinaus befindet sich der Polymorphismus in Exon3 wiederum bei den Sportlerinnen nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht: die WT/M2-Heterozygoten kommen sehr viel häufiger bei den Sportlerinnen vor als erwartet, wohingegen u.a. die M2/M2-Homozygoten stark unterrepräsentiert sind.

Unsere Untersuchungsergebnisse von 16 Polymorphismen kardiologisch bedeutsamer Gene deuten somit darauf hin, dass den Polymorphismen im IGF1-Signalweg eine wichtige Rolle bei der Modifizierung der trainingsinduzierten hypertrophischen Antwort der Kardiomyozyten zukommt. Für die einzelnen Polymorphismen im RAAS trifft dies nach unseren Ergebnissen offenbar nicht zu. Die einzige Ausnahme ist der Polymorphismus der Aldosteron-Synthase (CYP11B2). Auch in den assoziierten Faktoren  $\beta_1$ -adrenerger Rezeptor, Troponin T, Androgen-Rezeptor und dem B-Typ natriuretischen Peptid (BNP) scheinen sich Polymorphismen bei der physiologischen Form der Herzhypertrophie nicht wesentlich auszuwirken. Diese Aussage bezieht sich ausschließlich auf die kardiologischen Parameter und nicht auf die allgemeine körperliche Leistungsfähigkeit, die nicht Gegenstand dieser Studie war.

Die Ergebnisse über die verstärkende oder abschwächende Wirkung bestimmter Polymorphismen-Kombinationen (Netzwerk) werden im Folgenden diskutiert.



**Abb.5.1:** Faktoren, die unabhängig voneinander einen signifikanten Einfluss auf das Maß der physiologischen Herzhypertrophie bei den von uns untersuchten männlichen Ausdauersportlern hatten. Unabhängig von der genetischen Veranlagung hatten sowohl das männliche Geschlecht, die Anzahl der Trainingsstunden (Ausdauertraining) pro Woche und das Alter einen fördernden Einfluss auf die LVM (grün). Darüber hinaus zeigten die Genotypen CYP11B2 -344T/T bzw. C/T, IGF1  $\neq$ 19/ $\neq$ 19, IGF1R 3174A/A und GDF8 A/A einen Zusammenhang mit einer größeren LVM, was einen fördernden Einfluss vermuten lässt, wohingegen die Genotypen CYP11B2 -344C/C, IGF1 19/19, IGF1R 3174G/G und GDF8 A/- eine Hypertrophie anscheinend abschwächen (lila).

### 5.3 Zusammenhänge zwischen Polymorphismen-Kombinationen und dem Sporthertz

Das Ausmaß einer Herzhypertrophie, sowohl pathologisch als auch physiologisch, wird durch das Zusammenspiel vieler verschiedener Faktoren festgelegt.

Die in unserer Studie untersuchten Gene stellen ein großes Netzwerk miteinander interagierender Faktoren dar, die gemeinsam die hypertrophische Antwort der Kardiomyozyten begünstigen bzw. hemmen. Folglich haben wir auch deren Polymorphismen nicht nur einzeln, sondern zusätzlich in Kombination miteinander in Hinblick auf einen Zusammenhang mit der linksventrikulären Masse unserer Ausdauersportler betrachtet. Aufgrund der kleinen Fallzahl der weiblichen Sportlergruppe und den möglichen geschlechtsunterschiedlichen Einflussfaktoren wurden hierbei nur die männlichen Sportler betrachtet. Leider ermöglichte auch die Fallzahl der männlichen Probanden lediglich eine statistische Aussage zu Kombinationen von jeweils zwei Polymorphismen miteinander. Hierbei ergaben sich allerdings interessante Zusammenhänge:

Innerhalb der RAAS-Polymorphismen zeigten sich deutliche synergistische Effekte (Tab.5.3). So z.B. zwischen den Polymorphismen im Angiotensinogen(AGT)-Gen und

im AngII-Rezeptor TypII(AT<sub>2</sub>R)-Gen: männliche Sportler, die sowohl Träger des AGT 235T/T-Genotyps als auch des AT<sub>2</sub>R A-Allels waren, besaßen eine signifikant größere LVM als Nicht-Träger dieser Kombination, obwohl jeder allein keine signifikante Assoziation mit der LVM gezeigt hatte. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass der AGT 235T/T-Genotyp mit einer um 15-40% höheren Plasma-AGT-Konzentration assoziiert zu sein scheint als der M/M-Genotyp (Jeunemaitre et al., 1992; Sethi et al., 2003). Dies könnte eine höhere AngII-Bildung bei den T/T-Trägern verursachen. Eine Erhöhung der Plasma-AngII-Konzentration wird jedoch teilweise kompensiert durch eine Reduktion der Renin-Freisetzung (Danser, 2003), d.h. die Konzentrationsunterschiede zwischen den AGT 235-Genotypen könnten möglicherweise nicht ausreichen, um eine signifikante Vergrößerung der LVM zu induzieren. Das A-Allel des X-chromosomalen AT<sub>2</sub>R, der im Gegensatz zum AngII-Rezeptor TypI (AT<sub>1</sub>R) einer hypertrophischen Antwort der Kardiomyozyten entgegenwirkt, ist anscheinend mit einem geringeren AT<sub>2</sub>R-Spiegel assoziiert als das G-Allel (Warnecke et al., 2005). Bei Trägern des A-Allels könnte somit die antihypertrophische Wirkung etwas schwächer ausfallen als bei Trägern des G-Allels. Die Synergie der Effekte von AGT 235T/T und AT<sub>2</sub>R A könnte dann einen signifikanten Effekt auf die LVM der Träger auslösen.

Ähnliches haben wir bei der Kombination des AGT 235M/M- mit dem CYP11B2 C/C-Genotyp beobachtet: der -344C/T-Polymorphismus der Aldosteron-Synthase zeigte bereits isoliert betrachtet einen signifikanten Zusammenhang mit der LVM. Probanden mit dem C/C-Genotyp hatten eine signifikant kleinere LVM als Träger von mindestens einem T-Allel. Durch die Kombination mit dem AGT 235M/M-Genotyp wurde dieser Zusammenhang zusätzlich verstärkt. Das AGT 235M-Allel ist laut Literatur mit einer geringeren AGT-Konzentration assoziiert (Jeunemaitre et al., 1992). Die daraus resultierende geringere AngII-Konzentration zusammen mit der geringeren Aldosteron-Konzentration beim CYP11B2 C/C-Genotyp könnte zu einer stärkeren Abschwächung der hypertrophischen Antwort und somit zu einer kleineren LVM bei Trägern der Kombination führen, als bei Trägern des CYP11B2 C/C-Genotyps alleine.

In der Literatur sind vereinzelte Daten über synergistische Effekte der RAAS-Polymorphismen auf die LVM beschrieben. Bemerkenswerterweise wurden solche Effekte von Diet et al. (2001) ebenfalls bei einer Gruppe von männlichen Ausdauerathleten in Hinblick auf den AGT M235T- und den ACE I/D-Polymorphismus beobachtet. So zeigten Athleten, die sowohl homozygot für das ACE D- als auch für das

AGT T-Allel waren eine signifikant größere LVM als Nicht-Träger der Kombination, wobei beide Polymorphismen für sich betrachtet keinen signifikanten Einfluss hatten. Gumprecht et al. (2002) berichteten bei Patienten mit Typ2 Diabetes eine mögliche Interaktion zwischen ACE und CMA, die beide für die Umwandlung von AngI in AngII verantwortlich sind. Nur die Kombination der Genotypen ACE D/D und CMA A/A zeigte einen signifikanten Zusammenhang mit der LVM der Probanden. In unserer Studie konnte allerdings keiner dieser Zusammenhänge beobachtet werden.

Auch bei den drei Komponenten des IGF1-Signalwegs, IGF1, IGF1-Rezeptor und Myostatin (GDF8), die bereits für sich alleine einen signifikanten Zusammenhang mit der LVM bei den von uns untersuchten männlichen Ausdauersportlern gezeigt hatten, wurden zusätzliche synergistische Effekte beobachtet (Tab.5.3): die Effekte der beiden Polymorphismen IGF1(CA)<sub>n</sub> und IGF1R 3174G/A wurden in Kombination mit dem GDF8 IVS1+88\_90delA-Polymorphismus deutlich verstärkt. Die Genotyp-Kombinationen IGF1 19/19 mit GDF8 A/- bzw. IGF1R G/G mit GDF8 A/- waren mit deutlich kleineren LVM-Werten assoziiert als jeder Genotyp für sich allein. Überraschenderweise zeigten die beiden Polymorphismen im IGF1- und im IGF1R-Gen in Kombination miteinander keine Verstärkung des Effekts. Dies könnte damit zusammenhängen, dass IGF1 und sein Rezeptor (IGF1R) in einem negativen Feedback-Mechanismus miteinander in Beziehung stehen (s. 5.2.2).

Unsere Ergebnisse sind ein weiterer Hinweis darauf, dass die drei Komponenten IGF1, IGF1R und Myostatin tatsächlich in einem Signalweg miteinander interagieren. Weitere Studien über synergistische Effekte zwischen diesen Loci sind uns nicht bekannt.

Wir konnten aber nicht nur eine Synergie zwischen den Komponenten, die zu ein und demselben Signalweg gehören, beobachten. Überraschenderweise zeigten auch Kombinationen von Polymorphismen unabhängig vom Signalweg eine Interaktion (Tab.5.3). Dies gilt z.B. für die Polymorphismen des IGF1-Signalwegs in Kombination mit verschiedenen RAAS-Polymorphismen: die Kombination des bereits signifikanten IGF1R A/A-Genotyps sowohl mit dem AGT 174T/T-, als auch dem ACE D/D-Genotyp, die für sich genommen keinen signifikanten Zusammenhang mit der LVM gezeigt hatten, war mit deutlich größeren LVM-Werten assoziiert als der IGF1R A/A-Genotyp alleine.

Auf der anderen Seite fanden wir bei Trägern des CYP11B2 C/C-Genotyps in Kombination mit den Genotypen GDF8 A/- bzw. IGF1 19/19 deutlich kleinere LVM-Werte als bei männlichen Ausdauersportlern, die nur einen dieser Genotypen trugen.

Unsere Ergebnisse liefern weitere Hinweise auf den bereits diskutierten „cross-talk“ zwischen dem RAAS und dem IGF1-Signalweg (s. 5.2.2).

Diese Interaktion zwischen den beiden Signalwegen könnte eine Erklärung dafür sein, dass die Genotypen AGT 174T/T und ACE D/D, die sowohl mit einer höheren AGT- als auch ACE-Konzentration assoziiert sind und somit eine etwas höhere AngII bedingen könnten, die Effekte des A/A-Genotyps im IGF1-Rezeptor zu verstärken scheinen. In früheren Arbeiten wurde für die beiden Genotypen AGT 174T/T und ACE D/D alleine bereits eine Assoziation mit einer größeren LVM beobachtet (Hernández et al., 2003; Montgomery et al., 1997; Wong et al., 1996...)

Auch zwischen Aldosteron und dem IGF1-Signalweg gibt es anscheinend eine direkte Verbindung: die Arbeitsgruppe von Bunda et al. (2007) konnte zeigen, dass Aldosteron die Elastin-Produktion in Herz-Fibroblasten durch Aktivierung des IGF1-Rezeptors in einer Mineralocorticoid-Rezeptor (MR)-unabhängigen Weise induziert. Der Mechanismus ist allerdings noch nicht vollständig geklärt. Dies könnte möglicherweise erklären, warum die Polymorphismen im IGF1- und im GDF8-Gen in Kombination mit dem Polymorphismus im Gen der Aldosteron-Synthase einen stärkeren Effekt auf die LVM bei den männlichen Ausdauersportlern ausüben, als einzeln.

Zusätzlich zeigten bei unseren Untersuchungen auch IGF1-Rezeptor und Troponin T (TNNT2) eine Interaktion: männliche Sportler, die die Kombination IGF1R A/A und TNNT2 D/D besaßen, zeigten ebenfalls eine deutlich größere LVM als Probanden, die nur den IGF1R A/A-Genotyp trugen. Eine direkte Verbindung mit dem Troponin T-Lokus ist bisher nicht bekannt. Da jedoch der IGF1-Signalweg die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration beeinflusst und der Troponin-Komplex calcium-sensitiv ist, könnten sich auch Polymorphismen in den beiden Komponenten IGF1R und Troponin T gegenseitig in ihrer Wirkung verstärken. Darüber hinaus wird vermutet, dass IGF1 an der Induktion der Expression kontraktile Proteine im Herzen, z.B. von Troponin I, beteiligt ist (Ito et al., 1993). Unsere Ergebnisse unterstützen frühere Beobachtungen, dass der TNNT2 D/D-Genotyp ein „pro-LVH-Modifizierer“ sein könnte (Garcia-Castro et al., 2007; Komamura et al., 2004), allerdings in Hinblick auf eine physiologische Herzhypertrophie. Der 5bpI/D-Polymorphismus in Intron 3 des TNNT2-Gens beeinflusst anscheinend den Spleißvorgang, wobei das D-Allel ein Überspringen von

Exon4 zu verursachen scheint (Farza et al., 1998). Interessanterweise wird Exon4 auch bei den beiden Isoformen cTnT2 und cTnT4 des kardialen Troponin T herausgespleißt, wobei die Expression von cTnT4 bei Patienten mit einer Herzinsuffizienz erhöht ist (Anderson et al., 1995; Gomes et al., 2002). D.h. der D/D-Genotyp könnte mit den beiden Isoformen cTnT2 und cTnT4 im Myokard assoziiert sein. Dies müsste allerdings durch weitere Studien z.B. an Herzmuskel-Biopsien überprüft werden.

Allgemein unterstützen unsere Ergebnisse die Annahme, dass die untersuchten Komponenten in einem großen Netzwerk miteinander in Wechselwirkung stehen und sich die Effekte der Polymorphismen gegenseitig verstärken, eventuell auch abschwächen können. Auf diese Weise können sich sogar Polymorphismen, die für sich alleine genommen keinen messbaren Einfluss auf die hypertrophische Kardiomyozyten-Antwort haben, in Kombination doch signifikant auf das Maß der trainingsinduzierten Herzhypertrophie auswirken. Auf der anderen Seite kann der signifikante Einfluss einzelner Polymorphismen durch Kombination mit anderen noch verstärkt werden (Tab.5.3).

**Tab.5.3:** Signifikante synergistische Effekte (MW  $\pm$ SD/SE) der Genotyp-Kombinationen auf die LVM der männlichen Ausdauersportler (inkl. p-Werte).

Effekte der einzelnen Genotypen auf die LVM [g/m <sup>2</sup> ]						Effekt der Genotyp-Kombination auf die LVM [g/m <sup>2</sup> ]	p
Genotyp1	Effekt	p	Genotyp2	Effekt	p		
<b>RAAS-Polymorphismen</b>							
AGT 235T/T	Ø	0,8	AT2R A	Ø	0,8	+12,7 $\pm$ 18/5	0,03
AGT235M/M	Ø	0,8	CYP11B2 C/C	-10,7 $\pm$ 19/4	0,02	-19,7 $\pm$ 16/6	0,001
<b>Polymorphismen im IGF1-Signalweg</b>							
IGF1 19/19	-16,4 $\pm$ 16/5	0,003	GDF8 A/-	-10,3 $\pm$ 16/4	0,015	-16,6 $\pm$ 19/5	0,003
IGF1R G/G	-12,8 $\pm$ 19/5	0,01	"			-15,2 $\pm$ 19/6	0,01
<b>unabhängig vom Signalweg</b>							
IGF1R A/A	+12,8 $\pm$ 19/5	0,01	AGT 174T/T	Ø	0,7	+13,8 $\pm$ 19/5	0,004
"			ACE D/D	Ø	0,4	+15,6 $\pm$ 18/6	0,01
"			TNNT2 D/D	Ø	0,7	+16,5 $\pm$ 23/7	0,03
CYP11B2 C/C	-10,7 $\pm$ 19/4	0,02	GDF8 A/-	-10,3 $\pm$ 16/4	0,015	-15,8 $\pm$ 19/5	0,005
"			IGF1 19/19	-16,4 $\pm$ 16/5	0,003	-20,8 $\pm$ 19/7	0,003

Die Einzeleffekte beziehen sich auf die Unterschiede zu den jeweils entgegengesetzten Homozygoten, bzw. im Fall des GDF8-Polymorphismus auf den Unterschied zu den A/A-Homozygoten. Die Effekte der Kombinationen beziehen sich auf den Vergleich zu den Nicht-Trägern der jeweiligen Genotyp-Kombination.



## 5.4 Kritische Aspekte der Arbeit

### 5.4.1 Methodik

#### 5.4.1.1 Gemeinsame Analyse der Trinukleotidpolymorphismen im Androgen-Rezeptor-Gen

Innerhalb dieser Studie wurden die beiden Trinukleotid-Polymorphismen, (CAG)<sub>n</sub> und (GGC)<sub>n</sub>, im Gen des Androgen-Rezeptors durch Fragmentlängenbestimmung mittels Kapillarelektrophorese untersucht. Die Etablierung der Methode des (GGC)<sub>n</sub>-Repeats brachte einige Schwierigkeiten mit sich: aufgrund des hohen GC-Gehalts innerhalb der Repeat-Region erwies sich die Verwendung einer herkömmlichen Taq-DNA-Polymerase und normaler dNTPs als unzureichend, es erfolgte keine verwertbare Amplifikation. Der Einsatz einer Thermo-Start Taq, inkl. eines 15min Denaturierungsvorlaufs, sowie von 7-Deaza-Guanosin-Triphosphat anstatt dGTP bei der PCR-Reaktion ermöglichte die erfolgreiche Amplifikation des Fragments. Durch den verlängerten Denaturierungsschritt und den Einsatz des veränderten Nukleotids, das statt einer Dreifachbindung zu seiner komplementären Base Cytosin lediglich eine Zweifachbindung eingeht, konnten die sterischen Gegebenheiten bei der PCR-Reaktion deutlich verbessert werden. Die getrennte Fragmentlängenbestimmung der beiden Polymorphismen (CAG)<sub>n</sub> und (GGC)<sub>n</sub> funktionierte danach sehr gut. Aus Kosten- und Zeitgründen sollten die beiden unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Fragmente jedoch in einem Lauf zusammen analysiert werden. Da bereits nach wenigen Stunden, sowohl quantitativ als auch qualitativ, eine deutliche Verschlechterung des Fluoreszenzsignals auftrat, erwies sich dies als schwierig. Mit Hilfe eines Experiments, mit dem sowohl der Einfluss der Zeit, als auch der der Temperatur überprüft werden sollte, konnte nachgewiesen werden, dass bereits nach 3h bei Raumtemperatur die Signale deutlich an Intensität und auch an Qualität verlieren. Dieser Effekt konnte durch eine Kühlung der Proben bei 4-8°C deutlich reduziert werden. Anscheinend kommt es dadurch, dass die beiden Repeatstrukturen (CAG)<sub>n</sub> und (GGC)<sub>n</sub> Ähnlichkeit in ihrer Basenzusammensetzung besitzen, zu Wechselwirkungen und zu Überlagerungen der Einzelstränge, wenn sie nach der Denaturierung in einem Reaktionsgefäß interagieren können. Um die Einzelsträngigkeit länger zu erhalten, sollten die Proben möglichst bis zum Zeitpunkt ihrer Analyse gekühlt werden, was allerdings eine Analyse einer großen Anzahl von Proben über Nacht auf dem vorhandenen Einkapillargerät erschwert.

Deshalb müssen bei diesen Analysen die beiden Faktoren Zeit- und Kostenersparnis gegeneinander abgewogen werden.

#### 5.4.1.2 Probleme der DHPLC-Analyse

Die denaturierende Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (DHPLC) ist ein Verfahren zur Detektion von Sequenzveränderungen in DNA-Fragmenten mit einer Sensitivität bis zu 100% (Dornia, 2006) und hohem Probendurchsatz. Das Verfahren basiert auf einer temperaturmodulierten Heteroduplexanalyse, bei der Punktmutationen und kleinere Deletionen bzw. Insertionen aufgrund der durch sie veränderten Schmelz- und Elutionseigenschaften der mutationstragenden Fragmente in der Chromatographie nachgewiesen werden können. Sie wird zur Suche sowohl bekannter als auch unbekannter Mutationen und Polymorphismen benutzt.

Auch ein Großteil unserer Polymorphismen, sowie die vollständigen Exonsequenzen (inkl. Exon/Intron-Übergänge) von GDF8 und BNP, wurden mittels DHPLC-Analyse an einem WAVE MD-Gerät der Firma Transgenomic untersucht. Wichtige Voraussetzungen für eine zuverlässige Analyse sind:

- die Qualität des PCR-Produkts: jedes unspezifische Nebenprodukt bzw. Primerdimere würden als störender Faktor im Chromatogramm erscheinen
- die Quantität des PCR-Produkts: diese liegt bei mindestens 20ng/µl; bei zu schwacher Konzentration kann die Auswertung durch störende Hintergrundpeaks bzw. aufgrund eines zu schwachen Signals beeinträchtigt werden
- die Auswahl der richtigen Analysetemperatur: diese ermöglicht erst eine erkennbare Auftrennung der Homo- und Heteroduplices

Die Amplifikation der Fragmente erfolgte in dieser Studie mit herkömmlichen Taq-Polymerasen ohne zusätzliche „Proofreading“-Funktion, da sich die Verwendung anderer Polymerase-Systeme (z.B. die Optimase von Transgenomic) als nicht effizient und zu kostenintensiv herausgestellt hat. Bei den herkömmlichen Taq-DNA-Polymerasen kommt es immer wieder zum fehlerhaften Einbau von Nukleotiden (Fehlerrate von  $2 \times 10^{-4}$ /Base). Deshalb trat bei der DHPLC-Analyse unserer PCR-Produkte immer ein kleiner „Vorpeak“ auf, der die fehlerhaften PCR-Produkte enthielt. Dieser konnte allerdings zuverlässig von dem jeweiligen Heteroduplex-Peak unterschieden werden.

Die Sensitivität der DHPLC-Analyse ist stark abhängig von der Temperatur, bei der das mutationstragende PCR-Fragment analysiert wird. Die Ermittlung einer geeigneten Analysetemperatur erfolgte mit Hilfe der Navigator-Software der Firma Transgenomic. Die Analysetemperatur ist abhängig von der Länge des PCR-Fragments, sowie vor allem vom GC-Gehalt. Aufgrund der zusätzlichen Wasserstoffbrücken der GC-Basenpaare schmelzen GC-reiche Sequenzen bekanntermaßen bei höheren Temperaturen. Mit Hilfe des Schmelzprofils, anhand dessen die Lage der spezifischen Schmelzdomänen des Fragments bestimmt werden kann, wurde überprüft, ob alle Bereiche des zu untersuchenden Fragments optimal aufgeschmolzen wurden. Bei der Etablierung der Methode wurden die Fragmente außer bei der vorgeschlagenen Temperatur auch bei  $\pm 1^\circ\text{C}$  analysiert. Diejenige Temperatur, bei der die beste Auftrennung erfolgte, wurde als Analysetemperatur beibehalten.

Ein Nachteil der DHPLC-Analyse besteht darin, dass die Basenfolge nicht direkt ermittelt wird. So kann eine homozygote Mutation vom Wildtyp, die beide als 1 Peak im Chromatogramm erscheinen, anhand ihrer Retentionszeiten kaum bzw. nicht unterschieden werden. Deshalb kann man bei homozygoten Probanden keine Aussage darüber treffen, um welchen homozygoten Genotyp es sich handelt. Auch bei Vorliegen von unterschiedlichen Sequenzveränderungen innerhalb eines Fragments kann anhand des Chromatogramms oft lediglich die Aussage getroffen werden, dass es sich um einen heterozygoten Probanden handelt. Aus diesem Grund müssen am Anfang der Etablierung einer Methode sowohl der Wildtyp, aber auch alle auffälligen Befunde sequenziert werden. Um den Genotyp sicher zu detektieren, muss man dann jede Probe mit dem Wildtyp, und, wenn erforderlich, mit der homozygoten bzw. heterozygoten Mutation im Verhältnis 1:1 mischen und durch Denaturierung und Renaturierung die Ausbildung von Homo- und Heteroduplexstrukturen herbeiführen. Dies erfordert zwar mindestens zwei Analysen pro Proband (ungemischt und gemischt mit dem Wildtyp), ist aber immer noch deutlich kostengünstiger und schneller durchführbar als die Direktsequenzierung der Fragmente.

#### ***5.4.2 Grenzen der Studie***

Eine Einschränkung dieser Arbeit besteht darin, dass genetische Assoziationstudien eher eine Hypothese als einen Beweis für einen biologischen Effekt liefern (Hernandez et al., 2003). Oft ist überhaupt noch nicht geklärt, ob bestimmte Polymorphismen selbst eine funktionelle Relevanz haben, obwohl sich signifikante Zusammenhänge mit

phänotypischen Unterschieden zeigen. In solchen Fällen müssen Assoziationen oder Kopplungsungleichgewichte mit anderen polymorphen Genen in Betracht gezogen werden.

Unsere Ergebnisse zeigten einen signifikanten Zusammenhang zwischen bestimmten Polymorphismen in Hypertrophie-relevanten Genen und einer größeren oder kleineren LVM bei den männlichen Sportlern, während der Zusammenhang mit dem relativen Herzvolumen zwar in die gleiche Richtung ging aber nicht signifikant war ( $p > 0,1$ ). Eine Assoziation mit dem Herzvolumen war lediglich bei den weiblichen Sportlern und auch hier nur bezüglich zweier Polymorphismen zu erkennen, während der Zusammenhang mit der LVM nicht signifikant war. Diese Diskrepanz zeigte sich auch darin, dass LVM und Herzvolumen in unserer gesamten Population eine Korrelation von  $r^2 = 0,43$  aufwiesen (Abb.4.23). Beeinflusst wird dieser Wert offenbar dadurch, dass die einzelnen Faktoren der morphologischen Anpassung des Herzens eine gewisse Unabhängigkeit voneinander besitzen. Die Diskrepanz zwischen Männern und Frauen dürfte zusätzlich durch den Fehler der kleinen Zahl, den Bezug des Herzvolumens auf das Körpergewicht und durch endokrinologische Faktoren beeinflusst werden.

Die vorliegende Arbeit war insbesondere wegen der relativ geringen Zahl von Hochleistungssportlern, die aufgrund ihrer Ausdauerleistung für eine Sportherzuntersuchung überhaupt in Frage kamen, sowie wegen der zeit- und kostenaufwendigen kardiologischen Untersuchungen in der Fallzahl limitiert. Sie war auf die vom Institut für Sport- und Präventivmedizin betreuten bzw. vermittelten Sportler begrenzt. Trotzdem hat diese Pilotstudie wichtige Ergebnisse geliefert, die allerdings an einer größeren Fallzahl überprüft werden sollten.

Wünschenswert wäre, dass der Einfluss der Polymorphismen auf die Entwicklung und nicht nur auf das Vorliegen eines Sportherzens überprüft werden könnte. Denn es handelt sich bei unseren Untersuchungen um eine Querschnittstudie, nicht um Ergebnisse einer Verlaufsstudie. Alle Probanden sind nur zu einem Zeitpunkt erfasst. Es liegen keine Informationen über die Herzgröße unserer Ausdauersportler im Kindesalter bzw. bevor sie mit dem regelmäßigen, intensiven Ausdauertraining begonnen haben, vor. Da beispielsweise sowohl IGF1 als auch Myostatin neben der hypertrophischen Antwort der Kardiomyozyten beim adulten Herzen auch die Kardiomyozyten-Proliferation während der Herzentwicklung beeinflussen, bleibt unklar, ob die Polymorphismen bereits während der Entwicklung die basale LVM beeinflusst haben,

oder ob sie auf die trainingsinduzierte Vergrößerung der LVM eingewirkt haben, oder ob beides erfolgt ist.

Aufgrund der Unzumutbarkeit einer Herzbiopsie bei unseren Probanden, liegen uns keine Angaben darüber vor, wie sich die untersuchten Polymorphismen auf Translationsebene, d.h. auf die kardiale Konzentration der von den Genen kodierten Proteine auswirken. Die Konzentrationen im Serum können die lokalen Konzentrationen im Myokard nicht widerspiegeln; deshalb wurde auf eine Bestimmung der Serum-Spiegel verzichtet. Außerdem waren viele Blutproben aufgrund der Asservierung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bzw.  $-80^{\circ}\text{C}$  sehr hämolytisch, so dass eine Isolierung des Serums zu keinen aussagekräftigen Ergebnissen geführt hätte.

Eine weitere Einschränkung der in dieser Arbeit berichteten Ergebnisse liegt in der großen Anzahl an statistischen Tests („multiples Testen“) und der damit verbundenen Irrtumswahrscheinlichkeiten bei multiplen Signifikanztests. In der Regel werden in der biomedizinischen Forschung statistische Signifikanztests verwendet um Zusammenhänge bzw. Effekte nachzuweisen. Das Ergebnis wird in Form von p-Werten angegeben. Ist p kleiner als das vorgegebene Signifikanzniveau  $\alpha$  (hier:  $\alpha = 0,05$ ), so wird die Null-Hypothese, d.h. die Annahme dass kein Effekt vorliegt, verworfen. Das vorgegebene Signifikanzniveau  $\alpha$  begrenzt dabei die Wahrscheinlichkeit, beim Ablehnen der Nullhypothese eine falsche Entscheidung zu treffen. Die Begrenzung der Irrtumswahrscheinlichkeit auf höchstens  $\alpha$  gilt allerdings nur beim Testen *einer* Hypothese mit Hilfe nur *eines* Signifikanztests. Werden zur Untersuchung einer Fragestellung mehrere Tests durchgeführt, so wird zwar für jeden einzelnen Test die individuelle Irrtumswahrscheinlichkeit kontrolliert, die versuchsbezogene Irrtumswahrscheinlichkeit für das gesamte Modell ist jedoch größer als  $\alpha$ . Dies erhöht die Möglichkeit, einen „falsch signifikanten“ Zusammenhang zwischen zwei Variablen, in dieser Studie Genotyp und LVM bzw. relatives Herzvolumen, zu finden. Da es sich in diesem Fall um abhängige Tests handelt (Signifikanztests bezüglich mehrerer Zielvariablen der gleichen Stichprobe), kann man die einzelnen p-Werte mit der Anzahl der durchgeführten Tests  $k$  multiplizieren, um für multiples Testen adjustierte p-Werte zu erhalten (nach Bender et al., 2002). Dies würde bei unseren Untersuchungen bei einer großen Anzahl untersuchter Polymorphismen zu sehr großen p-Werten führen, d.h. Signifikanz würde selten erreicht werden. Um diese Fehlerquelle möglichst klein zu halten, wurden in dieser Studie die interessierenden Polymorphismen nicht zufällig ausgewählt, wie beispielsweise bei Analysen mit Microarrays, sondern nur solche Gene

---

untersucht, deren Genprodukte bekanntermaßen in regulatorischen Signalketten bzw. Netzwerken einen Einfluss auf die Herzfunktion- und/oder -struktur haben.

### 5.5 Ausblick

In dieser Pilotstudie wurde an einer begrenzten Fallzahl (n=137) getestet, ob es Zusammenhänge zwischen bestimmten Polymorphismen in Hypertrophie-assoziierten Signalwegen und einer Herzhypertrophie bei Ausdauersportlern gibt. Um diese Zusammenhänge, vor allem in Hinblick auf die interessanten Geschlechtsunterschiede, genauer zu definieren, müssen die bei männlichen Ausdauersportlern bereits signifikanten Ergebnisse der Polymorphismen CYP11B2 -344C/T, IGF1(CA)n-Repeat, IGF1R 3174G/A und GDF8 IVS1+88\_90delA bei weiblichen Ausdauersportlern an einer wesentlich größeren Gruppe nochmals überprüft werden. Dies könnte Aufschluss darüber geben, ob sich die unterschiedlichen Ergebnisse bei der männlichen und weiblichen Sportlergruppe lediglich auf eine zu kleine Fallzahl zurückführen, oder ob sie sich bestätigen lassen und worauf sie zurückzuführen sein könnten. Als Arbeitshypothese bieten sich bekannte Einflüsse von Sexualhormonen und deren Rezeptoren auf die untersuchten Signalwege an.

Ein wesentlich vergrößertes Untersuchungskollektiv würde auch eine Überprüfung von Polymorphismen-Kombinationen von mehr als zwei Polymorphismen erlauben. Dies könnte weiteren Aufschluss über synergistische oder auch antagonistische Zusammenhänge zwischen den genetischen Komponenten geben.

Unser besonderes Interesse liegt in der Aufklärung der funktionellen Relevanz des IVS1+88\_90delA-Polymorphismus im Myostatin-Gen (GDF8). Diese bisher in der Literatur nicht beachtete Sequenzveränderung inmitten eines Introns scheint trotz ihrer Lage den hemmenden Einfluss des Myostatins auf eine Herzvergrößerung zu verstärken. Um zu überprüfen, ob durch den Polymorphismus tatsächlich die Transkriptions- bzw. Translations-Aktivität des GDF8-Gens beeinflusst wird, könnte mithilfe von Expressionsstudien eine funktionelle Relevanz des GDF8 IVS1+88\_90delA-Polymorphismus überprüft werden. Wichtig wäre auch zu klären, welchen Einfluss dieser Polymorphismus auf die Skelettmuskulatur hat.

Die vorgelegte Querschnittsstudie vergleicht die untersuchten Polymorphismen mit dem Zustand der Herzen der Sportler zum Zeitpunkt der Untersuchung und liefert keinen endgültigen Beweis, dass die Polymorphismen tatsächlich die Sportherzentwicklung beeinflussen. Idealerweise sollte hierfür eine Gruppe untrainierter Personen ein

---

ausreichend intensives Ausdauertraining absolvieren, wobei die Sporthertzentwicklung durch Dokumentation der echokardiographischen Daten sowohl vor Beginn als auch nach Abschluss des Trainings bestimmt werden sollte. Die Größen- und Massenzunahme der Herzen der Probanden könnte dann mit den in dieser Studie untersuchten Polymorphismen statistisch in Zusammenhang gebracht und der Einfluss der Polymorphismen auf die Sporthertzentwicklung geklärt werden.

Unabhängig von der physiologischen Sporthertzentwicklung sollten alle hier erwähnten Polymorphismen, evtl. auch weitere, auf einen Zusammenhang mit einer pathologischen Myokardhypertrophie, wie z.B. der hypertrophen Kardiomyopathie (HCM) untersucht werden. Wie bereits in der Literatur vermutet, und durch unsere Ergebnisse unterstützt, haben die verschiedenen Hypertrophie-assoziierten Signalwege, wie z.B. das RAAS oder der IGF1-Signalweg, unterschiedlich starken Einfluss auf eine physiologische und auf eine pathologische Hypertrophie. Um in Zukunft anhand eines genetischen Profils eine beginnende physiologische Herzvergrößerung von einer beginnenden pathologischen besser abzugrenzen, evtl. sogar voraussagen zu können, müsste deshalb auch der Einfluss der Polymorphismen auf eine pathologische Hypertrophie geklärt werden.

---

## 6. Literaturverzeichnis

1. **Adams JW, Sakata Y, Davis MG, Sah VP, Wang Y, Liggett SB, Chien KR, Brown JH, Dorn GW 2<sup>nd</sup> (1998)** Enhanced Gαq signaling: a common pathway mediates cardiac hypertrophy and apoptotic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:10140-10145.
2. **Alfakih K, Maqbool A, Sivananthan M, Walters K, Bainbridge G, Ridgway J, Balmforth AJ, Hall AS (2004)** Left ventricle mass index and the common, functional, X-linked angiotensin II type-2 receptor gene polymorphism (-1332 G/A) in patients with systemic hypertension. *Hypertension* 43:1189-1194.
3. **Allen NE, Davey GK, Key TJ, Zhang S, Narod SA (2002)** Serum insulin-like growth factor I (IGF-I) concentration in men is not associated with the cytosine-adenosine repeat polymorphism of the IGF-I gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11:319-320.
4. **Amant C, Hamon M, Bauters C, Richard F, Helbecque N, McFadden EP, Escudero X, Lablanche JM, Amouyel P, Bertrand ME (1997)** The angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism is associated with coronary artery vasoconstriction. *J Am Coll Cardiol* 29:486-490.
5. **Anderson PA, Greig A, Mark TM, Malouf NN, Oakeley AE, Ungerleider RM, Allen PD, Kay BK (1995)** Molecular basis of human cardiac troponin T isoforms expressed in the developing, adult, and failing heart. *Circ Res* 76:681-686.
6. **Artaza JN, Reisz-Porszasz S, Dow JS, Kloner RA, Tsao J, Bhasin S, Gonzalez-Cadavid NF (2007)** Alterations in myostatin expression are associated with changes in cardiac left ventricular mass but not ejection fraction in the mouse. *J Endocrinol* 194:63-76.
7. **Babiker FA, De Windt LJ, van Eickels M, Grohe C, Meyer R, Doevendans PA (2002)** Estrogenic hormone action in the heart: regulatory network and function. *Cardiovasc Res* 53:709-719.
8. **Balogh A, Derzbach L, Vannay A, Vászárhelyi B (2006)** Lack of association between insulin-like growth factor I receptor G+3174A polymorphism and retinopathy of prematurity. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 244: 1035–1038.
9. **Barbato A, Russo P, Siani A, Folkerd EJ, Miller MA, Venezia A, Grimaldi C, Strazzullo P, Cappuccio FP (2004)** Aldosterone synthase gene (CYP11B2) C-344T polymorphism, plasma aldosterone, renin activity and blood pressure in a multi-ethnic population. *J Hypertens* 22:1895-1901.
10. **Bender R, Lange St, Ziegler A (2002)** Multiples Testen. *Dtsch Med Wochenschr* 127:T4-T7.
11. **Binnie MC, Alexander FE, Heald C, Habib FK (2005)** Polymorphic forms of prostate specific antigen and their interaction with androgen receptor trinucleotide repeats in prostate cancer. *Prostate* 63:309-315.



12. **Bisognano JD, Weinberger HD, Bohlmeier TJ, Pende A, Reynolds MV, Sastravaha A, Roden R, Asano K, Blaxall BC, Wu SC, Communal C, Singh K, Colucci W, Bristow MR, Port DJ (2000)** Myocardial-directed overexpression of the human beta(1)-adrenergic receptor in transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol* 32:817-830.
13. **Bleumink GS, Schut AF, Sturkenboom MC, Deckers JW, van Duijn CM, Stricker BH (2004)** Genetic polymorphisms and heart failure. *Genet Med* 6:465-474.
14. **Bleumink GS, Schut AF, Sturkenboom MC, Janssen JA, Witteman JC, van Duijn CM, Hofman A, Stricker BH (2005)** A promoter polymorphism of the insulin-like growth factor-I gene is associated with left ventricular hypertrophy. *Heart* 91:239-240.
15. **Bonafè M, Barbieri M, Marchegiani F, Olivieri F, Ragno E, Giampieri C, Mugianesi E, Centurelli M, Franceschi C, Paolisso G (2003)** Polymorphic variants of insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor and phosphoinositide 3-kinase genes affect IGF-I plasma levels and human longevity: cues for an evolutionarily conserved mechanism of life span control. *J Clin Endocrinol Metab* 88:3299-3304.
16. **Booz GW (2004)** Cardiac Angiotensin AT2 receptor. What exactly does it do? *Hypertension* 43:1162-1163.
17. **Braun A, Kammerer S, Böhme E, Müller B, Roscher AA (1995)** Identification of polymorphic sites of the human bradykinin B2 receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 211:234-240.
18. **Brink M, Chrast J, Price SR, Mitch WE, Delafontaine P (1999)** Angiotensin II stimulates gene expression of cardiac insulin-like growth factor I and its receptor through effects on blood pressure and food intake. *Hypertension* 34:1053-1059.
19. **Bruck H, Leineweber K, Temme T, Weber M, Heusch G, Philipp T, Brodde OE (2005)** The Arg389Gly beta1-adrenoceptor polymorphism and catecholamine effects on plasma-renin activity. *J Am Coll Cardiol* 46:2111-2115.
20. **Brull D, Dhamrait S, Myerson S, Erdmann J, Woods D, World M, Pennell D, Humphries S, Regitz-Zagrosek V, Montgomery H (2001)** Bradykinin B2BKR receptor polymorphism and left-ventricular growth response. *Lancet* 358:1155-1156.
21. **Bunda S, Liu P, Wang Y, Liu K, Hinek A (2007)** Aldosterone Induces Elastin Production in Cardiac Fibroblasts through Activation of Insulin-Like Growth Factor-I Receptors in a Mineralocorticoid Receptor-Independent Manner. *Am J Pathol* 171:809-819.
22. **Burnett JC Jr, Olson TM (2007)** Natriuretic peptides and myocardial structure: insights from population genetics. *Hypertension* 49:765-766.
23. **Campbell SE, Farb A, Weber KT (1993)** Pathologic remodeling of the myocardium in a weightlifter taking anabolic steroids. *Blood Press* 2:213-216.

- 
24. **Catalucci D, Latronico MV, Ellingsen O, Condorelli G (2008)** Physiological myocardial hypertrophy: how and why? *Front Biosci* 13:312-324.
  25. **Caulfield M, Lavender P, Farrall M, Munroe P, Lawson M, Turner P, Clark AJ (1994)** Linkage of the angiotensinogen gene to essential hypertension. *N Engl J Med* 330:1629-1633.
  26. **Chai W, Danser AH (2006)** Why are mineralocorticoid receptor antagonists cardioprotective? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 374:153-162.
  27. **Chai W, Hoedemaekers Y, van Schaik RH, van Fessem M, Garrelds IM, Saris J, Dooijes D, ten Cate FJ, Kofflard MM, Danser AH (2006)** Cardiac aldosterone in subjects with hypertrophic cardiomyopathy. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 7:225-230.
  28. **Chien KR, Knowlton KU, Zhu H, Chien S (1991)** Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. *FASEB J* 5:3037-3046.
  29. **Christ M, Eisen C, Aktas J, Theisen K, Wehling M (1993)** The inositol-1,4,5-trisphosphate system is involved in rapid effects of aldosterone in human mononuclear leukocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 77:1452-1457.
  30. **Christ M, Meyer C, Sippel K, Wehling M (1995)** Rapid aldosterone signaling in vascular smooth muscle cells: involvement of phospholipase C, diacylglycerol and protein kinase C alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 213:123-129.
  31. **Chung O, Stoll M, Unger T (1996)** Physiologic and pharmacologic implications of AT1 versus AT2 receptors. *Blood Press Suppl* 2:47-52.
  32. **Clyne CD, Zhang Y, Slutsker L, Mathis JM, White PC, Rainey WE (1997)** Angiotensin II and potassium regulate human CYP11B2 transcription through common cis-elements. *Mol Endocrinol* 11:638-649.
  33. **Cohn RD, Liang HY, Shetty R, Abraham T, Wagner KR (2007)** Myostatin does not regulate cardiac hypertrophy or fibrosis. *Neuromuscul Disord* 17:290-296.
  34. **Cook SA, Matsui T, Li L, Rosenzweig A (2002)** Transcriptional effects of chronic Akt activation in the heart. *J Biol Chem* 277:22528-22533.
  35. **Danser AH, van Kats JP, Admiraal PJ, Derkx FH, Lamers JM, Verdouw PD, Saxena PR, Schalekamp MA (1994)** Cardiac renin and angiotensins. Uptake from plasma versus in situ synthesis. *Hypertension* 24:37-48.
  36. **Danser AH, Schalekamp MA, Bax WA, van den Brink AM, Saxena PR, Riegger GA, Schunkert H (1995)** Angiotensin-converting enzyme in the human heart. Effect of the deletion/insertion polymorphism. *Circulation* 92:1387-1388.

- 
37. **Danser AH (2003)** Local renin-angiotensin systems: the unanswered questions. *Int J Biochem Cell Biol* 35:759-768.
  38. **Daughaday WH (2000)** Growth hormone axis overview--somatomedin hypothesis. *Pediatr Nephrol* 14:537-540.
  39. **Delafontaine P, Brink M (2000)** The growth hormone and insulin-like growth factor 1 axis in heart failure. *Ann Endocrinol (Paris)* 61:22-26.
  40. **Delles C, Erdmann J, Jacobi J, Hilgers KF, Fleck E, Regitz-Zagrosek V, Schmieder RE (2001)** Aldosterone synthase (CYP11B2) -344 C/T polymorphism is associated with left ventricular structure in human arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 37:878-884.
  41. **Delles C, Schmidt BM, Müller HJ, Oehmer S, Klingbeil AU, Schmieder RE (2003)** Functional relevance of aldosterone for the determination of left ventricular mass. *Am J Cardiol* 91:297-301.
  42. **Den Dunnen JT, Antonarakis E (2001)** Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet* 109:121-124.
  43. **Dhamrait SS, Payne JR, Li P, Jones A, Toor IS, Cooper JA, Hawe E, Palmen JM, Wootton PT, Miller GJ, Humphries SE, Montgomery HE (2003)** Variation in bradykinin receptor genes increases the cardiovascular risk associated with hypertension. *Eur Heart J* 24:1672-1680.
  44. **Dickhuth H-H, Hipp A, Niess A, Röcker K, Mayer F, Horstmann T (2001)** Differenzialdiagnostik der physiologischen Herzhypertrophie (Sportherz). *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* 52:205-210.
  45. **Diet F, Graf C, Mahnke N, Wassmer G, Predel HG, Palma-Hohmann I, Rost R, Böhm M (2001)** ACE and angiotensinogen gene genotypes and left ventricular mass in athletes. *Eur J Clin Invest* 31:836-842.
  46. **Ding D, Xu L, Menon M, Reddy GP, Barrack ER (2004)** Effect of a short CAG (glutamine) repeat on human androgen receptor function. *Prostate* 58:23-32.
  47. **Ding D, Xu L, Menon M, Reddy GP, Barrack ER (2005)** Effect of GGC (glycine) repeat length polymorphism in the human androgen receptor on androgen action. *Prostate* 62:133-139.
  48. **Dornia C (2006)** Detektion von Sequenzvarianten mittels DHPLC: Etablierung als automatisiertes Verfahren zur direkten Mutationsanalyse bei autosomal-rezessiver polyzystischer Nierenerkrankung. *Dissertation, Medizinischen Fakultät der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen*
  49. **Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, Chakraborty R (1992)** Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics* 12:241-253.
  50. **Engelhardt S, Merkle S (2006)** Physiologisches und pathologisches Myokardwachstum? *Schlaglicht BIOSpektrum* 12:165-167.

51. **Fan W, Yanase T, Morinaga H, Okabe T, Nomura M, Daitoku H, Fukamizu A, Kato S, Takayanagi R, Nawata H (2007)** Insulin-like growth factor 1/insulin signaling activates androgen signaling through direct interactions of Foxo1 with androgen receptor. *J Biol Chem* 282:7329-7338.
52. **Farza H, Townsend PJ, Carrier L, Barton PJ, Mesnard L, Bährend E, Forissier JF, Fiszman M, Yacoub MH, Schwartz K (1998)** Genomic organisation, alternative splicing and polymorphisms of the human cardiac troponin T gene. *J Mol Cell Cardiol* 30:1247-1253.
53. **Ferrell RE, Conte V, Lawrence EC, Roth SM, Hagberg JM, Hurley BF (1999)** Frequent sequence variation in the human myostatin (GDF8) gene as a marker for analysis of muscle-related phenotypes. *Genomics* 62:203-207.
54. **Fischer M, Baessler A, Schunkert H (2002)** Renin angiotensin system and gender differences in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 53:672-677.
55. **Force T, Michael A, Kilter H, Haq S (2002)** Stretch-activated pathways and left ventricular remodeling. *J Card Fail* 8:351-358.
56. **Frayling TM, Hattersley AT, McCarthy A, Holly J, Mitchell SM, Gloyn AL, Owen K, Davies D, Smith GD, Ben-Shlomo Y (2002)** A putative functional polymorphism in the IGF-I gene: association studies with type 2 diabetes, adult height, glucose tolerance, and fetal growth in U.K. populations. *Diabetes* 51:2313-2316.
57. **Freshour JR, Chase SE, Vikstrom KL (2002)** Gender differences in cardiac ACE expression are normalized in androgen-deprived male mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283:H1997-2003.
58. **Frey N, Olson EN (2003)** Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol* 65:45-79.
59. **Friedl W, Mair J, Pichler M, Paulweber B, Sandhofer F, Puschendorf B (1998)** Insertion/deletion polymorphism in the angiotensin-converting enzyme gene is associated with atrial natriuretic peptide activity after exercise. *Clin Chim Acta* 274:199-211.
60. **Fuller SJ, Mynett JR, Sugden PH (1992)** Stimulation of cardiac protein synthesis by insulin-like growth factors. *Biochem J* 282:85-90.
61. **Garcia J, Ahmadi A, Wonnacott A, Sutcliffe W, Nagga K, Soderkvist P, Marcusson J (2006)** Association of insulin-like growth factor-1 receptor polymorphism in dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 22:439-444.
62. **García-Castro M, Reguero JR, Morís C, Alonso-Montes C, Berrazueta JR, Sainz R, Alvarez V, Coto E (2007)** Prevalence and spectrum of mutations in the sarcomeric troponin T and I genes in a cohort of Spanish cardiac hypertrophy patients. *Int J Cardiol* 121:115-116.
63. **Gaussin V, Depre C (2005)** Myostatin, the cardiac chalone of insulin-like growth factor-1. *Cardiovasc Res* 68:347-349.

- 
64. **Geenen DL, Malhotra A, Buttrick PM (1996)** Angiotensin receptor 1 blockade does not prevent physiological cardiac hypertrophy in the adult rat. *J Appl Physiol* 81:816-821.
  65. **Gomes AV, Guzman G, Zhao J, Potter JD (2002)** Cardiac troponin T isoforms affect the Ca<sup>2+</sup> sensitivity and inhibition of force development. Insights into the role of troponin T isoforms in the heart. *J Biol Chem* 277:35341-35349.
  66. **Gomez-Sanchez EP, Ahmad N, Romero DG, Gomez-Sanchez CE (2004)** Origin of aldosterone in the rat heart. *Endocrinology* 145:4796-4802.
  67. **Gonzalez-Cadavid NF, Taylor WE, Yarasheski K, Sinha-Hikim I, Ma K, Ezzat S, Shen R, Lalani R, Asa S, Mamita M, Nair G, Arver S, Bhasin S (1998)** Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:14938-14943.
  68. **Grandi AM, Venco A, Barzizza F, Scalise F, Pantaleo P, Finardi G (1992)** Influence of age and sex on left ventricular anatomy and function in normals. *Cardiology* 81:8-13.
  69. **Gumprecht J, Zychma M, Grzeszczak W, Łacka B, Burak W, Mosur M, Kaczmarski J, Otulski I, Stokłosa T, Czank P (2002)** Angiotensin I-converting enzyme and chymase gene polymorphisms - relationship to left ventricular mass in type 2 diabetes patients. *Med Sci Monit* 8:CR603-606.
  70. **Hackenthal E, Paul M, Ganten D, Taugner R (1990)** Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev* 70:1067-1116
  71. **Haddad GE, Blackwell K, Bikhazi A (2003)** Regulation of insulin-like growth factor-1 by the renin-angiotensin system during regression of cardiac eccentric hypertrophy through angiotensin-converting enzyme inhibitor and AT1 antagonist. *Can J Physiol Pharmacol* 81:142-149.
  72. **Hayward CS, Webb CM, Collins P (2001)** Effect of sex hormones on cardiac mass. *Lancet* 357:1354-1356.
  73. **Heller S, Linhart A, Jindra A, Jáchymová M, Horký K, Peleska J, Hlubocká Z, Umnerová V, Aschermann M (2004)** Association of -344/T/C aldosterone synthase polymorphism (CYP11B2) with left ventricular structure and humoral parameters in young normotensive men. *Blood Press* 13:158-163.
  74. **Henschen S (1899)** Skilauf und Skiwetlauf: Eine medizinische Sportstudie. *Fischer, Jena.*
  75. **Hernández D, de la Rosa A, Barragán A, Barrios Y, Salido E, Torres A, Martín B, Laynez I, Duque A, De Vera A, Lorenzo V, González A (2003)** The ACE/DD genotype is associated with the extent of exercise-induced left ventricular growth in endurance athletes. *J Am Coll Cardiol* 42:527-532.

- 
76. **Hill JJ, Davies MV, Pearson AA, Wang JH, Hewick RM, Wolfman NM, Qiu Y (2002)** The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. *J Biol Chem* 277:40735-40741.
  77. **Holzenberger M, Hamard G, Zaoui R, Leneuve P, Ducos B, Beccavin C, Périn L, Le Bouc Y (2001)** Experimental IGF-I receptor deficiency generates a sexually dimorphic pattern of organ-specific growth deficits in mice, affecting fat tissue in particular. *Endocrinology* 142:4469-4478.
  78. **Ikeda Y, Aihara K, Sato T, Akaike M, Yoshizumi M, Suzaki Y, Izawa Y, Fujimura M, Hashizume S, Kato M, Yagi S, Tamaki T, Kawano H, Matsumoto T, Azuma H, Kato S, Matsumoto T (2005)** Androgen receptor gene knockout male mice exhibit impaired cardiac growth and exacerbation of angiotensin II-induced cardiac fibrosis. *J Biol Chem* 280:29661-29666.
  79. **Isaji M, Mune T, Takada N, Yamamoto Y, Suwa T, Morita H, Takeda J, White PC (2005)** Correlation between left ventricular mass and urinary sodium excretion in specific genotypes of CYP11B2. *J Hypertens* 23:1149-1157.
  80. **Ishanov A, Okamoto H, Yoneya K, Watanabe M, Nakagawa I, Machida M, Onozuka H, Mikami T, Kawaguchi H, Hata A, Kondo K, Kitabatake A (1997)** Angiotensinogen gene polymorphism in Japanese patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Am Heart J* 133:184-189.
  81. **Ito H, Hiroe M, Hirata Y, Tsujino M, Adachi S, Shichiri M, Koike A, Nogami A, Marumo F (1993)** Insulin-like growth factor-I induces hypertrophy with enhanced expression of muscle specific genes in cultured rat cardiomyocytes. *Circulation* 87:1715-1721.
  82. **Ito T, Yoshimura M, Nakamura S, Nakayama M, Shimasaki Y, Harada E, Mizuno Y, Yamamuro M, Harada M, Saito Y, Nakao K, Kurihara H, Yasue H, Ogawa H (2003)** Inhibitory effect of natriuretic peptides on aldosterone synthase gene expression in cultured neonatal rat cardiocytes. *Circulation* 107:807-810.
  83. **Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotevlevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Charru A, Hunt SC, Hopkins PN, Williams RR, Lalouel JM (1992)** Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell* 71:169-180.
  84. **Jiang X, Srinivasan SR, Dalferes ER Jr, Berenson GS (1997)** Plasma insulin-like growth factor 1 distribution and its relation to blood pressure in adolescents: the Bogalusa Heart Study. *Am J Hypertens* 10:714-719.
  85. **Jin M, Wilhelm MJ, Lang RE, Unger T, Lindpaintner K, Ganten D (1988)** Endogenous tissue renin-angiotensin systems. From molecular biology to therapy. *Am J Med* 84:28-36.
  86. **Jones A, Woods DR (2003)** Skeletal muscle RAS and exercise performance. *Int J Biochem Cell Biol* 35:855-866.

87. **Jones JI, Clemmons DR (1995)** Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 16:3-34.
88. **Kambadur R, Sharma M, Smith TP, Bass JJ (1997)** Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res* 7:910-916.
89. **Karjalainen J, Mäntysaari M, Viitasalo M, Kujala U (1997)** Left ventricular mass, geometry, and filling in endurance athletes: association with exercise blood pressure. *J Appl Physiol* 82:531-537.
90. **Karjalainen J, Kujala UM, Stolt A, Mäntysaari M, Viitasalo M, Kainulainen K, Kontula K (1999)** Angiotensinogen gene M235T polymorphism predicts left ventricular hypertrophy in endurance athletes. *J Am Coll Cardiol* 34:494-499.
91. **Kindermann W (2000)** Das Sporthertz. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* 51:307-308.
92. **Kindermann W, Dickhuth H-H, Niess A, Röcker K, Urhausen A (2007)**. Sportkardiologie. Körperliche Aktivität bei Herzerkrankungen. 2. Auflage. Steinkopf-Verlag Darmstadt.
93. **Kinugawa T, Ogino K, Miyakoda H, Saitoh M, Hisatome I, Fujimoto Y, Yoshida A, Shigemasa C, Sato R (1997)** Responses of catecholamines, renin-angiotensin system, and atrial natriuretic peptide to exercise in untrained men and women. *Gen Pharmacol* 28:225-228.
94. **Komamura K, Iwai N, Kokame K, Yasumura Y, Kim J, Yamagishi M, Morisaki T, Kimura A, Tomoike H, Kitakaze M, Miyatake K (2004)** The role of a common TNNT2 polymorphism in cardiac hypertrophy. *J Hum Genet* 49:129-133.
95. **Kostek MC, Delmonico MJ, Reichel JB, Roth SM, Douglass L, Ferrell RE, Hurley BF (2005)** Muscle strength response to strength training is influenced by insulin-like growth factor 1 genotype in older adults. *J Appl Physiol* 98:2147-2154.
96. **Kupari M, Hautanen A, Lankinen L, Koskinen P, Virolainen J, Nikkila H, White P C (1998)** Associations between Human Aldosterone Synthase (CYP11B2) Gene Polymorphisms and Left Ventricular Size, Mass, and Function. *Circulation* 97:569-575.
97. **Kuznetsova T, Staessen JA, Wang JG, Gasowski J, Nikitin Y, Ryabikov A, Fagard R (2000)** Antihypertensive treatment modulates the association between the D/I ACE gene polymorphism and left ventricular hypertrophy: a meta-analysis. *J Hum Hypertens* 14:447-454.
98. **Leinwand LA (2003)** Sex is a potent modifier of the cardiovascular system. *J Clin Invest* 112:302-307.
99. **Leung KC, Johannsson G, Leong GM, Ho KK (2004)** Estrogen regulation of growth hormone action. *Endocr Rev* 25:693-721.

- 
100. **Linhart A, Sedláček K, Jáchymová M, Jindra A, Beran S, Vondráček V, Heller S, Horký K (2000)** Lack of association of angiotensin-converting enzyme and angiotensinogen genes polymorphisms with left ventricular structure in young normotensive men. *Blood Press* 9:47-51.
  101. **London B (2006)** Natriuretic peptides and cardiac hypertrophy. *J Am Coll Cardiol* 48:506-507.
  102. **Lösel R, Feuring M, Wehling M (2002)** Non-genomic aldosterone action: from the cell membrane to human physiology. *J Steroid Biochem Mol Biol* 83:167-171.
  103. **Lung CC, Chan EK, Zuraw BL (1997)** Analysis of an exon 1 polymorphism of the B2 bradykinin receptor gene and its transcript in normal subjects and patients with C1 inhibitor deficiency. *J Allergy Clin Immuno* 199:134-146.
  104. **Marian AJ, Yu QT, Workman R, Greve G, Roberts R (1993)** Angiotensin-converting enzyme polymorphism in hypertrophic cardiomyopathy and sudden cardiac death. *Lancet* 342:1085-1086.
  105. **Maron BJ (2002)** Hypertrophic cardiomyopathy: a systematic review. *JAMA* 287:1308-1320.
  106. **Marsh JD, Lehmann MH, Ritchie RH, Gwathmey JK, Green GE, Schiebinger RJ (1998)** Androgen receptors mediate hypertrophy in cardiac myocytes. *Circulation* 98:256-261.
  107. **Mason DA, Moore JD, Green SA, Liggett SB (1999)** A Gain-of-function Polymorphism in a G-protein Coupling Domain of the Human  $\beta_1$ -Adrenergic Receptor. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 274:12670-12674.
  108. **Mazak I, Fiebeler A, Muller DN, Park JK, Shagdarsuren E, Lindschau C, Dechend R, Viedt C, Pilz B, Haller H, Luft FC (2004)** Aldosterone potentiates angiotensin II-induced signaling in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 109:2792-2800.
  109. **McCarthy TL, Ji C, Shu H, Casinghino S, Crothers K, Rotwein P, Centrella M (1997)** 17 $\beta$ -estradiol potently suppresses cAMP-induced insulin-like growth factor-I gene activation in primary rat osteoblast cultures. *J Biol Chem* 272:18132-18139.
  110. **McCroskery S, Thomas M, Maxwell L, Sharma M, Kambadur R (2003)** Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *J Cell Biol* 162:1135-1147.
  111. **McKoy G, Bicknell KA, Patel K, Brooks G (2007)** Developmental expression of myostatin in cardiomyocytes and its effect on foetal and neonatal rat cardiomyocyte proliferation. *Cardiovasc Res* 74:304-312.
  112. **McMahon CD, Popovic L, Jeanplong F, Oldham JM, Kirk SP, Osephook CC, Wong KW, Sharma M, Kambadur R, Bass JJ (2003)** Sexual dimorphism is associated with decreased expression of processed myostatin in males. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284:E377-381.



- 
113. **McMullen JR, Shioi T, Huang WY, Zhang L, Tarnavski O, Bisping E, Schinke M, Kong S, Sherwood MC, Brown J, Riggi L, Kang PM, Izumo S (2004)** The insulin-like growth factor 1 receptor induces physiological heart growth via the phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) pathway. *J Biol Chem* 279:4782-4793.
114. **McMullen JR, Amirahmadi F, Woodcock EA, Schinke-Braun M, Bouwman RD, Hewitt KA, Mollica JP, Zhang L, Zhang Y, Shioi T, Buerger A, Izumo S, Jay PY, Jennings GL (2007)** Protective effects of exercise and phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) signaling in dilated and hypertrophic cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:612-617.
115. **McMullen JR, Jennings GL (2007)** Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34:255-262.
116. **McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ (1997)** Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 387:83-90.
117. **McPherron AC, Lee SJ (1997)** Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:12457-12461.
118. **Mendler L, Baka Z, Kovács-Simon A, Dux L (2007)** Androgens negatively regulate myostatin expression in an androgen-dependent skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 361:237-242.
119. **Miyazono K, ten Dijke P, Heldin CH (2000)** TGF-beta signaling by Smad proteins. *Adv Immunol* 75:115-157.
120. **Moeller I, Allen AM, Chai SY, Zhuo J, Mendelsohn FA (1998)** Bioactive angiotensin peptides. *J Hum Hypertens* 12:289-293.
121. **Montgomery HE, Clarkson P, Dollery CM, Prasad K, Losi MA, Hemingway H, Statters D, Jubb M, Girvain M, Varnava A, World M, Deanfield J, Talmud P, McEwan JR, McKenna WJ, Humphries S (1997)** Association of angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism with change in left ventricular mass in response to physical training. *Circulation* 96:741-747.
122. **Morissette MR, Cook SA, Foo S, McKoy G, Ashida N, Novikov M, Scherrer-Crosbie M, Li L, Matsui T, Brooks G, Rosenzweig A (2006)** Myostatin regulates cardiomyocyte growth through modulation of Akt signaling. *Circ Res* 99:15-24.
123. **Mutschler E, Schaible HG, Vaupel P (2007)** Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart* 6. Auflage
124. **Neri Serneri GG, Boddi M, Modesti PA, Cecioni I, Coppo M, Padeletti L, Michelucci A, Colella A, Galanti G (2001)** Increased cardiac sympathetic activity and insulin-like growth factor-I formation are associated with physiological hypertrophy in athletes. *Circ Res* 89:977-982.

- 
125. **Odawara M, Matsunuma A, Yamashita K (1997)** Mistyping frequency of the angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and an improved method for its avoidance. *Hum Genet* 100:163-166.
126. **Oefner PJ, Underhill PA (1995)** Comparative DNA sequencing by denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). *Am J Hum Genet* 57:266.
127. **Oefner PJ, Huber CG (2002)** A decade of high-resolution liquid chromatography of nucleic acids on styrene-divinylbenzene copolymers. *J Chromatogr B* 782:27-55.
128. **Ortlepp JR, Breithardt O, Ohme F, Hanrath P, Hoffmann R (2001)** Lack of association among five genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system and cardiac hypertrophy in patients with aortic stenosis. *Am Heart J* 141:671-676.
129. **Ortlepp JR, Vosberg HP, Reith S, Ohme F, Mahon NG, Schröder D, Klues HG, Hanrath P, McKenna WJ (2002)** Genetic polymorphisms in the renin-angiotensin-aldosterone system associated with expression of left ventricular hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy: a study of five polymorphic genes in a family with a disease causing mutation in the myosin binding protein C gene. *Heart* 87:270-275.
130. **Osterop AP, Kofflard MJ, Sandkuijl LA, ten Cate FJ, Krams R, Schalekamp MA, Danser AH (1998)** AT1 receptor A/C1166 polymorphism contributes to cardiac hypertrophy in subjects with hypertrophic cardiomyopathy. *Hypertension* 32:825-830.
131. **Paradis P, Dali-Youcef N, Paradis FW, Thibault G, Nemer M (2000)** Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:931-936.
132. **Pelliccia A, Maron BJ, Spataro A, Proschan MA, Spirito P (1991)** The upper limit of physiologic cardiac hypertrophy in highly trained elite athletes. *N Engl J Med* 324:295-301.
133. **Pelliccia A, Di Paolo FM, Maron BJ (2002a)**. The athlete's heart: remodeling, electrocardiogram and preparticipation screening. *Cardiol Rev* 10:85-90.
134. **Pelliccia A, Maron BJ, De Luca R, Di Paolo FM, Spataro A, Culasso F (2002b)** Remodeling of left ventricular hypertrophy in elite athletes after long-term deconditioning. *Circulation* 105:944-949.
135. **Perna NT, Batzer MA, Deininger PL, Stoneking M (1992)** Alu insertion polymorphism: a new type of marker for human population studies. *Hum Biol* 64:641-648.
136. **Pfeufer A, Osterziel KJ, Urata H, Borck G, Schuster H, Wienker T, Dietz R, Luft FC (1996)** Angiotensin-converting enzyme and heart chymase gene polymorphisms in hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 78:362-364.

- 
137. **Philip B, Lu Z, Gao Y (2005)** Regulation of GDF-8 signaling by the p38 MAPK. *Cell Signal* 17:365-375.
138. **R Development Core Team (2007)** R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.*
139. **Reiss K, Cheng W, Ferber A, Kajstura J, Li P, Li B, Olivetti G, Homcy CJ, Baserga R, Anversa P (1996)** Overexpression of insulin-like growth factor-1 in the heart is coupled with myocyte proliferation in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:8630-8635.
140. **Reisz-Porszasz S, Bhasin S, Artaza JN, Shen R, Sinha-Hikim I, Hogue A, Fielder TJ, Gonzalez-Cadavid NF (2003)** Lower skeletal muscle mass in male transgenic mice with muscle-specific overexpression of myostatin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:E876-888.
141. **Ren J, Samson WK, Sowers JR (1999)** Insulin-like growth factor I as a cardiac hormone: physiological and pathophysiological implications in heart disease. *J Mol Cell Cardiol* 31:2049-2061.
142. **Richey PA, Brown SP (1998)** Pathological versus physiological left ventricular hypertrophy: a review. *J Sports Sci* 16:129-141.
143. **Rigat B, Hubert C, Corvol P, Soubrier F (1992)** PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1). *Nucleic Acids Res* 20:1433
144. **Risch NJ (2000)** Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature* 405:847-856.
145. **Robert V, Heymes C, Silvestre JS, Sabri A, Swynghedauw B, Delcayre C (1999)** Angiotensin AT1 receptor subtype as a cardiac target of aldosterone: role in aldosterone-salt-induced fibrosis. *Hypertension* 33:981-986.
146. **Röpke A, Allhoff EP, Wieacker P (2004)** Mutationen des Androgenrezeptor-Gens als mögliche Ursache der Androgenresistenz beim Prostatakarzinom. *J. Reproduktionsmed. Endokrinol* 1:194-201
147. **Rosen CJ, Kurland ES, Vereault D, Adler RA, Rackoff PJ, Craig WY, Witte S, Rogers J, Bilezikian JP (1998)** Association between serum insulin growth factor-I (IGF-I) and a simple sequence repeat in IGF-I gene: implications for genetic studies of bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab* 83:2286-2290.
148. **Rosenkranz AC, Hood SG, Woods RL, Dusting GJ, Ritchie RH (2002)** Acute antihypertrophic actions of bradykinin in the rat heart: importance of cyclic GMP. *Hypertension* 40:498-503.
149. **Rosenkranz AC, Woods RL, Dusting GJ, Ritchie RH (2003)** Antihypertrophic actions of the natriuretic peptides in adult rat cardiomyocytes: importance of cyclic GMP. *Cardiovasc Res* 57:515-522.

- 
150. **Ross RS (2004)** Molecular and mechanical synergy: cross-talk between integrins and growth factor receptors. *Cardiovasc Res* 63:381-390.
151. **Russo P, Loguercio M, Lauria F, Barba G, Arnout J, Cappuccio FP, Iacoviello L, Siani A; European Collaborative Group of the IMMIDIET Project (2007)** Age- and gender-dependent association of the -344C/T polymorphism of CYP11B2 with blood pressure in European populations. *J Hum Hypertens* 21:333-336.
152. **Sabri A, Wilson BA, Steinberg SF (2002)** Dual actions of the Galpha(q) agonist Pasteurella multocida toxin to promote cardiomyocyte hypertrophy and enhance apoptosis susceptibility. *Circ Res* 90:850-857.
153. **Sadoshima J, Izumo S (1993)** Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ Res* 73:413-423.
154. **Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988)** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
155. **Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 74:5463-5467.
156. **Scharhag J, Schneider G, Urhausen A, Rochette V, Kramann B, Kindermann W (2002)** Athlete's heart: right and left ventricular mass and function in male endurance athletes and untrained individuals determined by magnetic resonance imaging. *J Am Coll Cardiol* 40:1856-1863.
157. **Scharhag J, Urhausen A, Schneider G, Rochette V, Kramann B, Kindermann W (2003)** Left ventricular mass in endurance-athletes with athlete's heart and untrained subjects--comparison between different echocardiographic methods and MRI. *Z Kardiol* 92:309-318.
158. **Schlaich MP, Schobel HP, Hilgers K, Schmieder RE (2000)** Impact of aldosterone on left ventricular structure and function in young normotensive and mildly hypertensive subjects. *Am J Cardiol* 85:1199-1206.
159. **Schlüter KD, Wollert KC (2004)** Synchronization and integration of multiple hypertrophic pathways in the heart. *Cardiovasc Res* 63:367-372.
160. **Schmieder RE, Erdmann J, Delles C, Jacobi J, Fleck E, Hilgers K, Regitz-Zagrosek V (2001)** Effect of the angiotensin II type 2-receptor gene (+1675 G/A) on left ventricular structure in humans. *J Am Coll Cardiol* 37:175-182.
161. **Schmitt TJ, Robinson ML, Doyle J (2000)** Single Nucleotide Polymorphism (SNP), Insertion & Deletion Detection on the WAVE® Nucleic Acid Fragment Analysis System. *Transgenomic Inc Application Note* 112.

- 
162. **Schollen E, Dequeker E, McQuaid S, Vankeirsbilck B, Michils G, Harvey J, van den Akker E, van Schooten R, Clark Z, Schrooten S, Matthijs G; DDQA Collaborative Group (2005)** Diagnostic DHPLC Quality Assurance (DDQA): a collaborative approach to the generation of validated and standardized methods for DHPLC-based mutation screening in clinical genetics laboratories. *Hum Mutat* 25:583-592.
163. **Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE, Hübner C, Riebel T, Kömen W, Braun T, Tobin JF, Lee SJ (2004)** Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N Engl J Med* 350:2682-2688.
164. **Schunkert H, Hense HW, Muscholl M, Luchner A, Kürzinger S, Danser AH, Riegger GA (1997)** Associations between circulating components of the renin-angiotensin-aldosterone system and left ventricular mass. *Heart* 77:24-31.
165. **Schunkert H, Hengstenberg C, Holmer SR, Broeckel U, Luchner A, Muscholl MW, Kürzinger S, Döring A, Hense HW, Riegger GA (1999)** Lack of association between a polymorphism of the aldosterone synthase gene and left ventricular structure. *Circulation* 99:2255-2260.
166. **Sethi AA, Nordestgaard BG, Grønholdt ML, Steffensen R, Jensen G, Tybjaerg-Hansen A (2003)** Angiotensinogen single nucleotide polymorphisms, elevated blood pressure, and risk of cardiovascular disease. *Hypertension* 41:1202-1211.
167. **Shahi M, Beshyah SA, Hackett D, Sharp PS, Johnston DG, Foale RA (1992)** Myocardial dysfunction in treated adult hypopituitarism: a possible explanation for increased cardiovascular mortality. *Br Heart J* 67:92-96.
168. **Sharma M, Kambadur R, Matthews KG, Somers WG, Devlin GP, Conaglen JV, Fowke PJ, Bass JJ (1999)** Myostatin, a transforming growth factor-beta superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct. *J Cell Physiol* 180:1-9.
169. **Shioi T, Kang PM, Douglas PS, Hampe J, Yballe CM, Lawitts J, Cantley LC, Izumo S (2000)** The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. *EMBO J* 19:2537-2548.
170. **Shneider OV, Obrezan AG, Makeeva ED, Stupnitskiĭ AA, Spivak IM, Mikhel'son VM (2004)** [Impact of angiotensin-converting enzyme, angiotensinogen, endothelial NO synthase, and bradykinin receptor B2 gene polymorphisms on myocardium in patients with hypertension and in athletes] *Tsitologiya* 46:69-78.
171. **Shyu KG, Ko WH, Yang WS, Wang BW, Kuan P (2005)** Insulin-like growth factor-1 mediates stretch-induced upregulation of myostatin expression in neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 68:405-414.

- 
172. **Silvestre JS, Robert V, Heymes C, Aupetit-Faisant B, Mouas C, Moalic JM, Swynghedauw B, Delcayre C (1998)** Myocardial production of aldosterone and corticosterone in the rat. Physiological regulation. *J Biol Chem* 273:4883-4891.
173. **Siriatt V, Nicholas G, Berry C, Watson T, Hennebry A, Thomas M, Ling N, Sharma M, Kambadur R (2006)** Myostatin negatively regulates the expression of the steroid receptor co-factor ARA70. *J Cell Physiol* 206:255-263.
174. **Sleddens HF, Oostra BA, Brinkmann AO, Trapman J (1993)** Trinucleotide (GGN) repeat polymorphism in the human androgen receptor (AR) gene. *Hum Mol Genet* 2:493.
175. **Sonnet E, Lacut K, Roudaut N, Mottier D, Kerlan V, Oger E (2007)** Effects of the route of oestrogen administration on IGF-1 and IGFBP-3 in healthy postmenopausal women: results from a randomized placebo-controlled study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 66:626-631.
176. **Song J, Narita I, Goto S, Saito N, Omori K, Sato F, Ajiro J, Saga D, Kondo D, Sakatsume M, Gejyo F (2003)** Gender specific association of aldosterone synthase gene polymorphism with renal survival in patients with IgA nephropathy. *J Med Genet* 40:372-376.
177. **Stella P, Bigatti G, Tizzoni L, Barlassina C, Lanzani C, Bianchi G, Cusi D (2004)** Association between aldosterone synthase (CYP11B2) polymorphism and left ventricular mass in human essential hypertension. *J Am Coll Cardiol* 43:265-270.
178. **Stockand JD (2002)** New ideas about aldosterone signaling in epithelia. *Am J Physiol Renal Physiol* 282:F559-576.
179. **Su X, Brower G, Janicki JS, Chen YF, Oparil S, Dell'Italia LJ (1999)** Differential expression of natriuretic peptides and their receptors in volume overload cardiac hypertrophy in the rat. *J Mol Cell Cardiol* 31:1927-1936.
180. **Suter NM, Malone KE, Daling JR, Doody DR, Ostrander EA (2003)** Androgen receptor (CAG)<sub>n</sub> and (GGC)<sub>n</sub> polymorphisms and breast cancer risk in a population-based case-control study of young women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12:127-135.
181. **Takai E, Akita H, Kanazawa K, Shiga N, Terashima M, Matsuda Y, Iwai C, Miyamoto Y, Kawai H, Takarada A, Yokoyama M (2002)** Association between aldosterone synthase (CYP11B2) gene polymorphism and left ventricular volume in patients with dilated cardiomyopathy. *Heart* 88:649-650.
182. **Teichholz LE, Kreulen T, Herman MV, Gorlin R (1976)** Problems in echocardiographic volume determinations: echocardiographic-angiographic correlations in the presence of absence of asynergy. *Am J Cardiol* 37:7-11.

- 
183. **Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JA, Smith RD (1993)** Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev* 45:205-251.
184. **Toker A, Cantley LC (1997)** Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* 387:673-676.
185. **Tsybouleva N, Zhang L, Chen S, Patel R, Lutucuta S, Nemoto S, DeFreitas G, Entman M, Carabello BA, Roberts R, Marian AJ (2004)** Aldosterone, through novel signaling proteins, is a fundamental molecular bridge between the genetic defect and the cardiac phenotype of hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 109:1284-1291.
186. **Undén AL, Elofsson S, Brismar K (2005)** Gender differences in the relation of insulin-like growth factor binding protein-1 to cardiovascular risk factors: a population-based study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 63:94-102.
187. **Unger T (2002)** The role of the Renin-Angiotensin-System in the development of cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 89:3A-10A.
188. **Vaessen N, Heutink P, Janssen JA, Witteman JC, Testers L, Hofman A, Lamberts SW, Oostra BA, Pols HA, van Duijn CM (2001)** A polymorphism in the gene for IGF-I: functional properties and risk for type 2 diabetes and myocardial infarction. *Diabetes* 50:637-642.
189. **van Kesteren CA, van Heugten HA, Lamers JM, Saxena PR, Schalekamp MA, Danser AH (1997)** Angiotensin II-mediated growth and antigrowth effects in cultured neonatal rat cardiac myocytes and fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol* 29:2147-2157.
190. **Verhaaren HA, Schieken RM, Mosteller M, Hewitt JK, Eaves LJ, Nance WE (1991)** Bivariate genetic analysis of left ventricular mass and weight in pubertal twins (the Medical College of Virginia twin study). *Am J Cardiol* 68:661-668.
191. **Walsh FS, Celeste AJ (2005)** Myostatin: a modulator of skeletal-muscle stem cells. *Biochem Soc Trans* 33:1513-1517.
192. **Warnecke C, Mugrauer P, Sürder D, Erdmann J, Schubert C, Regitz-Zagrosek V (2005)** Intronic ANG II type 2 receptor gene polymorphism 1675 G/A modulates receptor protein expression but not mRNA splicing. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289:R1729-1735.
193. **Williams AG, Dhamrait SS, Wootton PT, Day SH, Hawe E, Payne JR, Myerson SG, World M, Budgett R, Humphries SE, Montgomery HE (2004)** Bradykinin receptor gene variant and human physical performance. *J Appl Physiol* 96:938-942.
194. **Wolf G (2005)** Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System – komplexer als bisher gedacht. *Med Klein* 100:471-477.

- 
195. **Wong KK, Summers KM, Burstow DJ, West MJ (1996)** Genetic variants of proteins from the renin angiotensin system are associated with pressure load cardiac hypertrophy. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 23:587-590.
196. **Xiao W, Oefner PJ (2001)** Denaturing High-Performance Liquid Chromatography: A Review. *Hum Mutat* 17:439-474.
197. **Yamada Y, Ichihara S, Fujimura T, Yokota M (1997)** Lack of association of polymorphisms of the angiotensin converting enzyme and angiotensinogen genes with nonfamilial hypertrophic or dilated cardiomyopathy. *Am J Hypertens* 10:921-928.
198. **Yang W, Chen Y, Zhang Y, Wang X, Yang N, Zhu D (2006)** Extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase pathway is involved in myostatin-regulated differentiation repression. *Cancer Res* 66:1320-1326.
199. **Yazdanpanah M, Sayed-Tabatabaei FA, Janssen JA, Rietveld I, Hofman A, Stijnen T, Pols HA, Lamberts SW, Witteman JC, van Duijn CM (2006)** IGF-I gene promoter polymorphism is a predictor of survival after myocardial infarction in patients with type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol* 155:751-756.
200. **Yoneya K, Okamoto H, Machida M, Onozuka H, Noguchi M, Mikami T, Kawaguchi H, Murakami M, Uede T, Kitabatake A (1995)** Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in Japanese patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Am Heart J* 130:1089-1093.
201. **Young M, Fullerton M, Dille R, Funder J (1994)** Mineralocorticoids, hypertension, and cardiac fibrosis. *J Clin Invest* 93:2578-2583.
202. **Young MJ, Clyne CD, Cole TJ, Funder JW (2001)** Cardiac steroidogenesis in the normal and failing heart. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5121-5126.
203. **Yuan M, Ohishi M, Ito N, Sugimoto K, Takagi T, Terai M, Katsuya T, Rakugi H, Wu Z, Ogihara T (2006)** Genetic influences of beta-adrenoceptor polymorphisms on arterial functional changes and cardiac remodeling in hypertensive patients. *Hypertens Res* 29:875-881.
204. **Zahradka P, Litchie B, Storie B, Helwer G (2004)** Transactivation of the insulin-like growth factor-I receptor by angiotensin II mediates downstream signaling from the angiotensin II type 1 receptor to phosphatidylinositol 3-kinase. *Endocrinology* 145:2978-2987.



---

## 7. Publikationen/Danksagung

### 7.1 Publikationen

#### Poster:

- 09/2004 International Meeting of Drosophila Neurobiology, Neurofly 2004 in Neuchâtel (Schweiz)
- 04/2005 16. Wissenschaftliche Tagung der Gesellschaft für Entwicklungsbiologie (GfE) in Münster
- Thema: „Identification and characterisation of a new Drosophila retinal homeobox (drx) mutation“.

#### Vorträge:

- 09/2007 Vortrag beim 40. Deutschen Sportärztekongress der DGSP/Köln.  
Thema: „Ein bisher nicht beachteter Polymorphismus im Myostatin-Gen (GDF8) korreliert mit der Herzmuskelmasse bei Ausdauersportlern“.
- 10/2007 Vortrag im Rahmen einer Fortbildungsveranstaltung der Klinik für Innere Medizin III/Kardiologie, Angiologie in Homburg/Saar.  
Thema: „Einfluss genetischer Polymorphismen auf eine Myokardhypertrophie“.

#### Publikationen:

*zur Publikation abgeschlossen:*

**Wild RJ, Scharhag J, Rahnenführer J, Kindermann W, Zang KD (2008)**  
Polymorphisms in the IGF1 signalling pathway, together with a previously unnoticed variance of the myostatin gene, and their influence on left ventricular mass of endurance athletes.

**Wild RJ, Scharhag J, Rahnenführer J, Kindermann W, Zang KD (2008)**  
The -344C/T polymorphism of the aldosterone synthase (CYP11B2) seems to influence the left ventricular mass of endurance athletes.

## 7.2 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K.D. Zang für die Überlassung des interessanten Themengebiets, die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes in der IGD-Saar GmbH und die stetige herzliche Förderung, die zahlreichen Diskussionen und die Unterstützung während meiner gesamten Arbeit.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Dr. Jürgen Scharhag und Herrn Prof. Dr. W. Kindermann vom Institut für Sport- und Präventivmedizin der UdS, sowie PD Dr. Jörg Rahnenführer vom Max-Planck-Institut für Informatik (jetzt Universität Dortmund) für die sehr gute Zusammenarbeit und die tatkräftige Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. J. Walter für sein stetiges Interesse am Fortgang der Arbeit und seine Bereitschaft diese Arbeit als Zweitgutachter zu bewerten sehr herzlich bedanken.

Ein ausdrückliches Dankeschön auch an meine beiden Betreuer Dr. Alexander Christmann und Dr. Georg Andreas Weber, die mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben, und mir wertvolle praktische und theoretische Tipps für meine Arbeit gegeben haben. Darüber hinaus danke ich den Inhabern der IGD-Saar GmbH und der Gemeinschaftspraxis für Humangenetik, Dr. Rita Grigorean, Dr. Barbara Oehl-Jaschkowitz, Dr. Alexander Christmann und Dr. Thomas Martin, dass ich meine Arbeit in Ihrem Institut anfertigen durfte, sowie für die Hilfe und Unterstützung die ich erhalten habe.

Insgesamt möchte ich mich bei all meinen Arbeitskollegen der IGD-Saar GmbH und der Gemeinschaftspraxis für Humangenetik für das tolle Arbeitsklima und die schönen Stunden zusammen bedanken.

Mein Dank geht auch an all meine Freunde und Verwandten, die mich immer in allen Lebenslagen begleitet und unterstützt haben.

Zuletzt will ich meinen Eltern Inge und Ludwin, sowie speziell meinem Freund Christian ganz besonders herzlich danken, da sie mir schon immer, und vor allem in schwierigen Zeiten, mit lieben Worten zur Seite gestanden haben und meine Launen ohne Murren ertragen haben.

## 8. Lebenslauf

### Angaben zur Person

Name: Ruth-Jessica Wild  
Wohnort: 66839 Schmelz  
Geburtsdatum/ort: 29.08.1979, Saarbrücken  
Familienstand: ledig  
Nationalität: deutsch

### ❖ Ausbildung

#### Schulen

08/1986 - 06/1990 Grundschule in Schmelz-Limbach  
08/1990 - 06/1999 Geschwister-Scholl-Gymnasium in Lebach (Abschluss: Abitur)

#### Studium

10/1999 - 12/2004 Biologie-Studium mit *Schwerpunkt Human- und Molekularbiologie* an der Universität des Saarlandes (Saarbrücken/Homburg Saar)

04/08 - 09/08/03 internationales „Forensic Entomology Training“ bei Dr. Mark Benecke an der Universität in Köln

**12/2004** Beendigung des Studiums mit Abschluss der Diplomarbeit „mit Auszeichnung“.  
Thema: „Funktionelle und regulatorische Analyse zur Charakterisierung des retinalen Homöobox-Gens *drx* von *Drosophila melanogaster*“

02/05 - 08/05 wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. U. Walldorf, Entwicklungsbiologie, Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität des Saarlandes

**Promotion**

seit 09/05 Promotionsstudentin bei Prof. Dr. K. D. Zang, Institut für Humangenetik der Universität des Saarlandes. Die experimentellen Untersuchungen wurden in der IGD-Saar GmbH unter seiner Betreuung durchgeführt.

Thema: Bedeutung genetischer Polymorphismen für eine sportbedingte Anpassung des Herzens (Das Sportherz)

**❖ Berufliche Nebentätigkeiten**

seit 01/06 Qualitätsmanagement-Beauftragte der Gemeinschaftspraxis für Humangenetik und der IGD-Saar GmbH in Homburg/Saar

seit 09/07 Vertretungslehrerin am Helmholtz-Gymnasium in Zweibrücken in den Fächern Biologie und Chemie (Klassenstufen 5-13)