Aus der Klinik für Kardiologie und Pneumologie
(Prof. Dr. med. G. Hasenfuß)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Etablierung von zirkulierenden DNA-
Fragmenten als Biomarker für die
klinische Progression einer
Herzinsuffizienz mit erhaltener
Ejektionsfraktion (HFpEF)**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Marleen Awe

aus

Münster

Göttingen 2019

Dekan:

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

Betreuungsausschuss

Betreuer/in

Prof. Dr. med. E. Zeisberg

Ko-Betreuer/in:

Prof. Dr. mult. T. Meyer

Prüfungskommission

Referent/in

Prof. Dr. med. E. Zeisberg

Ko-Referent/in:

Prof. Dr. mult. T. Meyer

Drittreferent/in:

Prof. Dr. M. Oppermann

Datum der mündlichen Prüfung:

25.02.2020

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Etablierung von zirkulierenden DNA-Fragmenten als Biomarker für die klinische Progression einer Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion (HFpEF)" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung.....	1
1.1. Bedeutung von HFpEF.....	1
1.2. Zentrale Rolle von Fibrose im Pathomechanismus von HFpEF.....	1
1.3. <i>RASAL1</i>	3
1.4. <i>ATP2A2</i>	4
1.5. <i>B9D1</i>	5
1.6. <i>LAP</i>	6
1.7. Diagnosekriterien der Herzinsuffizienz	6
1.8. Zielsetzung	6
2. Material und Methoden.....	8
2.1. Material	8
2.1.1. Geräte	8
2.1.2. Software	8
2.1.3. Gebrauchsmaterialien.....	8
2.1.4. Chemikalien	9
2.1.5. Kitsysteme.....	9
2.1.6. Ansatz für rtPCR.....	9
2.1.7. Primer für rtPCR	9
2.1.8. Patientenproben.....	10
2.2. Methoden	10
2.2.1. DNA-Aufreinigung	10
2.2.2. Konzentrationsmessung	11
2.2.3. Methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP).....	11
2.2.4. Quantitative Realtime-PCR (rtPCR).....	13
2.2.5. Statistik.....	14

3.	Ergebnisse	17
3.1.	Detektion intervariabler Abhängigkeiten sowie Assoziation mit dem Überleben...	17
3.1.1.	Charakterisierung der Studienkohorte	17
3.1.2.	Korrelation der Promotormethylierung mit Patientenparametern	23
3.1.3.	Identifizierung von Überlebenszeit-beeinflussenden Parametern.....	25
3.2.	Ergebnisse der multivariaten Cox-Regression	30
4.	Diskussion	34
4.1.	Zirkulation von DNA-Fragmenten im Blut	34
4.2.	Assoziation der untersuchten Gene mit verschiedenen Patientenparametern.....	34
4.2.1.	Repräsentation unterschiedlicher Aspekte der Krankheit durch <i>RASAL1</i> , <i>ATP2A2</i> und <i>B9D1</i>	35
4.3.	Identifikation von Risikopatienten mit Hilfe methylierter DNA-Fragmente im Blut	36
4.3.1.	Der Parameter Überleben als stellvertretender Marker für Fibrose	36
4.3.2.	Univariat signifikante Assoziation von drei Genen mit dem Tod	37
4.3.3.	<i>RASAL1</i> und <i>ATP2A2</i> als Progressionsmarker im multivariaten Modell	39
4.4.	Klinische Implikationen	42
4.4.1.	Therapie der Herzinsuffizienz	42
4.4.2.	Neue Therapiemöglichkeiten durch Verständnis der Epigenetik	43
4.4.3.	Volkswirtschaftliche Relevanz	43
5.	Zusammenfassung.....	45
6.	Literaturverzeichnis.....	47

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Veranschaulichung der signifikanten Korrelationen mit Hilfe linearer Regressionen..	24
Abbildung 2: Graphische Darstellung der ROC-Analysen.....	26
Abbildung 3: Kaplan-Meier-Kurven I.	29
Abbildung 4: Kaplan-Meier-Kurven II.....	30

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primer für die rtPCR.	9
Tabelle 2: Basisdatensatz der Kohorte I.	15
Tabelle 3: Basisdatensatz der Kohorte II.....	15
Tabelle 4: Charakterisierung der Studienkohorte anhand des <i>RASAL1</i> -Mediansplits I.	18
Tabelle 5: Charakterisierung der Studienkohorte anhand des <i>RASAL1</i> -Mediansplits II.....	19
Tabelle 6: Charakterisierung der Studienkohorte anhand des <i>ATP2A2</i> -Mediansplits I.	20
Tabelle 7: Charakterisierung der Studienkohorte anhand des <i>ATP2A2</i> -Mediansplits II.....	20
Tabelle 8: Charakterisierung der Studienkohorte anhand des <i>B9D1</i> -Mediansplits I.....	21
Tabelle 9: Charakterisierung der Studienkohorte anhand des <i>B9D1</i> -Mediansplits II.	22
Tabelle 10: Korrelationsanalyse der numerischen Parameter mit <i>RASAL1</i> , <i>ATP2A2</i> , <i>B9D1</i> und <i>LAP</i>	23
Tabelle 11: ROC-Analyse.....	25
Tabelle 12: Mediansplit der Gene <i>RASAL1</i> , <i>ATP2A2</i> , <i>B9D1</i> und <i>LAP</i>	26
Tabelle 13: Log-rank-Test.	28
Tabelle 14: Modell 1.	31
Tabelle 15: Modell 2.....	31
Tabelle 16: Modell 3.....	32
Tabelle 17: Modell 4.....	32
Tabelle 18: Modell 5.....	33

Abkürzungsverzeichnis

5caC	5-Carboxylcytosin	EndMT	<i>endothelial-to-mesenchymal transition</i>
5hmC	5-Hydroxymethylcytosin		
5mc	5-Methylcytosin	ESC	<i>European Society of Cardiology</i>
ACE	<i>Angiotensin-converting enzyme</i>	EZM	Extrazellulärmatrix
ARNI	Angiotensin-Rezeptor/ Neprilysin-Hemmer	GAP	<i>GTPase activating protein</i>
ATPase	Adenosintriphosphatase	GDP	Guanosindiphosphat
AV-Block	Atrioventrikular-Block	GTP	Guanosintriphosphat
B9D1	B9 protein domain 1	GTPase	Guanosintriphosphatase
BMI	body mass index	HDL	<i>high density lipoprotein</i>
BNP	<i>brain natriuretic peptide</i>	HFmrEF	<i>heart failure with mid-range ejection fraction</i>
Ca ²⁺	Kalzium	HFpEF	<i>heart failure with preserved ejection fraction</i>
cfDNA	zellfreie DNA <i>cell-free DNA</i>	HFrEF	<i>heart failure with reduced ejection fraction</i>
CpG	Cytosin-Guanin-Dinukleotid	HIF-1 α	<i>hypoxia-inducible factor 1-alpha</i>
CRT	kardiale Resynchronisationstherapie	ICD	implantierbarer Kardioverter-Defibrillator
DCM	dilatative Kardiomyopathie <i>dilated cardiomyopathy</i>	KHK	Koronare Herzkrankheit
DNA	Desoxyribonukleinsäure <i>deoxyribonucleic acid</i>	Krea	Kreatinin
DNMT	DNA-Methyltransferase	LAP	Leucin-Aminopeptidase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>	LDL	<i>low density lipoprotein</i>
EF	Ejektionsfraktion	LSB	Linksschenkelblock
eGFR	geschätzte glomeruläre Filtrationsrate <i>estimated glomerular filtration rate</i>	LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
		MeDIP	<i>methylated DNA immunoprecipitation</i>
		MMP	Matrixmetalloproteinase

MRA	Mineralkortikoid- Rezeptorantagonisten
MTS	Masson-Trichrom-Färbung
NO	Stickstoffmonoxid
NT- proBNP	N-terminales Propeptid
NYHA	New York Heart Association
PAS	Perjodsäure-Schiff-Reaktion <i>periodic acid-Schiff reaction</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion <i>polymerase chain reaction</i>
RASAL1	<i>RAS protein activator like 1</i>
RNA	Ribonukleinsäure <i>ribonucleic acid</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RR	Blutdruck (nach Riva-Rocci)
RSB	Rechtsschenkelblock
rtPCR	realtime-PCR
RV- Dilatation	rechtsventrikuläre Dilatation
SD	Standardabweichung, <i>standard deviation</i>
SERCA2	<i>sarcoplasmic/ endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2</i>
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
TAVI	<i>transcatheter aortic valve implantation</i>
TET	<i>ten-eleven translocation</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i>
Z. n.	Zustand nach
α -SMA	<i>alpha smooth muscle actin</i>

1. Einleitung

1.1. Bedeutung von HFpEF

Weltweit leiden 38 Millionen Patienten an Herzinsuffizienz; jedes Jahr werden in den USA eine Million Menschen aus diesem Grund in Krankenhäuser eingewiesen. Bis 2030 soll die Zahl der Patienten mit Herzinsuffizienz um 50% steigen, wenn in Diagnose und Therapie keine Verbesserungen eintreten. Diese Krankheit ist der häufigste Grund für eine Krankenhauseinweisung bei Erwachsenen über 65 Jahre (Braunwald 2015) und die dritthäufigste Todesursache in Deutschland (Statistisches Bundesamt 2017). Liegen Symptome und Zeichen von Herzinsuffizienz vor, können drei Untergruppen anhand der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) unterschieden werden: Herzinsuffizienz mit reduzierter (LVEF < 40%; *heart failure with reduced ejection fraction*, HFrEF), mäßig-gradig eingeschränkter (LVEF 40-49%; HFmrEF) und erhaltener (LVEF ≥ 50%; HFpEF) Ejektionsfraktion (European Society of Cardiology 2016). Mit einer Prävalenz von 1-3% in der Gesamtbevölkerung leidet etwa die Hälfte aller Herzinsuffizienzpatienten an HFpEF (Nanayakkara et al. 2018; Dunlay et al. 2017), Tendenz steigend (Steinberg et al. 2012). Mit steigendem Alter nimmt die Prävalenz von HFpEF unter den herzinsuffizienten Patienten zu. Bei Patienten, bei denen die Krankheit mit ≥ 80 Jahren diagnostiziert wird, liegt fast immer eine HFpEF vor (Upadhya et al. 2017).

1.2. Zentrale Rolle von Fibrose im Pathomechanismus von HFpEF

Verschiedene Komorbiditäten begünstigen die Entstehung von HFpEF. Lam et al. (2011a) betonen die Assoziation mit arterieller Hypertonie. Myokardiale Wanddehnung sowie Ventrikeldilatation und -hypertrophie wurden bereits vor Jahrzehnten von Linzbach (1960) und Grossman et al. (1975) aufgeführt. Ho et al. (2012), Lam et al. (2011b) und Shah (2010) weisen auf die Bedeutung von KHK, Vorhofflimmern und pulmonaler Dysfunktion für die Entstehung von HFpEF hin.

Auf zellulärer Ebene spielen die von van Heerebeek et al. (2006) beschriebene Kardiomyozytenhypertrophie und insbesondere die vermehrte Produktion von Extrazellulärmatrix (EZM) eine entscheidende Rolle. Zile et al. (2004) und Westermann et al. (2008) erklären hierdurch die konsekutive Steifheit des Ventrikels, wodurch eine ausreichende Füllung nur unter erhöhtem Druck möglich ist. Myokardiale Fibrogenese ist ein Schlüsselfaktor in der Pathophysiologie von diastolischer Dysfunktion bei Patienten mit

HFpEF (Su et al. 2014). Bei der physiologischen Wundheilung findet eine fibrotische Narbenbildung statt (Frangogiannis 2012; Gurtner et al. 2008), die von der pathologischen Fibrogenese bei HFpEF abgegrenzt werden muss. Zwar liegt beiden Arten eine Alteration von Parenchym mit konsekutiver Aktivierung von Fibroblasten und vermehrter Produktion von EZM zugrunde, jedoch unterscheiden sie sich durch die Dauer der Aktivierung. Der Wundheilungsprozess ist selbstterminierend, wohingegen die Fibrogenese nicht endet. Obwohl identische Signale in beiden Arten die Fibroblasten aktivieren, ist nicht geklärt, welche Mechanismen entscheiden, ob Wundheilung oder pathologische Fibrogenese angestoßen werden soll (Zeisberg und Zeisberg 2013; Swynghedauw 1999).

Vielfältige Ursachen wie Kardiomyopathien, Klappenvitien (Pagani et al. 1988; Weber et al. 1993), arterielle Hypertonie und damit assoziierte Faktoren (Ischämie, Diabetes sowie diverse Hormone und Peptide), Myokardinfarkt, Aortenstenose, renale Hypertonie (Chapman et al. 1990; Jalil et al. 1989; Nicoletti et al. 1995), Dehnung (Cheng et al. 1995) oder vasoaktive Substanzen wie NO und Angiotensin II (Pollman et al. 1996) führen zu einem fibrotischen Reiz. Obwohl, wie zuvor erwähnt, der genaue Mechanismus der pathologischen Fibrogenese noch nicht vollständig erfasst wurde, herrscht Einigkeit über die Bedeutung des *transforming growth factor $\beta 1$* (TGF- $\beta 1$) in der Aktivierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten (Dobaczewski et al. 2011). TGF- β wird als inaktiver Komplex sezerniert und kann durch multiple Mediatoren aktiviert werden. Zu den Aktivatoren zählen unter anderem Plasmin, Matrix-Metalloproteinase (MMP) -2 und -9 und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Annes et al. 2003; Rifkin et al. 1999). Durch Interaktion des aktivierten TGF- β mit einem Rezeptor an der Zelloberfläche werden die Rezeptoren ALK5 und ALK1 rekrutiert (Massagué 2000; Goumans et al. 2002). Per Phosphorylierung aktivieren diese wiederum Smad-Proteine, welche im Zellkern die Gentranskription beeinflussen (Shi und Massagué 2003; Feng und Derynck 2005). Im Kontext der Herzfibrose werden durch aktiviertes TGF- β in Myofibroblasten die Synthese von EZM induziert und Matrixmetalloproteasen (MMP) blockiert, wodurch eine Entstehung von Fibrose gefördert wird (Desmouliere et al. 1993; Mauviel 2005).

Die aktivierten Myofibroblasten exprimieren α -Smooth-Muscle-Actin (α -SMA), Angiotensin-II-Rezeptoren und enthalten MMP (Weber et al. 1997). Eine gesteigerte Sezernierung von Kollagen I und III sorgt für Vermehrung der EZM, im Falle eines Myokardinfarkts für eine schnelle Narbenbildung sowie stets den Verlust an Elastizität (Cleutjens et al. 1995). Diese Umstrukturierung des Myokards (Remodeling) mit vermehrter Steifigkeit und Elastizitätsverlust hat direkten Einfluss auf die systolische und diastolische

Herzleistung und stellt einen der pathophysiologischen Mechanismen bei Herzinsuffizienz und HFpEF dar (Janicki und Brower 2002; Swynghedauw 1999). Die differenziertere Betrachtung der zugrundeliegenden Pathomechanismen erfordert den Einbezug epigenetischer Erklärungsmodelle. Mit ihrer Hilfe konnten bereits in anderen Arbeiten neue Interaktionen verstanden werden.

Manches weist darauf hin, dass epigenetische Prozesse auf die persistierende Fibrogenese Einfluss haben (Xu et al. 2015). Im Rahmen epigenetischer Forschung wurde die DNA-Methylierung an CpG-Inseln, welche häufig in Promotorregionen vorkommt, als ein wichtiger Faktor in der Regulierung von Zellaktivität untersucht (Bird 2002; Jones und Laird 1999). Im Gegensatz zur physiologischen Methylierung von CpG-Inseln, die der Zelldifferenzierung dient, werden bei der Hypermethylierung pathologische Prozesse in Gang gesetzt, die bei der Entstehung von Krebs entdeckt wurden (Tampe et al. 2015). Im Myokard dient eine Minderversorgung mit Sauerstoff als Induktor von HIF-1 α . HIF-1 α stimuliert, ebenso wie TGF- β 1, eine Expression von DNA-Methyltransferasen (DNMTs), wodurch CpG-Inseln hypermethyliert werden (Watson et al. 2014). Durch Methylierung von Cytosin in der Promotorregion wird die Transkription des Gens supprimiert (Bird und Wolffe 1999). Eine konsekutive Minderexpression derart regulierter Proteine könnte also für eine persistierende Aktivität der Fibroblasten ursächlich sein, wodurch HFpEF entsteht (Grimaldi et al. 2017).

Die in dieser Arbeit untersuchten Gene, die für die Entstehung von Herzfibrose durch Promotorhypermethylierung mitverantwortlich sein könnten, sind *RASAL1*, *ATP2A2* und *B9D1*. Das vierte hier betrachtete Gen, *LAP*, welches als Kontrollgen dient, wurde bereits in anderen Arbeiten als eben dieses etabliert (Weber et al. 2005), da es dort eine von anderen Einflussgrößen unabhängige Methylierung zeigte.

1.3. *RASAL1*

RASAL1 ist ein Gen, das zur RAS-GAP-Familie gehört und die zelluläre Proliferation bzw. Differenzierung reguliert (Allen et al. 1998; Bechtel et al. 2010). Es kodiert für das RAS-Gap-like Protein I, eine GTPase, die aktives RAS-GTP in inaktives RAS-GDP umwandelt (Walker et al. 2004). *RASAL1* ist daher ein Inhibitor des RAS-Signalwegs (Xu et al. 2015). Dies bedeutet, dass bei einer hohen *RASAL1*-Expression wenig aktivierendes RAS-GTP vorhanden ist und somit der Signalweg für Proliferation und Differenzierung inhibiert ist. Wird *RASAL1* durch DNMT1 hypermethyliert, ist die Expression verringert und eine hohe Konzentration von RAS-GTP liegt vor. Diese RAS-Hyperaktivität bewirkt eine erhöhte intrinsische Proliferation und verstärkte Kollagenexpression (Bechtel et al. 2010). In ihrer

Arbeit konnten Xu et al. (2016) die enge Verbindung zwischen TGF- β und *RASALI* darstellen. Unter Hypoxie führte die Aktivierung von TGF- β 2 über den Smad-Signalweg zu einer Aktivierung von DNMT3a, welcher zu einer Hypermethylierung von *RASALI* führte. Diese mündete in eine verstärkte RAS-GTP-Aktivität. Die verstärkte RAS-GTP-Aktivität mit konsekutiver Kollagenexpression führt dazu, dass Endothel in Mesenchym (endothelial to mesenchymal transition, EndMT) umgebaut wird (Xu et al. 2015). Kombiniert mit dem Wissen, dass EndMT mit Herzfibrose assoziiert ist (Zeisberg et al. 2007), stellten Xu et al. (2015) fest, dass die Hypermethylierung von *RASALI*-Promotoren, welche zu einer niedrigen *RASALI*-Expression und somit zu einer erhöhten RAS-GTP-Aktivität führt, zur Bildung von fibrotischem Herzgewebe beiträgt. Vorausgegangene Arbeiten haben den theoretischen Zusammenhang zwischen *RASALI*, Methylierung und Fibrose im Herzen hergestellt. In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob mit Hilfe der Quantifizierung von methylierten *RASALI*-Promotoren im Blut die Progression von HFpEF beurteilt werden kann, die eng mit der Fibrogenese verknüpft zu sein scheint.

1.4. *ATP2A2*

ATP2A2 kodiert für die *sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase* (SERCA2), eine Ca^{2+} -Pumpe am Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) im Herzen, die Kalzium aus dem Zytosol ins SR pumpt. Dies geschieht während der Diastole des Herzzyklus, damit für die folgende Kontraktion wieder ausreichend Ca^{2+} zur Verfügung steht (Wuytack et al. 2002). Ca^{2+} ist im Herzzyklus ein wichtiger Bestandteil für die Kontraktion der Herzkammern: In der Systole gelangt durch das Aktionspotenzial ein geringer Ca^{2+} -Einstrom durch L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle ins Sarkoplasma. Dieser Einstrom triggert den Ryanodin-Rezeptor, sodass Ca^{2+} aus dem SR ins Sarkoplasma gelangt. Ca^{2+} bindet an das Protein Troponin C der Myofilamente und über weitere Mechanismen kontrahiert der Muskel. Am Ende des Kontraktionszyklus werden 30% des Ca^{2+} in den Extrazellularraum gepumpt, während die anderen 70% mit Hilfe der SERCA2 wieder ins SR aufgenommen werden (Bers et al. 1996). SERCA2 erfüllt also wichtige Funktionen: Sie ermöglicht einerseits die Relaxation, indem die diastolische Kalziumkonzentration im Zytoplasma gesenkt wird, andererseits stellt sie wieder Ca^{2+} für die darauffolgende Kontraktion zur Verfügung (Lipskaia et al. 2010; Frank et al. 2002). Nach der Transkription entstehen vier Isoformen: SERCA2a, 2b, 2c und 2d (Kimura et al. 2005). In Studien konnten Hinweise darauf gefunden werden, dass die Expression von *ATP2A2* und die Konzentration von SERCA2a bei Herzinsuffizienz reduziert sind (Hasenfuß et al. 1994). Bei einer verminderten Konzentration von SERCA2 kann der Speicher des SR nicht ausreichend mit Ca^{2+} gefüllt werden, mehr Ca^{2+} verbleibt am Ende

der Systole im Sarkoplasma. In der folgenden Diastole ist ein Kalziumüberangebot verantwortlich für eine reduzierte Relaxation und konsekutiv für eine geringere diastolische Füllung der Ventrikel (Lompré et al. 2010). In der Systole kann nicht mehr ausreichend Ca^{2+} aus dem leeren Speicher des SR zur Verfügung gestellt werden. Dadurch findet eine schwächere Kontraktion statt (Braunwald 2015). Sedej et al. (2014) veranschaulichen, dass die Fehlregulation des Ca^{2+} -Gleichgewichts im Mausmodell durch eine geringe Serca2a-Konzentration in Verbindung mit defekten Ryanodinrezeptoren steht. In ihrer Arbeit beschreiben sie, wie eine im Mausmodell induzierte Druckbelastung zu myokardialem Remodeling führt. Bezüglich der Entstehung von HFpEF im Menschen ist bisher wenig über die Rolle von *ATP2A2* bekannt.

In dieser Arbeit wurde *ATP2A2* betrachtet, weil Kao et al. (2010) im murinen Modell zeigen konnten, dass die Serca2-Konzentration durch epigenetische Veränderungen, nämlich durch aberrante Methylierung des *Atp2a2*-Promotors, reduziert wurde. Angrisano et al. (2014) konnten Hinweise darauf liefern, dass epigenetische Veränderungen von *Atp2a2* im Mausmodell zur Progression von Herzinsuffizienz beitragen. Zusätzlich konnte in unveröffentlichten Studien der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass Fibrose im Mausmodell mit hypermethyliertem *Atp2a2*-Promotor assoziiert ist. Auf dieser Grundlage soll in der vorliegenden Arbeit, analog zu der Analyse von *RASAL1*, untersucht werden, ob eine Quantifizierung von methylierten *ATP2A2*-Promotoren mit Fibrose und konsekutiv mit einer Progression von HFpEF assoziiert werden kann.

1.5. *B9D1*

Das B9 Protein Domain 1 (*B9D1*) spielt eine wichtige Rolle in der Ziliogenese. Garcia-Gonzalo et al. (2011) beschreiben, dass *B9D1* zusammen mit anderen Proteinen einen Komplex bildet, der an der Transitionszone der Zilien lokalisiert ist. Ein Verlust eines der Proteine aus dem Komplex bedeutet einen gewebespezifischen Defekt in der Ziliogenese (Dowdle et al. 2011). Dowdle et al (2011) haben festgestellt, dass Mäuse mit einem mutierten *B9D1*-Protein in der Embryonalphase in 44% der Fälle Dextrokardie aufweisen. Zudem verursacht Ziliopathie häufiger Ventrikelseptumdefekte und eine dünnere Herzwand (Dowdle et al. 2011). Meder et al. (2017) haben in ihrer Arbeit gezeigt, dass methyliertes *B9D1* als Biomarker für dilatative Kardiomyopathie genutzt werden kann. Die für die Analysen benötigte DNA wurde in ihren Versuchen aus Herzbiopsien und Blutproben gewonnen. Meder et al. (2017) vermuteten, dass fetal exprimierte Gene wie *B9D1* als Reaktion auf Stress bei der Entstehung von Herzinsuffizienz reaktiviert werden, wobei noch unklar ist, wie genau diese Reaktivierung stattfinden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wird untersucht, ob eine aberrante Promotormethylierung von *B9D1* mit der klinischen Progression von HFpEF assoziiert ist.

1.6. LAP

Die Leucin-Aminopeptidase (LAP) wurde von Weber et al. (2005) als Kontrollgen bereits etabliert. In der vorliegenden Arbeit wird das Gen als Positivkontrolle eingesetzt, um Störfaktoren in der experimentellen Methodik auszuschließen, da dieses Gen in Studien eine hohe Methylierung aufwies (Bechtel et al. 2010). LAP ist ein etabliertes Gen in der Diagnostik von Leberkrebs (Abouzied et al. 2015) und spielt eine Rolle als Zielstruktur in der Therapie von Ovarialkrebs (Mizutani et al. 2007).

1.7. Diagnosekriterien der Herzinsuffizienz

Verschiedene Organisationen haben Algorithmen vorgeschlagen, um Herzinsuffizienz bei Patienten zu identifizieren. Neben den Kriterien aus der Framingham-Studie (Ho et al. 1993), den Boston-Kriterien (Carlson et al. 1985) und den Gothenburg-Kriterien (Eriksson et al. 1987) dienen die ESC-Leitlinien (European Society of Cardiology 2016) in Deutschland zur Diagnostik. Neben einer $EF \geq 50\%$, werden diagnostische Kriterien wie Symptome und Zeichen von Herzinsuffizienz, die BNP- und NT-proBNP-Konzentration, der Ausschluss anderer Ursachen für die Symptomatik sowie bildgebende Verfahren herangezogen (Ponikowski et al. 2016; Yancy et al. 2013). Es ist bisher nicht möglich, jene Risikopatienten zu identifizieren, die durch eine rasche Progredienz der Krankheit früh versterben (Carson et al. 2015). Durch Ausnutzung der Vorteile einer *liquid biopsy*, die eine kostengünstige und wenig risikobehaftete Möglichkeit darstellt, DNA der Patienten zu gewinnen, die in ihren Eigenschaften mit der DNA im Herzgewebe übereinstimmt (Schwarzenbach et al. 2011; Tampe et al. 2015) sowie durch die Analyse der methylierten DNA-Fragmente im Blut mit anschließender statistischer Auswertung, sollen in dieser Arbeit Marker identifiziert werden, die diese Lücke schließen.

1.8. Zielsetzung

Bisher können Patienten mit HFpEF von jenen mit HFrEF durch die zuvor beschriebene Diagnostik unterschieden werden. Innerhalb der HFpEF-Patienten ist es jedoch bisher nicht möglich, diejenigen zu identifizieren, die durch eine rasche Progredienz zur hohen Mortalität von HFpEF beitragen. In der Literatur herrscht Einigkeit darüber, dass dies der zentrale Aspekt in der Erforschung des Krankheitsbilds HFpEF ist (Carson et al. 2015; Nanayakkara et al. 2018). Es konnte bereits gezeigt werden, dass aberrante Methylierung von CpG-Inseln

des *RASALI*-Gens zur Suppression von Transkription führt und mechanistisch für Fibrogenese im Myokard verantwortlich ist (Angrisano et al. 2014; Xu et al. 2015). Zudem konnte in unveröffentlichten Studien der Arbeitsgruppe der Zusammenhang zwischen hypermethylierten *Atp2a2*-Promotoren und Fibrose dargestellt werden. Ebenfalls ist bekannt, dass Fibrose mit der Progression chronischer Herzinsuffizienz assoziiert ist (Schelbert et al. 2014). Tampe et al. (2015) haben herausgefunden, dass methylierte Promoter-DNA aus verletzten Organen freigesetzt wird und im Blut detektiert werden kann. Bisher ist noch kein leicht messbarer Biomarker für Herzfibrose und die Progression von HFpEF gefunden. Studien haben gezeigt, dass der Grad an Fibrose eng mit der Mortalität assoziiert ist (Mascherbauer et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit dient die Mortalität bei HFpEF-Patienten als Korrelat für Fibrose, durch einen Mangel an myokardialen Biopsien. Hieraus ergeben sich folgende Fragestellungen, die als Ziel dieser Arbeit beantwortet werden sollen:

- a) Korrelieren die zu etablierenden Biomarker im Blut mit der Mortalität bei HFpEF-Patienten?
- b) Wenn eine Korrelation vorliegt, liefern die Biomarker Vorteile in der Erfassung des Mortalitätsrisikos gegenüber anderen klinischen Einflussgrößen?
- c) Korreliert die Methylierung im Blut mit dem Grad der diastolischen Dysfunktion, gemessen mit Hilfe der Echokardiographie (E/e')?

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Eismaschine	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, USA
Lichtmikroskop BX43	Olympus, Tokio, Japan
Multipette stream	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Nanodrop 2000 Spectrophotometer	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Pipette Reasearch Plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sonicator Misonix	Qsonica, Newtown, USA
StepOne Plus Real-Time PCR System	Appliedbiosystems, Life Technologies, Carlsbad, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex genie	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Vortex VWR Lap Dancer	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Wasserbad	Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge minispin	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge perfect spin	Peqlab, Erlangen, Deutschland

2.1.2. Software

cellSensDimension 1.6	Olympus, Tokio, Japan
Microsoft Office	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Nanodrop	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
GraphPad Software	GraphPad Software, La Jolla, USA
SPSS	IBM Corporation, Armonk, USA
StepOne v.2.3	Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, USA

2.1.3. Gebrauchsmaterialien

Benchtop Cooler 96 Tube	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Combitips advanced 1.0 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kunststoffschaber	3M, Minnesota, USA
MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate (0,1 ml)	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA

MicroAmp™ optical adhesive Film	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA
Parafilm M	Bemis, Neenah, USA
Pipettenspitzen Biosphere (10, 100, 1000µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen TipOne (10, 100, 1000µl)	Starlab, Hamburg, Deutschland
Safe-Lock Tubes 1,5 ml; 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.1.4. Chemikalien

Chloroform (Trichlormethan) EMSURE	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Fast SYBR™ Green Master Mix	Applied Biosystems, Life Tech., Carlsbad (CA), USA
Nukleasefreies Wasser	QIAGEN, Hilden, Deutschland

2.1.5. Kitsysteme

DNeasy Blood & Tissue Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Methylamp Methylated DNA Capture Kit (MeDIP)	Epigentek, Farmingdale, USA

2.1.6. Ansatz für rtPCR

Nukleasefreies Wasser	4,6 µl
Rückwärtsprimer 20µM	0,2 µl
SYBR Green Master Mix	10 µl
Vorwärtsprimer 20µM	0,2 µl

2.1.7. Primer für rtPCR

Tabelle 1: Primer für die rtPCR. Hersteller Microsynth, Balgach, Schweiz

Gen		Primersequenz
<i>RASAL1</i>	F	GCCAACTCACCAGGAGCCAGCGGC
	R	CTACCGGCACCCCAGTCATGCGC
<i>ATP2A2</i>	F	GGGCCCCAGAACCCGCTGGGG
	R	GGAGCTGGGAGCGCGGTCCAC
<i>B9D1</i>	F	CCGCCCCGAGAAAGCCACGCCTG
	R	GAGAGCTTCATGGGGACGCGC
<i>LAP</i>	F	CACCGTTGCACCTGTGGAACAG
	R	CGAGGTTTCACCATGTTGTCC

2.1.8. Patientenproben

Im Jahr 2004 wurde die Studie „Prävalenz und Verlauf der diastolischen Dysfunktion und der diastolischen Herzinsuffizienz“ (DIAST-CHF), eine prospektive Kohortenstudie mit zwei Patientenkollektiven und insgesamt 1660 Patienten, vom Kompetenznetz Herzinsuffizienz, gestartet. Den Patienten wurde zu verschiedenen Zeitpunkten Vollblut abgenommen und diverse Parameter zum Zeitpunkt Null (Baseline) sowie nach einem, zwei und nach fünf Jahren erhoben. Als Einschlusskriterien dienten entweder mindestens ein Risikofaktor für diastolische Dysfunktion, wie arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Schlafapnoesyndrom und Zeichen einer Arteriosklerose, oder die durch einen Arzt dokumentierte Diagnose Herzinsuffizienz. Die Studienpopulation wurde demnach in zwei Gruppen, A und B, unterteilt. Während Gruppe A keine Zeichen der klinischen Herzinsuffizienz zeigte, hatten Patienten der Gruppe B entweder bereits eine solche Diagnose erhalten oder wiesen klinische Zeichen der Herzinsuffizienz auf. Ein Alter zwischen 50 und 85 Jahren und eine schriftliche Einverständniserklärung waren zudem Bedingung für den Studieneinschluss. Mangelnde Kooperationsbereitschaft, unzureichende Kommunikationsfähigkeit aufgrund von fehlenden Deutschkenntnissen oder Aphasien, Erkrankungen mit Beeinträchtigung der Einwilligungsfähigkeit sowie geographische Gründe galten als Ausschlusskriterien. Die Klinik für Kardiologie und Pneumologie des Universitätsklinikums Göttingen stellte Vollblutproben von 47 Patienten für diese Arbeit zur Verfügung. Diese wiesen eine EF von $\geq 45\%$, $E/e' \geq 12$ sowie entweder Ödeme und Belastungsdyspnoe oder eine ärztliche Diagnose für Herzinsuffizienz auf. Die Ethikkommission hat der Studie im Juli 2004 zugestimmt; der Antrag mit der Nummer 22/2/04 liegt vor.

2.2. Methoden

2.2.1. DNA-Aufreinigung

Um die methylierten Anteile der humanen Promoter zu bestimmen, musste die DNA zunächst isoliert werden. Sie wurde aus den 47 EDTA-Vollblutproben der DIAST- Kohorte aufgereinigt. Zur Aufreinigung der DNA aus Humanblut wurde das Kit *DNeasy Blood & Tissue Kit* von QUIAGEN GmbH verwendet. Zunächst mussten in einem Safe-Lock Röhrchen je 200 μ l der Humanblutproben mit 20 μ l Proteinkinase K und 200 μ l AL Puffer aus dem Kit versetzt werden. Nach Mischung mit Hilfe des Vortex erfolgte eine Inkubation bei 56 °C und 450 rpm für 10-15 Minuten im Thermomixer comfort von Eppendorf. Danach

wurden 200 µl 100%-iges Ethanol zu den aufgeschlossenen Zellen gegeben und der gesamte Inhalt der Rhrchen auf eine Sule pipettiert, die in einem Rhrchen steckte. Nachdem die DNA fr eine Minute bei 8.000 rpm zentrifugiert worden war, musste die Sule auf ein neues Rhrchen berfhrt und die alte verworfen werden. Es folgten zwei Waschungen mit 500 µl AW1- bzw. AW2-Waschpuffer bei 8.000 rpm fr eine Minute bzw. 14.000 rpm fr drei Minuten. Zwischen den beiden Schritten musste der Durchfluss verworfen werden; nach der Waschung mit AW2 wurde die Sule auf ein beschriftetes Safe-Lock-Rhrchen gegeben. Im letzten Schritt wurde 200 µl AE Elutionspuffer direkt auf den Filter der Sule gegeben und eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einmintiger Zentrifugation bei 8.000 rpm konnte die Sule verworfen werden. Im Safe-Lock-Rhrchen befand sich am Ende die gereinigte DNA, die fr Messungen bentigt wurde. Mit Hilfe der Software NanoDrop konnte die Nukleinsurekonzentration jeder Probe bestimmt werden.

2.2.2. Konzentrationsmessung

Die Messung der DNA-Konzentration erfolgte mit Hilfe des *NanoDrop* Spektralphotometers, welches ber eine gleichnamige Software mit einem Computer verbunden war. Zunchst musste eine Blindprobe erstellt werden. Hierfr wurde 1 µl des zuvor verwendeten AE-Puffers auf den Sensor am unteren Arm des Gerts gegeben. Nachdem der Hebel geschlossen war, konnte die Messung mit der Auswahl „Blank“ im Computerprogramm gestartet werden. Nach Reinigung des Sensors durch ein faserfreies Tuch konnte 1 µl der ersten DNA-Probe auf den Sensor gegeben werden und die Konzentrationsmessung nach Schlieen des Hebels und Auswhlen der Menangabe „Measure“ erfolgen. Die Flssigkeit berbrckte den Abstand zwischen zwei optischen Faserkabeln, die im oberen und unteren Arm des Gertes installiert sind. Die whrend der Messung durch die Probe gesendeten Lichtblitze wurden in einem Spektralphotometer aufgefangen und in der Software verrechnet. Der Reinheitsgrad der DNA konnte ermittelt werden, indem die Absorptionskoeffizienten bei 260 und 280 nm ins Verhltnis gesetzt wurden. Bei reiner DNA erhlt man ein Verhltnis von ~1,8. Abweichungen konnten durch Verunreinigungen zustande kommen (nach Anleitung von Thermo Fisher Scientific). Die Konzentration der Probe lie sich aus der Software ablesen.

2.2.3. Methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP)

Bei dieser Methode wurde die methylierte DNA mit Hilfe eines Antikrpers angereichert, der an 5-Methylcytosin (5mC) der zuvor gewonnenen DNA band (Weber et al. 2005). Zunchst verdnnte man die DNA mit dem Reaktionspuffer MC2 aus dem *Methylamp*

Methylated DNA Capture Kit in einer Safe-Lock-Tube. Dieser Schritt stellte sicher, dass in jeder Probe dieselbe Konzentration DNA vorhanden war. Gemäß vorangegangenen Berechnungen wurden beide Flüssigkeiten gemischt, sodass eine Konzentration von 500 ng DNA in 108 µl Volumen in jeder Probe vorhanden war. Im nächsten Schritt musste die DNA mit Hilfe des Sonicators Misonix in 20 Amplituden in kleinere Fragmente gespalten werden. Zwischen jedem Sonifikationsschritt wurde die DNA auf Eis gekühlt, das zu Beginn mit ins Gerät gegeben worden war. Die 200-1000 bp großen DNA-Fragmente wurden folgend bei 95 °C zwei Minuten lang denaturiert, sodass Einzelstränge entstanden. Ein anschließendes Abkühlen auf Eis verhinderte, dass sich die Stränge wieder zusammenlagerten. Während die DNA fragmentiert und denaturiert wurde, wurden jeweils 1 µl Anti-5-Methylcytosin und 100 µl des Antikörperpuffers MC1 aus dem Kit in eine Platte mit 8-Well-Assay-Strips pipettiert und verschlossen mit Parafilm für 60 Minuten bei Raumtemperatur und 50 rpm inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Überstand aus MC1 und Anti-5-Methylcytosin verworfen und die Probenplatte zweimal mit 150 µl Antikörperpuffer MC1 bzw. Waschpuffer MC3 gewaschen. In jede Plattenvertiefung wurden 100 µl fragmentierte DNA gegeben und die Platte mit Parafilm abgedeckt. Anschließend erfolgte eine zweistündige Inkubation auf dem *Belly Dancer* auf Stufe 7 (50-100 rpm). Während dieser Zeit wurde die fragmentierte und denaturierte DNA an den Antikörper gebunden, der die DNA somit im Gefäß fixierte. Nach der Inkubation konnte der Überstand, der die nicht gebundene DNA enthielt, verworfen werden. Nach dreimaliger Waschung der Plattenvertiefungen mit jeweils 150 µl Waschpuffer MC3, wurden 60 µl eines Mix, der sich aus Proteinkinase K und DNA-Lösungspuffer MC4 zusammensetzte, in jedes Well gegeben. Die Reaktionsansätze wurden dann mit einem Deckel aus dem Kit verschlossen und 60 Minuten in einem 65 °C warmen Wasserbad inkubiert.

Zusätzlich zu der an den Antikörper gebundenen, methylierten DNA, musste eine Ladekontrolle angefertigt werden, die zum Vergleich diente, sodass später quantitative Aussagen über den Grad der Methylierung gemacht werden konnten. Für diese Ladekontrollen wurden 5 µl der DNA aus dem Sonicator in ein frisches Safe-Lock-Tube überführt und mit 60 µl des Mastermix aus Proteinkinase K und DNA-Lösungspuffer MC4 versetzt. Der Input wurde ebenfalls 60 Minuten bei 65 °C im Wasserbad inkubiert. Im Gegensatz zur Antikörper-gebundenen DNA wurden diese Proben nicht an Antikörper gebunden, sodass hier am Ende die genomische DNA vorhanden war. Die folgenden Schritte wurden sowohl für den Input als auch für die ursprüngliche Antikörper-gebundene DNA ausgeführt.

Entsprechend der Anzahl der Proben erfolgte die Vorbereitung der Zentrifugenröhrchen: Es wurde jeweils eine Säule in einen Tube gesteckt und 100 µl Bindungspuffer MC5 auf die Säule gegeben. Anschließend konnte der Inhalt der Probenansätze mit jeweils 180 µl 100%-igem Ethanol gemixt und auf die Säule gegeben werden. Dann erfolgte eine Zentrifugation für 20 Sekunden bei 12.000 rpm. Der Inhalt, der dadurch in die Sammelröhrchen gelangte, wurde verworfen und die Säule wieder in die Sammelröhrchen gesteckt. Es schlossen sich zwei weitere Zentrifugationen bei 12.000 rpm für 20 bzw. 35 Sekunden an, nachdem jeweils 200 µl 90%-iges Ethanol auf die Säule gegeben wurden. Nach dem letzten Durchlauf konnte das Sammelröhrchen verworfen und die Säule auf ein vorher beschriftetes Safe-Lock-Tube gesetzt werden. Der Elutionspuffer MC6 (20 µl) wurde direkt auf den Filter der Säule pipettiert und wirkte eine Minute ein. Eine abschließende Zentrifugation für 20 Sekunden bei 12.000 rpm ließ die gereinigte, methylierte DNA in das Safe-Lock-Tube gelangen. Die Säule wurde verworfen, die Proben mit 80 µl nukleasefreiem Wasser versetzt und anschließend bis zur Verwendung für die rtPCR bei -20 °C eingefroren.

2.2.4. Quantitative Realtime-PCR (rtPCR)

Die Realtime-Polymerasekettenreaktion (rtPCR) basiert auf der von Mullis und Faloona 1987 beschriebenen Polymerasekettenreaktion (Mullis und Faloona 1987). Zusätzlich zur Denaturierungs-, Annealing- und Elongationsphase ermöglichte die rtPCR eine Echtzeit-Quantifizierung der DNA. Dies wurde durch einen Farbstoff erreicht, der an die DNA bindet. Durch Messung der Fluoreszenz konnte die DNA-Menge bestimmt werden (Higuchi et al. 1992). Alternativ zu dem von Higuchi et al. verwendeten Ethidiumbromid wurde der Farbstoff SYBR-Green gebraucht. Dieser gestattete nicht nur eine Analyse der DNA-Menge am Ende der PCR, sondern eine Messung der Doppelstrang-DNA in jedem Zyklus (Wittwer et al. 2013).

Zunächst wurden die Wells mit insgesamt 20 µl befüllt. Diese 20 µl setzen sich zusammen aus 5 µl DNA bzw. Input, 10 µl SYBR-Green, 4,6 µl nukleasefreiem Wasser und 0,4 µl Primer (je 0,2 µl 20 µM Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer). Für jede Probe wurden Triplets angelegt. Nach kurzer Zentrifugation wurde die Platte mit den Proben in das *StepOne Plus Real-Time PCR System* gegeben und Einstellungen in der gleichnamigen Software vorgenommen. Unter „Experiment Properties“ wurde die Einstellung „Quantitation – Comparative CT ($\Delta\Delta CT$)“ gewählt und eingestellt, dass SYBR Green verwendet wurde. Nach einer initialen Denaturierung für 20 Sekunden bei 95 °C folgten drei Sekunden bei 95 °C und 30 Sekunden bei der Annealingtemperatur des Primers (*RASALI*: 60 °C, *ATP2A2*: 66 °C; *B9DI*: 62 °C; *LAP*: 60 °C). Dieser Zyklus wurde fünfzigmal wiederholt.

Als Ergebnis erhielt man den Ct-Wert. Dieser gab die benötigte Zykluszahl an, bis genügend SYBR Green gebunden war, damit sich die Probe farblich abhob. Je mehr (methylierte) DNA in der Probe vorhanden war, desto früher war dieser Punkt erreicht und umso kleiner war folglich Ct. Vergleich man den Ct-Wert des Inputs mit dem der methylierten DNA, so erhielt man Aufschluss darüber, wie hoch der Grad der Methylierung war. Hierfür wurde der Ct-Wert des Inputs von dem der DNA subtrahiert. Die Differenz, dCt, konnte anschließend in die Formel $\frac{2^{-dCt}}{20}$ eingesetzt werden, um die relative Genexpression zu erhalten.

2.2.5. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit den Programmen MS Office, SPSS und „GraphPad Prism 6“. Zusammen mit den Blutproben der 47 Patienten, wurden zu Beginn der DIAST-Studie von jedem Patienten zahlreiche Daten erhoben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde aus dem Grunddatensatz ein Basisdatensatz übernommen, der die Kohorte beschreibt. Die in Tabelle 2 und Tabelle 3 dargestellten Parameter charakterisierten die Patienten zum Zeitpunkt Baseline.

Tabelle 2: Basisdatensatz der Kohorte I. Numerische Parameter, die für die Baselinecharakterisierung ausgewertet wurden.

numerisch	Einheit
LVEF	%
Alter	Jahre
Body-Mass-Index	kg/m ²
RR systolisch	mmHg
RR diastolisch	mmHg
Herzfrequenz	1/min
Taillenumfang	cm
Hüftumfang	cm
NYHA-Klasse	
Hinterwand	mm
LDL-Cholesterin	mmol/l
HDL-Cholesterin	mmol/l
PQ-Zeit	ms
QRS-Dauer	ms
QT-Zeit	ms
E/e'	
NT-proBNP	pg/ml
BNP	pg/ml
Überleben	Tage
Krea-Clearance	ml/min

Tabelle 3: Basisdatensatz der Kohorte II. Kategoriale Parameter, die für die Baselinecharakterisierung ausgewertet wurden.

kategorial
LSB
RSB
AV-Block
RV-Dilatation
Betablocker
KHK
Rauchen
Hypertonie
Herzinsuffizienz
Geschlecht
Z. n. Myokardinfarkt
Diabetes
Tod

Da die Messwerte der Promotormethylierung der in dieser Arbeit untersuchten Gene nicht normalverteilt waren, musste zunächst eine Logarithmierung der Werte durchgeführt werden. Die logarithmierten Werte erfüllten die Bedingungen für die anschließenden

statistischen Tests. Im Rahmen der epidemiologischen Charakterisierung wurden für alle numerischen Parameter zunächst Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (SD = standard deviation) der gesamten Kohorte ermittelt. Zusätzlich wurde ein Mediansplit bezogen auf die methylierten Gene *RASAL1*, *ATP2A2* und *B9DI* durchgeführt und der Mittelwert $\pm$ SD ober- und unterhalb des Splits ermittelt. Der Student-t-Test ermöglichte den Vergleich der Werte. Die Beschreibung der nicht numerischen Parameter erfolgte durch Häufigkeitstabellen. Mittelwert $\pm$ SD ober- und unterhalb des Mediansplits wurden durch Kreuztabellen ermittelt. Der χ^2 -Test nach Pearson berechnete den p-Wert. Für die Analyse und Darstellung der Überlebenszeit wurden Kaplan-Meier-Kurven und Log-rank-Tests verwendet, nachdem der Grenzwert (Cutoff) mit optimaler Sensitivität und Spezifität mittels ROC-Analyse gefunden worden war. Für die vier untersuchten Gene diente der Mediansplit als Cutoff in der Kaplan-Meier-Analyse. Die Cox-Regression fand Anwendung in der multivariaten Analyse. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant definiert und mit dem Symbol * für $p < 0,05$ gekennzeichnet.

3. Ergebnisse

3.1. Detektion intervariabler Abhängigkeiten sowie Assoziation mit dem Überleben

3.1.1. Charakterisierung der Studienkohorte

Die Kohorte umfasste 47 Patienten, mit den Einschlusskriterien einer EF von $\geq 45\%$, $E/e' \geq 12$ sowie entweder Ödeme und Belastungsdyspnoe oder die ärztliche Diagnose einer Herzinsuffizienz. Insgesamt waren 32 Studienteilnehmer (68,1%) weiblich und 15 (31,9%) männlich. Das mittlere Alter betrug zum Zeitpunkt der Erhebung 73,1 ($\pm 8,8$) Jahre. Der durchschnittliche Body-Mass-Index (BMI) lag bei 32,4 ($\pm 7,2$) kg/m², was das Kollektiv im Mittel als Adipositas Grad I einstuft. Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion lag im Mittel bei 59,7% ($\pm 6,9\%$), womit im Durchschnitt eine erhaltene Ejektionsfraktion vorlag. Die durchschnittliche Kreatinin-Clearance (Krea-Clearance) betrug 73 (± 35) ml/min. Unter den Patienten waren 13 (27,7%) Diabetiker, 44 (93,6%) hatten eine arterielle Hypertonie und 20 (43%) waren Raucher.

Um eine Normalverteilung der Daten zu erhalten, wurden die Methylierungswerte der Gene logarithmiert. Wenn nicht anders vermerkt, wird im Folgenden auf die logarithmierten Werte Bezug genommen.

In der Studie betrug das durchschnittliche Überleben 3129 (± 1225) Tage, was ungefähr 8,6 ($\pm 3,3$) Jahren entspricht. Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied ober- und unterhalb des *RASALI*-Mediansplits (Mediansplit *RASALI*=-2,1487). Die Patienten mit einer *RASALI*-Promotormethylierung oberhalb des Medians starben im Durchschnitt nach 2707 (± 1304) Tagen [7,4 ($\pm 3,6$) Jahre], während die Patienten unterhalb des Medians erst nach 3569 (± 982) Tagen [10 ($\pm 2,3$) Jahre] starben. Hier ist ein statistisch signifikantes ($p=0,014$) längeres Überleben von Patienten mit niedrigerer *RASALI*-Promotormethylierung zu beobachten (Tabelle 4). Passend hierzu ließ sich ein signifikanter Unterschied ($p=0,012$) im Tod ober- und unterhalb des Mediansplits beobachten. Es starben 62,5% der Patienten mit einer *RASALI*-Methylierung oberhalb des Mediansplits, während nur 26,1% mit einer Methylierung unterhalb des Mediansplits starben. Von allen Patienten wurde bei 61,7% vor Beginn der Studie die Diagnose Herzinsuffizienz vom Arzt gestellt bzw. Symptome der Herzinsuffizienz festgestellt, 18 Patienten (38,3%) hatten keine Zeichen der klinischen Herzinsuffizienz. Hier unterschied sich die Diagnosehäufigkeit der Gruppe unterhalb des Mediansplits (78,3%) signifikant ($p=0,02$) von der Gruppe oberhalb, in der lediglich 45,8% die Diagnose vorab erhalten hatten. Bei den Patienten, bei denen keine Herzinsuffizienz

vorab diagnostiziert wurde bzw. bei denen keine Zeichen für eine Herzinsuffizienz vorlagen, konnte bei 54,2% eine erhöhte Methylierung nachgewiesen werden. Somit hat die Mehrheit der Patienten mit einer Methylierung oberhalb des Mediansplits keine Zeichen einer Herzinsuffizienz (Tabelle 5).

Tabelle 4: Charakterisierung der Studienkohorte anhand des *RASALI*-Mediansplits I. Für jeden numerischen Parameter wurden Mittelwert und SD insgesamt, sowie ober- und unterhalb des *RASALI*-Mediansplits berechnet. Die p-Werte wurden durch einen t-Test ermittelt.

	Einheit	<i>RASALI</i>			
		gesamt	< Mediansplit	> Mediansplit	p-Wert
		[Mittelwert $\pm$ Standardabweichung]			
LVEF	%	59,7 $\pm$ 6,9	58,6 $\pm$ 7,1	50,7 $\pm$ 6,7	0,302
Alter	Jahre	73,1 $\pm$ 8,8	71,4 $\pm$ 8,2	74,7 $\pm$ 9,2	0,195
Body-Mass-Index	kg/m ²	32,4 $\pm$ 7,2	33,5 $\pm$ 8,3	31,4 $\pm$ 6,1	0,335
RR systolisch	mmHg	151,5 $\pm$ 25,6	144,9 $\pm$ 22,7	157,6 $\pm$ 27,1	0,093
RR diastolisch	mmHg	79,0 $\pm$ 13,2	76,2 $\pm$ 13,3	81,7 $\pm$ 12,8	0,160
Herzfrequenz	1/min	71,6 $\pm$ 12,5	70,2 $\pm$ 15,0	73,0 $\pm$ 9,7	0,457
Taillenumfang	cm	105,6 $\pm$ 18,5	110,0 $\pm$ 21,2	101,8 $\pm$ 15,3	0,138
Hüftumfang	cm	114,2 $\pm$ 14,9	118,6 $\pm$ 16,2	110,4 $\pm$ 12,9	0,064
NYHA-Klasse		2,0 $\pm$ 0,7	1,94 $\pm$ 0,8	2,2 $\pm$ 0,6	0,394
Hinterwand	mm	11,8 $\pm$ 1,6	11,8 $\pm$ 1,9	11,8 $\pm$ 1,3	0,945
LDL-Cholesterin	mmol/l	120,1 $\pm$ 28,8	116,8 $\pm$ 19,4	123,2 $\pm$ 35,4	0,455
HDL-Cholesterin	mmol/l	52,4 $\pm$ 14,9	50,2 $\pm$ 13,9	54,4 $\pm$ 15,8	0,345
PQ-Zeit	ms	165,9 $\pm$ 50,1	162,6 $\pm$ 45,7	168,7 $\pm$ 54,6	0,710
QRS-Dauer	ms	94,6 $\pm$ 17,2	97,2 $\pm$ 17,12	92,00 $\pm$ 17,15	0,302
QT-Zeit	ms	404,3 $\pm$ 44,4	407,5 $\pm$ 51,1	401,17 $\pm$ 37,61	0,629
E/e'		16,1 $\pm$ 5,9	14,5 $\pm$ 2,1	17,6 $\pm$ 7,9	0,080
NT-proBNP	pg/ml	671,0 $\pm$ 1112,3	585,8 $\pm$ 670,1	752,8 $\pm$ 1425,0	0,612
BNP	pg/ml	182,4 $\pm$ 192,6	147,9 $\pm$ 138,2	215,5 $\pm$ 231,4	0,233
Überleben	Tage	3129 $\pm$ 1225	3569 $\pm$ 982	2707 $\pm$ 1304	0,014*
Krea-Clearance	ml/min	73,0 $\pm$ 35,0	77,72 $\pm$ 34,7	68,5 $\pm$ 33,3	0,384

Tabelle 5: Charakterisierung der Studienkohorte anhand des *RASALI*-Mediansplits II. Für die kategorialen Parameter wurden absolute und relative Häufigkeiten der Gesamtkohorte sowie ober- und unterhalb des *RASALI*-Mediansplits berechnet. Der p-Wert wurde mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests ermittelt.

		<i>RASALI</i>		
	gesamt	< Mediansplit	> Mediansplit	p-Wert
	n [%]			
LSB	3 (6,4%)	1 (4,3%)	2 (8,3%)	0,580
RSB	4 (8,5%)	3 (13%)	1 (4,2%)	0,276
AV-Block	5 (10,6%)	3 (13%)	2 (8,3%)	0,600
RV-Dilatation	7 (14,9%)	5 (21,7%)	2 (8,3%)	0,197
Betablocker	26 (55,3%)	13 (56,5%)	13 (54,2%)	0,870
KHK	14 (29,8%)	5 (21,7%)	9 (37,5%)	0,238
Rauchen	20 (43%)	10 (45,5%)	10 (41,7%)	0,796
Hypertonie	44 (93,6%)	21 (91,3%)	23 (95,8%)	0,525
Herzinsuffizienz	29 (61,7%)	18 (78,3%)	11 (45,8%)	0,022*
Geschlecht	w: 32 (68,1%)	15 (65,2%)	17 (70,8%)	0,680
Z. n. Myokardinfarkt	4 (8,5%)	1 (4,3%)	3 (12,5%)	0,317
Diabetes	13 (27,7%)	6 (26,1%)	7 (29,2%)	0,810
Tod	21 (44,7%)	6 (26,1%)	15 (62,5%)	0,012*

Bezogen auf das Überleben zeigten auch die anderen betrachteten Gene einen signifikanten Unterschied ober- und unterhalb des Mediansplits. Die Patienten mit einer *ATP2A2*-Promotormethylierung oberhalb des Mediansplits (Mediansplit *ATP2A2*=-2,3665) überlebten durchschnittlich 2553 ($\pm$ 1308) Tage [7 ($\pm$ 3,6) Jahre] und unterschieden sich damit signifikant ($p=0,001$) von der Kohorte unterhalb des Mediansplits, die im Durchschnitt nach 3681 ($\pm$ 846) Tagen [10,1 ($\pm$ 2,3) Jahre] starben. Zusätzlich unterschied sich das Alter der Patienten signifikant ($p=0,018$) ober- und unterhalb des *ATP2A2*-Mediansplits. Patienten oberhalb waren mit durchschnittlich 76,1 ($\pm$ 7,8) Jahren älter als die Patienten unterhalb des Mediansplits mit durchschnittlich 70,1 ($\pm$ 8,9) Jahren (Tabelle 6). Bezogen auf den Tod zeigte sich eine signifikant ($p=0,001$) höhere Sterbequote oberhalb des Mediansplits mit 69,6%, als unterhalb mit 20,8% (Tabelle 7).

Tabelle 6: Charakterisierung der Studienkohorte anhand des ATP2A2-Mediansplits I. Für jeden numerischen Parameter wurden Mittelwert und SD ober- und unterhalb des ATP2A2-Mediansplits berechnet. Die p-Werte wurden durch einen t-Test ermittelt.

	Einheit	ATP2A2		
		< Mediansplit	> Mediansplit	p-Wert
		[Mittelwert $\pm$ Standardabweichung]		
LVEF	%	60,0 $\pm$ 7,0	59,3 $\pm$ 6,9	0,719
Alter	Jahre	70,1 $\pm$ 8,9	76,1 $\pm$ 7,8	0,018*
Body-Mass-Index	kg/m ²	34,2 $\pm$ 8,3	30,6 $\pm$ 5,6	0,091
RR systolisch	mmHg	147,0 $\pm$ 22,1	156,0 $\pm$ 28,4	0,237
RR diastolisch	mmHg	76,7 $\pm$ 14,1	81,4 $\pm$ 12,0	0,222
Herzfrequenz	l/min	72,5 $\pm$ 14,8	70,8 $\pm$ 9,9	0,650
Taillenumfang	cm	110,6 $\pm$ 21,4	100,8 $\pm$ 14,1	0,081
Hüftumfang	cm	118,1 $\pm$ 16,6	110,5 $\pm$ 12,3	0,085
NYHA-Klasse		2,1 $\pm$ 0,8	1,9 $\pm$ 0,7	0,474
Hinterwand	mm	11,7 $\pm$ 2,0	11,9 $\pm$ 1,0	0,676
LDL-Cholesterin	mmol/l	115,2 $\pm$ 22,4	125,0 $\pm$ 33,8	0,251
HDL-Cholesterin	mmol/l	52,6 $\pm$ 16,1	52,2 $\pm$ 13,9	0,930
PQ-Zeit	ms	163,9 $\pm$ 42,7	167,9 $\pm$ 58,0	0,807
QRS-Dauer	ms	95,2 $\pm$ 17,4	93,9 $\pm$ 17,2	0,805
QT-Zeit	ms	399,9 $\pm$ 48,3	408,9 $\pm$ 40,5	0,493
E/e'		15,2 $\pm$ 4,2	16,9 $\pm$ 7,4	0,321
NT-proBNP	pg/ml	509,5 $\pm$ 578,7	839,6 $\pm$ 1476,0	0,314
BNP	pg/ml	133,0 $\pm$ 121,3	234,1 $\pm$ 238,2	0,078
Überleben	Tage	3681 $\pm$ 846	2553 $\pm$ 1308	0,001*
Krea-Clearance	ml/min	81,4 $\pm$ 40,0	64,5 $\pm$ 27,5	0,102

Tabelle 7: Charakterisierung der Studienkohorte anhand des ATP2A2-Mediansplits II. Für die kategorialen Parameter wurden absolute und relative Häufigkeiten ober- und unterhalb des ATP2A2-Mediansplits berechnet. Der p-Wert wurde mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests ermittelt.

	ATP2A2		
	< Mediansplit	> Mediansplit	p-Wert
	n [%]		
LSB	1 (4,2%)	2 (8,7%)	0,525
RSB	3 (12,5%)	1 (4,3%)	0,317
AV-Block	2 (8,3%)	3 (13,0%)	0,601
RV-Dilatation	5 (20,8%)	2 (8,7%)	0,243
Betablocker	11 (45,8%)	15 (65,2%)	0,181
KHK	6 (25,0%)	8 (34,8%)	0,464
Rauchen	11 (47,8%)	9 (39,1%)	0,552
Hypertonie	22 (91,7%)	22 (95,7%)	0,576
Herzinsuffizienz	17 (70,8%)	12 (52,2%)	0,188
Geschlecht	16 (66,7%)	16 (69,6%)	0,831
Z. n. Myokardinfarkt	1 (4,2%)	3 (13%)	0,276
Diabetes	7 (29,2%)	6 (26,1%)	0,813
Tod	5 (20,8%)	16 (69,6%)	0,001*

Ebenso unterschied sich das Überleben der Patienten mit einer *B9DI*-Promotormethylierung oberhalb des Mediansplits (Mediansplit *B9DI*=-1,6077) mit durchschnittlich 2667 (± 1260) Tagen [7,3 ($\pm 3,5$) Jahren] signifikant ($p=0,007$) vom Überleben unterhalb des Mediansplits, welches durchschnittlich bei 3610 (± 1002) Tagen [9,9 ($\pm 2,7$) Jahre] lag. Bezogen auf die Methylierung des *B9DI*-Promotors ließ sich bei niedrigerem Methylierungsgrad ein längeres Überleben beobachten (Tabelle 8). Ebenfalls signifikant ($p=0,002$) verhielt sich die Anzahl der Todesfälle ober- und unterhalb des Mediansplits. So starben nur 21,7% der Patienten mit einer Methylierung unterhalb des Splits, während 66,7% mit einer Methylierung oberhalb starben (Tabelle 9). Ergänzend konnte ein signifikanter Unterschied ($p=0,031$) des Taillenumfanges ober- und unterhalb des Mediansplits festgestellt werden (Tabelle 8). Insgesamt wurde bei vier Patienten ein Rechtschenkelblock festgestellt. Alle diese Patienten wiesen eine *B9DI*-Methylierung unterhalb des Mediansplits auf ($p=0,033$) und machten einen Anteil von 17,4% der Patienten unterhalb aus (Tabelle 9).

Tabelle 8: Charakterisierung der Studienkohorte anhand des *B9DI*-Mediansplits I. Für jeden numerischen Parameter wurden Mittelwert und SD ober- und unterhalb des *B9DI*-Mediansplits berechnet. Die p-Werte wurden durch einen t-Test ermittelt.

	Einheit	<i>B9DI</i>		
		< Mediansplit	> Mediansplit	p-Wert
		[Mittelwert $\pm$ Standardabweichung]		
LVEF	%	59,8 $\pm$ 6,9	59,5 $\pm$ 7,1	0,890
Alter	Jahre	70,9 $\pm$ 8,0	75,1 $\pm$ 9,3	0,103
Body-Mass-Index	kg/m ²	33,7 $\pm$ 8,5	31,1 $\pm$ 5,7	0,226
RR systolisch	mmHg	148,7 $\pm$ 29,0	154,1 $\pm$ 22,4	0,481
RR diastolisch	mmHg	78,5 $\pm$ 13,1	79,5 $\pm$ 13,5	0,792
Herzfrequenz	l/min	72,3 $\pm$ 15,3	71,0 $\pm$ 9,4	0,747
Taillenumfang	cm	111,9 $\pm$ 20,3	100,1 $\pm$ 15,2	0,031*
Hüftumfang	cm	118,5 $\pm$ 16,5	110,5 $\pm$ 12,6	0,070
NYHA-Klasse		2,17 $\pm$ 0,7	1,9 $\pm$ 0,8	0,431
Hinterwand	mm	11,7 $\pm$ 1,9	12,0 $\pm$ 1,3	0,651
LDL-Cholesterin	mmol/l	121,2 $\pm$ 28,9	119,1 $\pm$ 29,3	0,808
HDL-Cholesterin	mmol/l	51,6 $\pm$ 14,9	53,1 $\pm$ 15,2	0,739
PQ-Zeit	ms	160,3 $\pm$ 44,1	171,1 $\pm$ 55,9	0,509
QRS-Dauer	ms	95,7 $\pm$ 19,3	93,4 $\pm$ 15,2	0,648
QT-Zeit	ms	400,5 $\pm$ 47,5	407,9 $\pm$ 41,9	0,571
E/e'		14,6 $\pm$ 2,9	17,4 $\pm$ 7,6	0,109
NT-proBNP	pg/ml	525,8 $\pm$ 706,5	810,2 $\pm$ 1398,4	0,387
BNP	pg/ml	156,9 $\pm$ 160,7	206,9 $\pm$ 219,6	0,379
Überleben	Tage	3610 $\pm$ 1002	2667 $\pm$ 1260	0,007*
Krea-Clearance	ml/min	76,9 $\pm$ 35,6	69,4 $\pm$ 35,0	0,474

Tabelle 9: Charakterisierung der Studienkohorte anhand des *B9D1*-Mediansplits II. Für die kategorialen Parameter wurden absolute und relative Häufigkeiten ober- und unterhalb des *B9D1*-Mediansplits berechnet. Der p-Wert wurde mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests ermittelt.

	<i>B9D1</i>		
	< Mediansplit	> Mediansplit	p-Wert
	n [%]		
LSB	1 (4,3%)	2 (8,3%)	0,576
RSB	4 (17,4%)	0 (0%)	0,033*
AV-Block	2 (8,7%)	3 (12,5%)	0,672
RV-Dilatation	4 (17,4%)	3 (12,5%)	0,638
Betablocker	13 (56,5%)	13 (54,2%)	0,871
KHK	5 (21,7%)	9 (37,5%)	0,238
Rauchen	10 (45,5%)	10 (41,7%)	0,796
Hypertonie	21 (91,3%)	23 (95,8%)	0,525
Herzinsuffizienz	12 (52,2%)	17 (70,8%)	0,188
Geschlecht	16 (69,6%)	16 (66,7%)	0,831
Z. n. Myokardinfarkt	3 (13%)	1 (4,2%)	0,276
Diabetes	7 (30,4%)	6 (25,0%)	0,677
Tod	5 (21,7%)	16 (66,7%)	0,002*

Für alle weiteren Patientenparameter ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ober- und unterhalb des Mediansplits feststellen. Die detaillierten Angaben zur Charakterisierung der Stichprobe zeigen Tabelle 4 - Tabelle 9.

3.1.2. Korrelation der Promotormethylierung mit Patientenparametern

Im nächsten Schritt wurde jeder Parameter mit der Promotormethylierung jedes Gens korreliert. Für das Überleben in Tagen ergab sich eine statistisch signifikante Korrelation mit der Promotormethylierung der drei Gene *RASAL1*, *ATP2A2* und *B9D1* (Abbildung 1 A-C). Zudem korreliert BNP signifikant ($p=0,025$) mit der Methylierung der *ATP2A2*-Promotoren (Abbildung 1 D), während E/e' und Taillenumfang signifikant ($p=0,016$ bzw. $p=0,042$) mit der *B9D1*-Methylierung korrelieren (Abbildung 1 E-F; Tabelle 10). Das Kontrollgen *LAP* korreliert zwar signifikant mit der NYHA-Klasse und BNP, nicht jedoch mit dem Überleben der Patienten. Für alle weiteren Parameter ließ sich keine signifikante Korrelation mit LAP feststellen.

Tabelle 10: Korrelationsanalyse der numerischen Parameter mit *RASAL1*, *ATP2A2*, *B9D1* und *LAP*.
Der Pearson-Korrelationskoeffizient sowie der im t-Test ermittelte p-Wert stellen Zusammenhänge zwischen Parametern und Genen dar.

	<i>RASAL1</i>		<i>ATP2A2</i>		<i>B9D1</i>		<i>LAP</i>	
	r	p-Wert	r	p-Wert	r	p-Wert	r	p-Wert
LVEF	0,140	0,350	0,091	0,544	0,112	0,455	0,163	0,274
Alter	0,233	0,114	0,240	0,104	0,236	0,110	0,174	0,244
Body-Mass-Index	- 0,209	0,163	- 0,276	0,063	- 0,183	0,223	- 0,115	0,448
RR systolisch	0,142	0,348	- 0,009	0,952	0,020	0,895	- 0,209	0,163
RR diastolisch	0,131	0,387	0,123	0,414	- 0,006	0,969	- 0,030	0,844
Herzfrequenz	0,139	0,358	0,058	0,702	0,000	1,000	0,207	0,167
Taillenumfang	- 0,230	0,129	- 0,244	0,106	- 0,305	0,042*	- 0,122	0,425
Hüftumfang	- 0,241	0,111	- 0,208	0,171	- 0,217	0,152	- 0,084	0,583
NYHA-Klasse	0,163	0,407	0,186	0,342	0,006	0,976	0,393	0,039*
Hinterwand	0,017	0,911	0,009	0,953	0,015	0,920	0,053	0,725
LDL-Cholesterin	- 0,045	0,765	0,094	0,534	0,124	0,411	- 0,074	0,625
HDL-Cholesterin	- 0,059	0,699	- 0,075	0,619	0,021	0,891	- 0,193	0,198
PQ-Zeit	- 0,088	0,593	- 0,088	0,594	- 0,133	0,418	0,070	0,674
QRS-Dauer	- 0,164	0,270	- 0,067	0,656	- 0,112	0,452	0,050	0,741
QT-Zeit	- 0,042	0,780	0,034	0,818	0,103	0,491	- 0,005	0,972
E/e'	0,200	0,177	0,129	0,387	0,351	0,016*	0,078	0,601
NT-proBNP	0,149	0,316	0,251	0,089	0,102	0,497	0,236	0,110
BNP	0,207	0,162	0,326	0,025*	0,202	0,173	0,355	0,014*
Überleben	- 0,425	0,003*	- 0,467	0,001*	- 0,292	0,046*	- 0,131	0,379
Krea-Clearance	- 0,087	0,567	- 0,107	0,478	- 0,099	0,514	- 0,003	0,984

Abbildung 1: Veranschaulichung der signifikanten Korrelationen mit Hilfe linearer Regression. Die Gene (A) *RASAL1*, (B) *ATP2A2* und (C) *B9D1* zeigen einen signifikanten Zusammenhang mit dem Überleben. (D) *ATP2A2* und BNP zeigen eine signifikante Korrelation. (E, F) *B9D1* korreliert signifikant mit E/e' und dem Taillenumfang.

3.1.3. Identifizierung von Überlebenszeit-beeinflussenden Parametern

In der Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Meier sollte ermittelt werden, ob ein Unterschied im Überleben von der Ausprägung der analysierten Merkmale abhängt. Um zwei Gruppen vergleichen zu können, wurden zunächst alle Patientencharakteristika in jeweils zwei Gruppen unterteilt. Zunächst wurde mit Hilfe einer *Receiver Operating Characteristic-Kurve* (ROC-Kurve) der Wert je Parameter bestimmt, der über die höchste Sensitivität und Spezifität verfügt. Dieser Wert wurde als Grenze definiert, der die Werte in zwei Bereiche unterteilt: kleiner als (<) der Grenzwert (Cutoff) und größer als (>) Cutoff. Nachdem die Kohorte geteilt worden war, erfolgte die Analyse der Überlebenszeit für alle drei Gruppen (</> und gesamt) mit Hilfe von Kaplan-Meier-Kurven. Die detaillierten Ergebnisse der ROC-Kurven-Analyse werden in Tabelle 11 dargestellt. Abbildung 2 zeigt ausgewählte ROC-Kurven, um die Auswahl des Cutoffs zu veranschaulichen. Bei den nicht numerischen Parametern musste vorab keine ROC-Kurven-Analyse erfolgen, da die Werte natürlich in zwei Gruppen geteilt waren (Merkmal vorhanden, Merkmal nicht vorhanden).

Tabelle 11: ROC-Analyse. Unter Maximierung der Sensitivität und Spezifität wurde der Cutoff ermittelt.

	Sensitivität[%]	Spezifität[%]	Cutoff	n < Cutoff	n > Cutoff
LVEF	57,1	61,5	58,5	22	25
Alter	61,9	80,8	76,5	29	18
Body-Mass-Index	81,0	60,0	31,5	27	19
RR systolisch	42,9	80,0	164,0	32	14
RR diastolisch	47,6	76,0	84,5	30	16
Herzfrequenz	57,1	56,0	70,5	23	23
Taillenumfang	52,4	54,2	102,5	22	23
Hüftumfang	66,7	62,5	114,0	23	22
NYHA-Klasse	80,0	30,8	1,5	7	22
Hinterwand	71,4	60,0	11,5	21	25
LDL-Cholesterin	47,6	68,0	113,5	18	28
HDL-Cholesterin	38,1	76,0	59,0	32	14
PQ-Zeit	50,0	56,5	169,0	20	18
QRS-Dauer	66,7	42,3	91,0	29	18
QT-Zeit	71,4	50,0	415,0	28	19
E/e'	47,6	76,9	13,1	16	31
NT-proBNP	61,9	46,2	194,6	20	27
BNP	61,9	53,9	115,2	22	25
Überleben	61,9	68,0	64,4	21	25
Krea-Clearance	71,4	76,9	- 2,1	26	21
ATP2A2	81,0	73,0	- 2,3	23	24
B9D1	76,2	69,2	- 1,6	23	24
LAP	52,4	61,5	- 2,0	25	22

Abbildung 2: Graphische Darstellung der ROC-Analysen. Mit Hilfe der ROC-Analyse wurde der Cutoff für die Überlebenszeitanalyse nach Kaplan Meier ermittelt (**A**) Alter; (**B**) BMI; (**C**) Hinterwanddicke; (**D**) Krea-Clearance.

Für die methylierten Gene wurde wie zuvor der Median herangezogen, um die Kohorte in je zwei Gruppen gleicher Größe zu unterteilen (Tabelle 12).

Tabelle 12: Mediansplit der Gene *RASAL1*, *ATP2A2*, *B9D1* und *LAP*.

	Median	n < Median	n > Median
<i>RASAL1</i>	-2,1487	23	24
<i>ATP2A2</i>	-2,3665	24	23
<i>B9D1</i>	-1,6077	23	24
<i>LAP</i>	-2,0564	24	23

Anschließend wurde untersucht, ob sich ein Unterschied im Überleben in Abhängigkeit von der Ausprägung der oben dargestellten Merkmale abzeichnete. Die Signifikanz im Unterschied wurde mit Hilfe des im Log-rank-Test ermittelten p-Werts dargestellt.

Es zeigten insgesamt sieben Parameter im Log-rank-Test signifikante Ergebnisse: Bezogen auf Alter, BMI, Kreatinin-Clearance, Hinterwanddicke, KHK und systolischen Blutdruck (RR systolisch) ließen sich statistisch signifikante Unterschiede im Überleben zwischen den Gruppen unter- und oberhalb des Grenzwertes feststellen (Abbildung 3 **A-F**). Demgegenüber zeigte NT-proBNP keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p=0,31$) im Überleben der Gruppen unter- und oberhalb des Cutoffs (Abbildung 3 **G**).

Darüber hinaus zeigte die *RASAL1*-Promotormethylierung signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen ($p=0,032$) (Abbildung 4 **A**). Auch die *ATP2A2*- und *B9D1*-Promotormethylierung wiesen eine statistisch signifikante Assoziation mit dem Überleben ($p=0,002$ bzw. $p=0,006$) auf (Abbildung 4 **B, C**). Das Kontrollgen *LAP* (Abbildung 4 **D**) sowie alle weiteren analysierten Parameter zeigten keine signifikanten Werte im Log-rank-Test (Tabelle 13).

Tabelle 13: Log-rank-Test. Der Test stellt Unterschiede im Überleben zwischen den Gruppen in Bezug auf den jeweiligen Cutoff mit Hilfe des p-Werts dar.

	Log-rank-Test
	p-Wert
<i>RASAL1</i>	0,032*
<i>ATP2A2</i>	0,002*
<i>B9D1</i>	0,006*
<i>LAP</i>	0,909
LVEF	0,115
Alter	<0,001*
Body-Mass-Index	0,004*
RR systolisch	0,0495*
RR diastolisch	0,186
Herzfrequenz	0,695
Taillenumfang	0,868
Hüftumfang	0,097
NYHA-Klasse	0,876
Hinterwand	0,028*
LDL-Cholesterin	0,250
HDL-Cholesterin	0,483
PQ-Zeit	0,980
QRS-Dauer	0,726
QT-Zeit	0,131
E/e'	0,073
NT-proBNP	0,310
BNP	0,190
Krea-Clearance	0,013*
LSB	0,236
RSB	0,105
AV-Block	0,366
RV-Dilatation	0,371
Betablocker	0,552
KHK	0,012*
Rauchen	0,208
Hypertonie	0,739
Herzinsuffizienz	0,187
Geschlecht	0,104
Z. n. Myokardinfarkt	0,110
Diabetes	0,830

Abbildung 3: Kaplan-Meier-Kurven I. Eine signifikante Assoziation mit dem Überleben zeigten die Parameter (A) Alter, (B) BMI, (C) Kreatinin-Clearance, (D) Hinterwanddicke, (E) KHK und (F) systolischer Blutdruck, während (G) NT-proBNP keine Signifikanz aufwies.

Abbildung 4: Kaplan-Meier-Kurven II. (A-C) *RASAL1*, *ATP2A2*, *B9D1* sind signifikant mit dem Überleben assoziiert (D) *LAP* ist nicht signifikant mit dem Überleben assoziiert.

3.2. Ergebnisse der multivariaten Cox-Regression

Nachdem mit Hilfe der Kaplan-Meier-Kurven und des Log-rank-Tests Unterschiede im Überleben jedes einzelnen Parameters ermittelt worden waren, sollte in einer multivariaten Cox-Regression festgestellt werden, wie groß der Einfluss von Confoundern auf die Überlebenszeitprognose der zu etablierenden Biomarker *RASAL1*, *ATP2A2* und *B9D1* war. Parameter, die univariat in der Kaplan-Meier-Analyse signifikant mit dem Überleben assoziiert waren, wurden in die Cox-Regression eingeschlossen, zusätzlich wurde das Geschlecht einbezogen. Die Güte des Gesamtmodells wurde mit Hilfe eines Omnibustests ermittelt. Der Wald-Test prüft, genau wie ein t-Test, ob die einzelnen Prädiktoren einen signifikanten Einfluss auf das Überleben haben.

Im ersten Modell wurden die Parameter Alter, Geschlecht, BMI, KHK, RR systolisch, Krea-Clearance und Hinterwanddicke betrachtet. Die Gesamtgüte des Modells wurde mit $p=0,003$ angegeben. In diesem Modell sind die Parameter BMI, KHK und Hinterwanddicke

unabhängige und statistisch signifikante Einflussgrößen auf das Überleben innerhalb von 10 Jahren (Tabelle 14).

Tabelle 14: Modell 1. Im ersten Modell wurden die Parameter ohne Einfluss der Gene untersucht.

Modell 1 Chi-Quadrat=21,90 p=0,003*	Exp(B)	Wald	95,0% Konfidenzintervall für Exp(B)	p-Wert
Alter	1,00	0,001	0,88 - 1,15	0,973
Geschlecht	2,04	1,21	0,57 - 7,23	0,272
BMI	0,81	7,08	0,70 - 0,95	0,008*
KHK	2,91	4,41	1,07 - 7,87	0,036*
RR systolisch	1,01	0,29	0,99 - 1,02	0,590
Krea-Clearance	1,00	0,02	0,96 - 1,04	0,883
Hinterwand	1,68	4,33	1,03 - 2,75	0,037*

Bei der Betrachtung der Parameter Alter, Geschlecht, BMI, KHK, RR systolisch, Kreatinin-Clearance, Hinterwanddicke und *RASAL1*-Methylierung im Modell 2 zeigten die Parameter BMI, KHK, Hinterwanddicke und *RASAL1*-Methylierung einen signifikanten Einfluss auf die Überlebenszeit. Anhand der Hazard-Ratio (Exp(B)) ließ sich das Ausmaß des Einflusses darstellen. Während mit Zunahme des BMI das Risiko zu sterben um $100\% - (100\% \times 0,80) = 20\%$ abnahm, stieg das Risiko mit Zunahme der Hinterwanddicke um den Faktor 1,63; bei Vorhandensein einer KHK um den Faktor 3,65. Ein Anstieg in der *RASAL1*-Methylierung erhöhte das Risiko zu sterben um den Faktor 4,8. Die Güte des Gesamtmodells verbesserte sich durch Hinzunahme von *RASAL1* im Vergleich zum Modell 1 auf p=0,002 (Tabelle 15).

Tabelle 15: Modell 2. Im zweiten Modell wurden die Parameter unter Einbezug von *RASAL1* untersucht.

Modell 2 Chi-Quadrat=25,03 p=0,002*	Exp(B)	Wald	95,0% Konfidenzintervall für Exp(B)	p-Wert
Alter	0,95	0,41	0,83 - 1,10	0,521
Geschlecht	2,37	1,54	0,61 - 9,27	0,214
BMI	0,80	6,84	0,68 - 0,95	0,009*
KHK	3,65	5,24	1,21 - 11,07	0,022*
RR systolisch	1,00	0,06	0,97 - 1,02	0,802
Krea-Clearance	0,99	0,20	0,95 - 1,03	0,658
Hinterwand	1,63	3,96	1,01 - 2,64	0,047*
<i>RASAL1</i> (log)	4,80	4,31	1,09 - 21,07	0,038*

Die Güte des Gesamtmodells verbesserte sich im Gegensatz zu Modell 1 und 2 weiter, wenn *ATP2A2* statt *RASAL1* einbezogen wurde. Sie wurde im dritten Modell mit p<0,001

angegeben. Ebenfalls stellten BMI, KHK, Hinterwanddicke und das methylierte Gen unabhängige und signifikante Prognosefaktoren für das Überleben dar (Tabelle 16).

Tabelle 16: Modell 3. Im dritten Modell wurden die Parameter unter Einbezug von *ATP2A2* untersucht.

Modell 3 Chi-Quadrat=26,96 p=<0,001*	Exp(B)	Wald	95,0% Konfidenzintervall für Exp(B)	p-Wert
Alter	0,91	1,52	0,78 - 1,06	0,217
Geschlecht	1,97	1,01	0,53 - 7,43	0,314
BMI	0,81	6,82	0,69 - 0,95	0,009*
KHK	3,66	5,64	1,25 - 10,70	0,018*
RR systolisch	1,00	0,11	0,98 - 1,03	0,745
Krea-Clearance	0,98	0,71	0,94 - 1,03	0,401
Hinterwand	2,05	6,38	1,18 - 3,59	0,012*
<i>ATP2A2</i> (log)	9,73	9,63	2,31 - 40,92	0,002*

Im vierten Modell wurde geprüft, wie sich die Bedeutung von *B9D1* in der multivariaten Analyse verhält. Die Gesamtgüte dieses Modells wurde mit p=0,004 angegeben. Der BMI ist hier der einzige unabhängige und statistisch signifikante Prognosemarker für das Überleben. *B9D1* konnte im multivariaten Modell mit p=0,11 keine Unabhängigkeit und statistische Signifikanz erreichen (Tabelle 17).

Tabelle 17: Modell 4. Im vierten Modell wurden die Parameter unter Einbezug von *B9D1* untersucht.

Modell 4 Chi-Quadrat=22,78 p=0,004*	Exp(B)	Wald	95,0% Konfidenzintervall für Exp(B)	p-Wert
Alter	0,97	0,16	0,84 - 1,12	0,688
Geschlecht	3,45	2,65	0,78 - 15,36	0,104
BMI	0,79	7,60	0,67 - 0,94	0,006*
KHK	2,55	3,35	0,94 - 6,94	0,067
RR systolisch	1,01	0,29	0,99 - 1,03	0,589
Krea-Clearance	0,99	0,09	0,95 - 1,04	0,759
Hinterwand	1,52	2,91	0,94 - 2,47	0,088
<i>B9D1</i> (log)	2,91	2,51	0,78 - 10,93	0,113

Werden die drei Gene in einem multivariaten Modell kombiniert, erlangt neben den Parametern BMI, KHK und Hinterwanddicke lediglich *ATP2A2* mit p=0,025 Unabhängigkeit und statistische Signifikanz als Prognosemarker für das Überleben. Mit einer Hazard-Ratio von Exp(B)=14,48 stellt die *ATP2A2*-Methylierung gegenüber dem Methylierungsgrad der anderen Gene in diesem Modell den größten Einflussfaktor auf das Überleben dar (Tabelle 18).

Tabelle 18: Modell 5. Im fünften Modell wurden die Parameter unter Einbezug aller drei Gene untersucht.

Modell 5 Chi-Quadrat=28,67 p=0,001*	Exp(B)	Wald	95,0% Konfidenzintervall für Exp(B)	p-Wert
Alter	0,91	1,29	0,78 - 1,07	0,256
Geschlecht	1,80	0,47	0,34 - 9,56	0,493
BMI	0,82	5,67	0,70 - 0,97	0,017*
KHK	3,63	4,41	1,09 - 12,08	0,036*
RR systolisch	1,01	0,16	0,98 - 1,03	0,689
Krea-Clearance	0,98	0,64	0,94 - 1,03	0,423
Hinterwand	2,12	6,24	1,18 - 3,83	0,013*
<i>ATP2A2</i> (log)	14,48	5,05	1,41 - 148,81	0,025*
<i>B9DI</i> (log)	0,94	0,004	0,11 - 7,76	0,950
<i>RASALI</i> (log)	0,63	0,10	0,04 - 10,60	0,748

Insgesamt fällt auf, dass die Parameter Alter, RR systolisch und Krea-Clearance, welche univariat signifikant mit dem Überleben assoziiert sind, in der multivariaten Analyse ihre Signifikanz verlieren. Die Parameter BMI, KHK und Hinterwanddicke stellen sich hingegen neben den Genen *RASALI* und *ATP2A2* nicht nur univariat in der Kaplan-Meier-Analyse, sondern auch multivariat in den ersten drei Modellen als unabhängige und signifikante Prognosemarker für das Überleben innerhalb von 10 Jahren dar.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden die Methylierungsgrade der drei betrachteten Gene *RASALI*, *ATP2A2* und *B9DI* von 47 Patienten ermittelt. Diese wurden als potenzielle Biomarker jeweils mit weiteren Patientenparametern korreliert, um Aussagen über die vom Biomarker gemessenen Prozesse treffen zu können. Anschließend wurden Einflussfaktoren auf das Überleben der Patienten bestimmt und in einem multivariaten Modell überprüft, ob intervariante Abhängigkeiten bestanden. Ziel war die Identifizierung von Biomarker im Blut, welche die klinische Progression von HFpEF vorhersagen.

4.1. Zirkulation von DNA-Fragmenten im Blut

In der Krebsforschung konnte gezeigt werden, dass im Blut zirkulierende DNA-Fragmente des Tumors in allen Mutationen mit dem Primärtumor übereinstimmen (Schwarzenbach et al. 2011). Ebenso konnte für die Nierenfibrose gezeigt werden, dass der Methylierungsgrad von zirkulierenden DNA-Fragmenten mit dem Befund aus intrarenalen Biopsien korreliert (Tampe et al. 2015). Die Gewinnung von DNA aus Vollblut durch Blutabnahme (liquid biopsy) ist gegenüber der herkömmlichen, invasiven Gewinnung von Organgewebe kostengünstiger und mit weniger Risiken für den Patienten verbunden (Schwarzenbach et al. 2011).

4.2. Assoziation der untersuchten Gene mit verschiedenen Patientenparametern

Bereits aus der klinisch-epidemiologischen Charakterisierung der Studienpatienten konnten interessante Erkenntnisse zu den methylierten Genen gewonnen werden. Erste Hinweise für eine Bedeutung als Progressionsmarker lieferten die signifikanten Werte ober- und unterhalb des Mediansplits der Gene in Bezug auf den Tod. Es fiel auf, dass von den Patienten oberhalb des Mediansplits ein größerer Teil verstarb und diese Patienten im Durchschnitt statistisch signifikant kürzer lebten, als jene mit einer niedrigeren Promotormethylierung.

Zudem fiel auf, dass signifikante Unterschiede oberhalb und unterhalb des Mediansplits der *RASALI*-Methylierung bezüglich der Diagnosehäufigkeit bei Herzinsuffizienz vorlagen. Insgesamt wurde bei Patienten ohne klinische Symptome einer Herzinsuffizienz eine signifikant höhere *RASALI*-Promotormethylierung im Blut nachgewiesen als bei Patienten, die bereits die Diagnose erhalten haben bzw. klinische Symptome vorweisen konnten. Verbunden mit der Tatsache, dass eine Methylierung oberhalb des Mediansplits mit einem kürzeren Überleben einhergeht, könnte dies bedeuten, dass die Messung der *RASALI*-Promotormethylierung in dieser Kohorte ein genauerer Parameter für die Prognose ist, als

eine klinisch gestellte Diagnose. Es könnte anhand der Daten dieser Kohorte die Vermutung abgeleitet werden, dass die Patienten mit einer erhöhten *RASAL1*-Methylierung nicht nur eine ungünstigere Prognose haben, sondern auch durch die bisherigen etablierten Diagnosekriterien nicht ausreichend detektiert werden.

Abgesehen von einer signifikanten Assoziation mit dem Überleben waren bezüglich *RASAL1* in der Korrelationsanalyse keine weiteren Werte signifikant. Kein statistischer Zusammenhang konnte für die bereits etablierten Biomarker der Herzinsuffizienz, NT-proBNP und BNP ermittelt werden. Ebenso wenig korrelierte *RASAL1* mit der LVEF, E/e' oder der Hinterwanddicke. Bezogen auf die Prognosekraft der klinisch gestellten Diagnose der Herzinsuffizienz stützt dieses Ergebnis die zuvor erläuterte Theorie, dass Risikopatienten mit bisher etablierten Verfahren nicht suffizient detektiert werden können. Im Falle von *ATP2A2* konnte neben dem signifikanten Zusammenhang mit dem Überleben eine positive statistisch signifikante Korrelation mit BNP ermittelt werden. Darüber hinaus besteht hier kein Zusammenhang zwischen *ATP2A2* und weiteren Parametern, die die Herzleistung charakterisieren. Bei der Analyse von *B9D1* wurde neben einer signifikanten Verbindung mit dem Überleben ein statistischer Zusammenhang mit dem Taillenumfang und E/e' gefunden. Als einziges der analysierten Gene korreliert das immer methylierte Kontrollgen *LAP* nicht mit dem Überleben. Dies unterstreicht die Bedeutung der anderen drei untersuchten Gene hinsichtlich prognostischer Angaben. Da jedoch eine Korrelation von *LAP* mit der NYHA-Klassifikation und mit der BNP-Konzentration vorlag, deren Bedeutung unklar ist, sollte für zukünftige Studien evtl. ein gänzlich unabhängiges Kontrollgen verwendet werden.

4.2.1. Repräsentation unterschiedlicher Aspekte der Krankheit durch *RASAL1*, *ATP2A2* und *B9D1*

Aufgrund der in der Korrelationsanalyse unterschiedlichen Ergebnisse kann überlegt werden, ob *RASAL1*, *ATP2A2* und *B9D1* Marker für unterschiedliche Pathomechanismen sind. Wie bereits dargestellt, ist eine aberrante Methylierung von *RASAL1* eng mit der Entstehung von Fibrose verknüpft. Die Tatsache, dass *RASAL1* lediglich mit dem Überleben und keinem weiteren der hier untersuchten Parameter korreliert, deutet darauf hin, dass mit Hilfe von *RASAL1* der Grad der Fibrose bzw. die Progression der Fibrose bestimmt werden kann, welcher in dieser Arbeit durch das Überleben repräsentiert wird. Für *ATP2A2* ist nicht eindeutig geklärt, wie es zur Entstehung von Herzinsuffizienz, die auf Fibrose basiert, beiträgt. Dennoch besteht eine signifikante Korrelation mit dem Überleben in der Kohorte, welche einen Zusammenhang mit Fibrose bzw. der Progression der Erkrankung vermuten

lässt. Die Korrelation mit BNP deutet darauf hin, dass zusätzlich andere Mechanismen, die zur Entstehung von Herzinsuffizienz beitragen mit Hilfe von *ATP2A2* gemessen werden können. Während für *RASAL1* in Vorarbeiten gezeigt werden konnte, dass wenigstens theoretisch eine starke Assoziation mit HFpEF besteht, muss für *ATP2A2* noch untersucht werden, ob in HFpEF- oder HFrEF-Patienten eine stärkere Prognosekraft besteht.

Analog hierzu sind die Ergebnisse der Korrelationsanalyse von *B9D1* zu interpretieren. Die Korrelation mit dem Überleben sowie zusätzlich mit E/e' und Taillenumfang kann darauf hinweisen, dass *B9D1* über Fibrose hinaus weitere Pathomechanismen misst. Der Mangel an Informationen zu *B9D1* erschwert die Interpretation.

Bei der Interpretation der Ergebnisse sollte zudem berücksichtigt werden, dass bei 20 untersuchten Parametern eine statistisch zufällig signifikante Korrelation einer Variablen mit dem Überleben möglich ist. Durch den Mangel an Informationen über *ATP2A2* und BNP sowie *B9D1* lassen die Ergebnisse Raum für Interpretationen.

4.3. Identifikation von Risikopatienten mit Hilfe methylierter DNA-Fragmente im Blut

4.3.1. Der Parameter Überleben als stellvertretender Marker für Fibrose

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines Biomarkers, der die Progression von HFpEF beschreibt. Schelbert et al. (2014) betonen die Bedeutung von vermehrter EZM und Fibrose für die Progression von chronischer Herzinsuffizienz. Die Literatur besagt, dass der Fibrosegrad im Herzen mit dem Auftreten letaler Ereignisse assoziiert ist: In der Arbeit von Mascherbauer et al. (2013) konnte gezeigt werden, dass der Tod signifikant mit dem Level an Fibrose korreliert. Ähnliche Ergebnisse lieferte die Arbeit von Krum et al. (2011). In dieser Studie wurde der Grad an Herzfibrose von HFpEF-Patienten, gemessen an der Konzentration peripherer Kollagenmarker, im univariaten Modell als ein wichtiger Einflussfaktor auf das Überleben identifiziert. Aufbauend auf einer vorausgegangenen Studie von López et al. (2013), in der der Einfluss von Osteopontin auf Fibrose und konsekutive Herzinsuffizienz exploriert wurde, analysierten Tromp et al. (2017) den Einfluss von Osteopontin auf die Progression von HFpEF. Ihnen gelang es, die Assoziation von Osteopontin – und damit Fibrose – mit dem Überleben darzustellen und damit diesen Marker für myokardiales Remodeling als Progressionsmarker für HFpEF zu etablieren. Schelbert et al. (2017) stellen ebenfalls fest, dass Fibrose mit der Progression von HFpEF assoziiert ist. Somit konnte gezeigt werden, dass Fibrose mit der Progression der Erkrankung und dem Tod bei herzinsuffizienten Patienten assoziiert ist. Da von den 47 Patienten in der vorliegenden Arbeit keine Gewebeproben zur Verfügung standen, konnten die methylierten

Gene nicht mit der mikroskopisch ermittelten Menge an Fibrose korreliert werden. Unter Einbezug der beschriebenen Studien, wurde das Überleben stellvertretend für Fibrose als Maßstab für die Progression der Krankheit herangezogen.

4.3.2. Univariat signifikante Assoziation von drei Genen mit dem Tod

Vor diesem Hintergrund wurde zunächst in Kaplan-Meier-Analysen ermittelt, welche Werte univariat signifikant mit dem Überleben der Kohorte assoziiert sind. Neben den Parametern Alter, BMI, RR systolisch, Hinterwanddicke, KHK und Kreatinin-Clearance zeigten die betrachteten Gene *RASAL1*, *ATP2A2* und *B9D1* im univariaten Modell eine signifikante Assoziation zum Überleben. Als einziges der untersuchten Gene zeigte *LAP* keine Assoziation mit dem Tod. Dies deutet darauf hin, dass eine erhöhte Methylierung nur bei spezifischen Genen vorhanden ist. Die Tatsache, dass hier keine Korrelation gefunden wurde, unterstützt die Spezifität von *RASAL1*, *ATP2A2* und *B9D1*.

In der Gesamtpopulation gilt ein hoher BMI als ein Risikofaktor für multiple Erkrankungen und konsekutiv ein erhöhtes Sterberisiko (Pischon et al. 2008). In dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass Patienten mit einem erhöhten BMI länger lebten als solche mit einem niedrigeren BMI. Diese kontraintuitive Erkenntnis ist kontrovers zu den beschriebenen Ergebnissen in der Gesamtpopulation. Bezüglich chronischer Herzinsuffizienz wurde dieses Adipositas-Paradoxon bereits von anderen Autoren untersucht. Häufig beschrieben ist ein U-förmiger Zusammenhang zwischen BMI und Überleben (Sharma et al. 2015; Qin et al. 2017). Speziell für Patienten mit HFpEF haben Haass et al. (2011) ebenfalls eine U-Kurve gefunden, die den Zusammenhang darstellt. Dieses Ergebnis deutet an, dass der BMI bezüglich des Überlebens von HFpEF-Patienten anderen Regeln folgt als in der Gesamtpopulation. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit widersprechen diesen Erkenntnissen nicht. Eine differenziertere Betrachtung, um den Verlauf der den Zusammenhang beschreibenden Kurve zu ermitteln, war jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit.

Die enge Beziehung zwischen eingeschränkter Nierenfunktion und Herzinsuffizienz spielt eine wichtige Rolle bei Betrachtung der Überlebenszeit. Ohne zwischen HFrEF und HFpEF zu differenzieren, stellten McAlister et al. (2004) die Bedeutung von Niereninsuffizienz für die Progression von Herzinsuffizienz heraus und schlugen vor, dass Patienten mit Herzinsuffizienz und eingeschränkter Nierenfunktion als Hochrisikopatienten eingestuft werden sollten. Die Nierenfunktion – in dieser Arbeit durch die Kreatinin-Clearance repräsentiert – zeigte in der Kaplan-Meier-Analyse eine starke Assoziation mit dem Überleben. Dieses Ergebnis ist in der Literatur wiederzufinden. Casado et al. (2013) zeigten,

dass eine reduzierte Nierenfunktion, in ihrer Arbeit repräsentiert durch die eGFR, bei Patienten mit HFpEF stark mit dem Tod assoziiert ist. Tampe et al. (2015) konnten im Mausmodell zeigen, dass die im Blut gemessene *RASAL1*-Promotormethylierung mit dem Fibrosegrad in der Niere korreliert. Eine Assoziation der *RASAL1*-Promotormethylierung mit Herzfibrose wurde ebenfalls beschrieben (Xu et al. 2015).

In der vorliegenden Kohorte primär herzkranker Patienten ließ sich keine signifikante Korrelation von methylierten Genen und der Nierenfunktion feststellen. Auffällig ist, dass Patienten mit hoher NT-proBNP- oder BNP-Konzentration sich nicht signifikant von jenen mit niedriger Konzentration bezüglich des Überlebens unterscheiden. In früheren Arbeiten wurden NT-proBNP und BNP als maßgebende Progressionsmarker aufgeführt (Daniels und Maisel 2007; Sanders-van Wijk et al. 2015). Anand et al. (2003) betonen die Bedeutung von BNP als Marker für die Progression von chronischer Herzinsuffizienz. Van Veldhuisen et al. (2013) unterstützen in ihrer Arbeit die These, dass BNP unabhängig von der LVEF prognostische Aussagekraft für das Überleben von Patienten mit HFpEF hat. In der untersuchten Kohorte waren NT-proBNP und BNP nicht mit dem Überleben assoziiert, die Erkenntnisse der Literatur ließen sich anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht nachvollziehen. Dies kann mit dem durchschnittlichen Alter der Patienten zusammenhängen. Sayama et al. (1999) stellen in ihrer Arbeit heraus, dass der prognostische Wert von BNP mit dem Alter nachlässt. Die von ihnen untersuchte Kohorte ist jedoch im Durchschnitt mit $83,4 \pm 0,8$ Jahren fast 10 Jahre älter als die Kohorte dieser Arbeit.

In aktuellen Arbeiten wird der Unterschied in der Aussage von BNP bezüglich HFpEF und HFrEF diskutiert. Bei der Untersuchung von drei Gruppen mit verschiedenen EF (HFrEF: n=860; HFmrEF: n=318; HFpEF: n=614) konnte eine unterschiedliche Relevanz in der Aussagekraft des Progressionsmarkers BNP gezeigt werden. So verlor BNP an prognostischer Relevanz bei HFpEF gegenüber HFrEF (Hamatani et al. 2017). Dass die Relevanz von BNP und NT-proBNP nicht in dieser Arbeit reflektiert wird, kann darüber hinaus auch an der relativ kleinen Kohorte liegen. Insgesamt wird jedoch deutlich, dass die untersuchten Gene in ihrer Aussage zur Progression spezifischer als die beiden etablierten Marker sind, da sie bei kleinem n bereits eine signifikante Assoziation zeigen.

Auffallend ist ebenfalls, dass weder *RASAL1* noch *ATP2A2* mit E/e' korrelieren. Der Quotient aus Mitralfüllungs- und Mitralanulusgeschwindigkeit E/e' wird von der ESC empfohlen, um Patienten mit diastolischer Dysfunktion zu identifizieren (Ponikowski et al. 2016). Sharifov et al. (2016) untersuchen die Empfehlung der ESC anhand einer Metaanalyse und kommen zu dem Ergebnis, dass E/e' nicht mit der myokardialen Steifheit

des Ventrikels in Verbindung steht. Dies deutet darauf hin, dass E/e' nicht mit Fibrose und demnach nicht mit der Progression von HFpEF assoziiert ist, sondern lediglich ein Marker für die Erfassung des Status quo der diastolischen Funktion ist. Die Tatsache, dass E/e' in der Kaplan-Meier-Analyse dieser Arbeit nicht mit dem Überleben assoziiert ist, stützt diese Annahme. Zhou et al. (2018) erwähnen E/e' als einen Marker, der prognostisch relevant für das Auftreten von Ereignissen bei Patienten mit arterieller Hypertonie und erhaltener LVEF ist. Sie definieren kardiales Ereignis als Herzinfarkt, neu aufgetretene Angina pectoris und Herzinsuffizienz, was die unterschiedlichen Resultate begründen könnte, da in der vorliegenden Arbeit das Überleben betrachtet wird. Wang et al. (2003) hingegen definierten den Tod als Ereignis, untersuchten jedoch 353 Patienten mit Herzerkrankungen, welche in ihrer Genese nicht genauer spezifiziert werden. Ihnen gelang es, die prognostische Bedeutung von E/e' für das Überleben der Patienten darzustellen. Die nicht genauere Spezifizierung von Herzerkrankungen macht es dennoch schwer, ihre Ergebnisse mit den Vorliegenden zu vergleichen.

4.3.3. *RASAL1* und *ATP2A2* als Progressionsmarker im multivariaten Modell

Um Abhängigkeiten zwischen den Parametern herauszufinden, wurden in Cox-Regressionen verschiedene Modelle betrachtet. Im ersten Modell wurden die univariat signifikanten Parameter ohne den Einfluss der drei untersuchten Gene *RASAL1*, *ATP2A2* und *B9DI* betrachtet. Lediglich KHK, Hinterwanddicke und BMI zeigten sich unabhängig von anderen Einflussgrößen. In diesem Modell war der Einfluss der KHK auf das Überleben am größten. Zusätzlich verlor das Alter an Signifikanz unter Hinzunahme der genannten Parameter in das Modell. Der bereits diskutierte negative Zusammenhang zwischen BMI und Überleben ist in diesem wie in den folgenden Modellen, zu finden. Rusinaru et al. (2014) haben den prognostischen Wert von KHK bei herzinsuffizienten Patienten untersucht. Genau wie in dieser Arbeit, ist KHK in ihrer Kohorte univariat mit letalem Ausgang assoziiert. Im multivariaten Modell zeigte KHK jedoch nur noch bei HFrEF, nicht jedoch bei HFpEF prognostisch signifikante Werte. Die unterschiedlichen Ergebnisse können mit der Auswahl an konfundierenden Variablen im multivariaten Modell zusammenhängen, da sich der p-Wert im Cox-Modell aus der intervariablen Abhängigkeit der betrachteten Variablen ergibt.

Unter Hinzunahme von *RASAL1*-Methylierung in das Modell verbesserte sich die Gesamtgüte des Modells maßgeblich. Die zuvor signifikanten Parameter KHK, BMI und Hinterwanddicke blieben signifikant. Die Hazard-Ratio für *RASAL1* überstieg jedoch diejenige von KHK. Der Methylierungsgrad von *RASAL1*-Promotoren stellt somit einen

stärkeren Prädiktor für das Überleben und die Progression der Krankheit dar. Die Bedeutung von *RASAL1* als Progressionsmarker konnte bereits für die Niere etabliert werden (Tampe und Zeisberg 2014; Bechtel et al. 2010). Bezogen auf das Herz beschrieben Xu et al. (2015) einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Hypermethylierung von *RASAL1*-Promotoren und einem erhöhten Level an Fibrose. In ihrer Arbeit konzentrierten sich die Autoren jedoch nicht auf Patienten mit HFpEF, sondern betrachteten acht Patienten mit NYHA-Klasse IV und einer EF von $22,1 \pm 6,8\%$. Kausal hängt die *RASAL1* Hypermethylierung eng mit der Entstehung von Fibrose zusammen, wie in der Einleitung beschrieben. Darüber hinaus konnte im Tierversuch gezeigt werden, dass Herzfibrose durch eine Inhibition des Wachstumsfaktors TGF- β unterdrückt werden kann (Kuwahara et al. 2002). TGF- β ist eng mit dem *RASAL1*-Signalweg verknüpft (Xu et al. 2016), weshalb hierdurch erneut der Zusammenhang zwischen Fibrose, *RASAL1*-Methylierung und konsekutiv Mortalität deutlich wird. Die bisher unveröffentlichten Ergebnisse aus früheren Arbeiten der Gruppe unterstützen die Bedeutung der Promotormethylierung von *RASAL1* als Biomarker für die Progression von HFpEF. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass die im Blut gemessene Promotormethylierung von *RASAL1* Aussagekraft für die Sterblichkeit der Patienten mit HFpEF besitzt.

Ein statistisch noch signifikanteres Modell wurde durch Austausch von *RASAL1* durch *ATP2A2* erreicht. Dieselben Parameter wie zuvor diskutiert zeigten in diesem Modell Unabhängigkeit und Relevanz als Prognoseparameter. Jedoch überstieg die Hazard-Ratio von *ATP2A2* deutlich die der anderen Parameter. Auf Grundlage dieses Modells stellt *ATP2A2* einen Marker für die Progression von HFpEF dar. Obwohl über die Bedeutung von *ATP2A2* als Progressionsmarker für HFpEF in der Literatur insgesamt wenig zu finden ist, weisen Teile der Ergebnisse dieser Arbeit Parallelen zu Arbeiten anderer Autoren auf. Wie erwähnt, konnte im murinen Modell gezeigt werden, dass *Atp2a2*-Promotormethylierung zu einer geringeren Serca2a-Expression führen kann (Kao et al. 2010).

In weiteren Mausstudien konnten Hinweise darauf geliefert werden, dass epigenetische Veränderungen von *Atp2a2*-Promotoren zur Progression von Herzinsuffizienz beitragen (Angrisano et al. 2014). In humanen Kardiomyozyten ist zu diesem Sachverhalt bisher wenig bekannt, jedoch weisen Ergebnisse unveröffentlichter Vorarbeiten auf einen Zusammenhang zwischen der Progression von HFpEF und aberranter *ATP2A2*-Methylierung hin. In anderen Studien wird die Bedeutung der Isoformen von SERCA diskutiert. In der Literatur gibt es Hinweise für eine verminderte Expression von SERCA2a bei Herzinsuffizienz (Hasenfuß et al. 1994), während in einer unveröffentlichten Arbeit der Arbeitsgruppe SERCA2b reduziert

gefunden wurden. In dieser Arbeit wird nicht zwischen den Isoformen unterschieden, da lediglich das Gen betrachtet wird.

Im Gegensatz dazu konnte die in der univariaten Betrachtung beobachtete Assoziation von *B9DI* und dem Überleben im multivariaten Modell nicht verifiziert werden. Nicht nur *B9DI*, sondern alle weiteren Parameter bis auf BMI verloren in dieser Konstellation von Confoundern ihren Einfluss auf die Überlebenszeit. Wie bereits in Abschnitt 1.5 erwähnt, ist über die Bedeutung von *B9DI* im Herzen wenig bekannt. In der Arbeit von Meder et al. (2017) wurde *B9DI* als das Gen identifiziert, das von 59 Untersuchten das am stärksten aberrant methylierte ist. Hierbei wurden Proben von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM), einer mit Fibrose assoziierten Erkrankung, untersucht. Aus diesem Grund wurde *B9DI* in diese Arbeit einbezogen, um den Einfluss dieses Gens auf die Progression der Krankheit zu untersuchen. Es ist zu erwähnen, dass die Methylierung von *B9DI* bei DCM-Patienten in der Arbeit von Meder mit einer gesunden Kohorte verglichen wurde. Insgesamt fand man bei DCM-Patienten eine geringere Methylierung (Hypomethylierung) als bei der gesunden Kohorte. Bei Betrachtung der Streuung fällt jedoch auf, dass in der DCM-Kohorte einige Patienten hypermethyliertes *B9DI* aufweisen.

Wird in unserer Kohorte die Verteilung der Methylierung betrachtet, findet sich ebenfalls eine Normalverteilung mit hypermethylierten Genen. Im Gegensatz zu Meder wurde in der vorliegenden Arbeit der Zusammenhang der Methylierung mit dem Überleben untersucht und nicht mit einer gesunden Kohorte verglichen. Darüber hinaus wird in der Literatur beschrieben, dass ein Defekt oder Mangel von *B9DI* mit kongenitalen Herzfehlern assoziiert ist (Dowdle et al. 2011). Dies impliziert, dass die Expression von *B9DI*, die bei Hypomethylierung gewährleistet ist, protektiven Charakter haben könnte. Dieser Zusammenhang unterstützt die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse der univariaten Analyse, dass eine hohe *B9DI*-Methylierung mit konsekutiver niedriger *B9DI*-Expression mit ungünstigem Verlauf assoziiert ist. Der Verlust der Aussagekraft auf die Progression im multivariaten Modell ist mit dem heutigen Kenntnisstand über *B9DI* schwer zu interpretieren. Es ist zu wenig über das Gen bekannt, als dass über die Abhängigkeiten von anderen Confoundern sinnvoll diskutiert werden könnte.

Konkurrieren alle drei Gene um den Einfluss auf das Überleben, verlieren *B9DI* und *RASAL1* gegenüber *ATP2A2* deutlich an Bedeutung. Die zuvor diskutierten Parameter KHK, Hinterwanddicke und BMI behalten ihr Gewicht. An dieser Stelle muss auf die Limitationen im statistischen Cox-Modell eingegangen werden. Es sollte beachtet werden, dass die

Ergebnisse nur im jeweiligen Modell interpretiert werden dürfen. Wenn die Confounder geändert werden, ändert sich der Einfluss der hier betrachteten Gene. Zusätzlich wird die Anzahl der zulässigen Confounder diskutiert, die abhängig von der Anzahl der Events in der Kohorte sind. Bei Erhöhung der Anzahl der Confounder, erhöht sich auch der Fehler des Modells, wodurch die Aussagen vorsichtiger abgeleitet werden müssen.

Von den untersuchten Genen zeigten drei in der univariaten Betrachtung eine signifikante Korrelation mit dem Überleben in der vorliegenden Kohorte. In der multivariaten Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die Methylierung von *B9D1* abhängig von anderen Parametern ist und die Vorhersagekraft dieses Markers im multivariaten Modell keinen Bestand hat. Im Gegensatz dazu verloren *RASAL1* und *ATP2A2* in der multivariaten Analyse nicht an Aussagekraft. Als unabhängige Parameter mit statistisch signifikantem Einfluss auf das Überleben eignen sie sich für die betrachtete Kohorte als Biomarker für die Progression von HFpEF. Bei Betrachtung aller drei Gene im Modell zeigte sich *ATP2A2* als einziger unabhängig von anderen Größen. Die Überlegenheit von *ATP2A2* gegenüber *RASAL1* sollte vor dem Hintergrund des statistischen Fehlers in diesem Modell in weiteren Studien untersucht werden. Insgesamt weisen die Gene *RASAL1* und *ATP2A2* eine deutliche Überlegenheit als Marker für die Progression von HFpEF gegenüber etablierten Markern und anderen Patientencharakteristika auf.

4.4. Klinische Implikationen

4.4.1. Therapie der Herzinsuffizienz

Nach aktuellen Leitlinien liegt das Therapieziel bei Patienten mit HFrEF darin, Hospitalisierung zu reduzieren, die Sterblichkeit zu senken und die Lebensqualität zu verbessern. Hierfür gibt es eine Vielzahl von etablierten Therapiemöglichkeiten (Nanayakkara et al. 2018). Die Behandlung erfolgt gemäß der Einteilung der New York Heart Association. Lebensverlängernde Medikamente sind Angiotensin-converting-enzyme-Hemmer (ACE-Inhibitor), Mineralkortikoid-Rezeptorantagonisten (MRA), Angiotensin-Rezeptor/Nepilysin-Hemmer (ARNI) und Beta-Blocker. Die kardiale Resynchronisationstherapie (CRT) kann die Mortalität reduzieren, wohingegen implantierte Kardioverter/Defibrillatoren (ICD) die Gesamtmortalität nicht senken (European Society of Cardiology 2016). Dem gegenüber zu stellen ist die bisher wenig aussichtsreiche Therapie der HFpEF. Es ist keine Behandlung bekannt, die die Morbidität und Mortalität senkt. In der I-PRESERVE-Studie konnte nachgewiesen werden, dass Irbesartan keine lebensverlängernde Wirkung hat (Massie et al. 2008). Analog wurde in der CHARM-Studie

gezeigt, dass Candesartan die Mortalität nicht senken kann (Yusuf et al. 2003) und in der TOPCAT-Studie, dass Spironolacton keinen Einfluss auf die Mortalität von HFpEF-Patienten hat (Pitt et al. 2014). Der aktuelle Stand der Therapie sieht daher lediglich eine Symptomkontrolle als Therapieziel vor. Es gibt Hinweise darauf, dass Diuretika die Stauungszeichen verbessern und die systolische Hypertonie therapiert werden sollte (European Society of Cardiology 2016). In der Patientengruppe der HFpEF gibt es Patienten, die häufiger als ihre Vergleichsgruppe stationär aufgenommen werden und eine höhere Mortalität verzeichnen. Diese Risikopatienten können ein Ziel für neue Therapien darstellen (Carson et al. 2015).

4.4.2. Neue Therapiemöglichkeiten durch Verständnis der Epigenetik

Das Verständnis epigenetischer Zusammenhänge bei der Entstehung von HFpEF ermöglicht die Etablierung neuer Therapieansätze. Hydralazin wurde 1952 als blutdrucksenkendes Medikament vorgestellt (Wilkinson et al. 1952). Heute wird es nicht als Mittel der Wahl bei Bluthochdruck eingesetzt, findet aber aufgrund geringer Nebenwirkungen als vasodilatierendes Mittel gegen Bluthochdruck weiterhin in der Schwangerschaft Anwendung (James et al. 2014; Amaral et al. 2017). Einer der Mechanismen von Hydralazin beruht auf der demethylierenden Eigenschaft (Tampe et al. 2015). Hydralazin modifiziert die methylierten Cytosin-Reste durch Induktion der *Ten-eleven translocation* (TET)-Enzyme. TET3 oxidiert 5-Methylcytosin (5mC) zu 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC) und 5-Carboxylcytosin (5caC), was dazu führt, dass die aberrant methylierten Cytosin-Reste durch unmethyliertes Cytosin ersetzt werden können (Tampe und Zeisberg 2018). Diese Form von aktiver DNA-Demethylierung ist für die Niere beschrieben worden und es konnte bereits gezeigt werden, dass Hydralazin in geringer Dosierung zu einer Demethylierung von *RASAL1* mit konsekutiver erhöhter *RASAL1*-Expression führen kann (Tampe et al. 2017). Daher wird Hydralazin in der Forschung für die Therapie der chronischen Herzinsuffizienz vorgeschlagen (Zeisberg und Zeisberg 2016).

4.4.3. Volkswirtschaftliche Relevanz

Eine frühzeitige Identifizierung von Risikopatienten bietet die Chance rechtzeitig eine suffiziente Therapie zu beginnen. Hospitalisierung und vorzeitiger Tod könnten hinausgezögert werden, wovon nicht nur der Patient, sondern auch die Volkswirtschaft profitiert. Cook et al. (2014) haben in ihrer Arbeit 197 Länder einbezogen, um herauszufinden, wie hoch die jährlich durch dieses Krankheitsbild verursachten Kosten für die Gesellschaft sind. Für das Jahr 2012 haben sie Kosten in Höhe von 108 Milliarden Euro

berechnet. Darin enthalten sind die direkten Kosten für das Gesundheitssystem, wie Krankenhauskosten und Medikamente, sowie indirekte Kosten durch nicht bezahlte Behandlungskosten oder frühe Sterblichkeit und dadurch verlorengegangene Arbeitskraft. Durch die demographische Entwicklung der Gesellschaft erwarten die Autoren eine Zunahme dieser Kosten. Hollingworth et al. (2016) haben die Kosten in den letzten fünf Lebensjahren von herzinsuffizienten Patienten untersucht. Sie haben herausgefunden, dass die Kosten zum Ende des Lebens dieser Patienten steigen und 90% der Kosten durch stationäre Krankenhausaufenthalte entstehen. Hierdurch wird die volkswirtschaftliche Belastung deutlich und verstärkt die Notwendigkeit von frühzeitiger Diagnostik und neuen Therapieansätzen bei Patienten mit HFpEF.

Zusammengefasst verdeutlichen die vorliegenden Ergebnisse die Bedeutung weiterer Forschung auf diesem Gebiet und bieten Grundlage für aufbauende Studien und Diskussionen.

5. Zusammenfassung

Im Gegensatz zum in der Regel stabilen Krankheitsverlauf von Patienten mit HFpEF zeigen vereinzelte Patienten eine rasche Progression der Erkrankung und damit assoziiert eine erhöhte kardiovaskuläre Mortalität. Um diese Risikopatienten identifizieren zu können, war die Etablierung von Biomarkern für die klinische Progression von HFpEF Gegenstand dieser Arbeit. Zirkulierende DNA-Fragmente der Gene *RASAL1*, *ATP2A2* und *B9D1* wurden auf ihre Aussagekraft bezüglich des Überlebens von Patienten analysiert. Hierbei wurden aberrant methylierte Promotorabschnitte quantifiziert. Der Vergleich mit 20 weiteren Patientenparametern diente zur Überprüfung der Überlegenheit der untersuchten Gene als Biomarker.

Aus der Pathophysiologie des Krankheitsbildes konnte abgeleitet werden, dass der Fibrosegrad im Herzen zur Progression der Krankheit beiträgt. Durch einen Mangel an Herzgewebebiopsien wurde in der vorliegenden Arbeit die Zeit bis zum Todeseintritt als stellvertretender Marker für die Progression der Krankheit bzw. Fibrose herangezogen.

Zur Bestimmung des Methylierungsgrads der Promotoren wurden die epigenetisch veränderten Abschnitte der aus Vollblut isolierten DNA im Rahmen einer MeDIP mit Hilfe von Antikörpern fixiert und in einer rtPCR der Anteil methylierter Promotoren ermittelt. Die 47 Proben wurden umfassend statistisch analysiert. Für alle drei Gene *RASAL1*, *ATP2A2* und *B9D1* konnte ein signifikanter Unterschied im Überleben ober- und unterhalb des Mediansplits festgestellt werden. Der Zusammenhang der aberranten Methylierung mit dem Überleben zeigte sich erneut in der Korrelationsanalyse, da dort für alle Gene eine signifikante Korrelation mit dem Überleben zu beobachten war. Darüber hinaus ließ sich aus den Ergebnissen der Korrelationsanalyse ableiten, dass die Gene unterschiedliche Aspekte der Krankheit messen. Während *RASAL1* nur mit dem Todeseintritt korreliert und damit für einen Fibrosemarker stehen könnte, korrelieren *ATP2A2* und *B9D1* mit weiteren der 20 Patientenparameter. Um die von den Genen gemessenen Aspekte eindeutig identifizieren zu können, muss der Beitrag der beiden Gene zur Fibrogenese des Herzens zukünftig genauer verstanden werden.

In der Kaplan-Meier-Analyse wurden die Patientenvariablen ermittelt, die sich ober- und unterhalb eines in der ROC-Analyse gefundenen Schwellenwertes bezüglich des Patientenüberlebens signifikant unterschieden. An dieser Stelle zeigten die drei Gene *RASAL1*, *ATP2A2* und *B9D1* eine bessere Assoziation mit dem Überleben als bereits etablierte Marker wie BNP und NT-proBNP. Das Kontrollgen *LAP* zeigte keine Signifikanz. Unter Hinzunahme des Parameters Geschlecht, wurden die im univariaten Modell

signifikanten Variablen im multivariaten Modell auf Abhängigkeiten getestet, sodass die Parameter Alter, BMI, Krea-Clearance, Hinterwanddicke, KHK und systolischer Blutdruck in verschiedenen Modellen mit den drei signifikanten Genen analysiert wurden. Lediglich *B9D1* verlor hier an Einfluss, die anderen beiden Gene zeigten sich in verschiedenen Modellen als unabhängige Prognosemarker für das Überleben. Im letzten Modell wurden alle drei Gene *RASAL1*, *ATP2A2* und *B9D1* analysiert, es erwies sich nur *ATP2A2* als unabhängig und statistisch signifikant. Dieser Einfluss sollte jedoch durch den statistischen Fehler des Modells, der mit der Anzahl der analysierten Parameter ansteigt, vorsichtig interpretiert werden.

Insgesamt werden in dieser Arbeit drei mit dem Überleben von HFpEF-Patienten assoziierte Gene analysiert und deren Qualifikation als Biomarker für die klinische Progression von HFpEF herausgestellt. Zusätzlich konnte in dieser Kohorte deren Überlegenheit als Progressionsmarker über bisher etablierte Marker gezeigt werden.

6. Literaturverzeichnis

- Abouzied MM, Eltahir HM, Fawzy MA, Abdel-Hamid NM, Gerges AS, El-Ibiari HM, Nazmy MH (2015): Estimation of leucine aminopeptidase and 5-nucleotidase increases alpha-fetoprotein Sensitivity in Human Hepatocellular Carcinoma Cases. *Asian Pac J Cancer Prev* 16, 959–963
- Allen M, Chu S, Brill S, Stotler C, Buckler A (1998): Restricted tissue expression pattern of a novel human rasGAP-related gene and its murine ortholog. *Gene* 218, 17–25
- Amaral LM, Wallace K, Owens M, LaMarca B (2017): Pathophysiology and current clinical management of preeclampsia. *Curr Hypertens Rep* 19, 61
- Anand IS, Fischer L, Chiang Y-T, Latini R, Masson S, Maggioni A, Glazer R, Tognoni G, Cohn J (2003): Changes in brain natriuretic peptide and norepinephrine over time and mortality and morbidity in the valsartan heart failure trial (Val-HeFT). *Circulation* 107, 1278–1283
- Angrisano T, Schiattarella GG, Keller S, Pironti G, Florio E, Magliulo F, Bottino R, Pero R, Lembo F, Avvedimento EV et al. (2014): Epigenetic switch at *atp2a2* and *myh7* gene promoters in pressure overload-induced heart failure. *PLoS ONE* 9, e106024
- Annes JP, Munger JS, Rifkin DB (2003): Making sense of latent TGF-beta activation. *J Cell Sci* 116, 217–224
- Bechtel W, McGoohan S, Zeisberg EM, Müller GA, Kalbacher H, Salant DJ, Müller CA, Kalluri R, Zeisberg M (2010): Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney. *Nat Med* 16, 544–550
- Bers DM, Bassani JWM, Bassani RA (1996): Na-Ca Exchange and Ca fluxes during contraction and relaxation in mammalian ventricular muscle. *Ann NY Acad Sci* 779, 430–442
- Bird A (2002): DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 16, 6–21
- Bird AP, Wolffe AP (1999): Methylation-induced repression—belts, braces, and chromatin. *Cell* 99, 451–454
- Braunwald E (2015): The war against heart failure: the Lancet lecture. *Lancet* 385, 812–824

- Carlson KJ, Lee DC-S, Goroll AH, Leahy M, Johnson RA (1985): An analysis of physicians' reasons for prescribing long-term digitalis therapy in outpatients. *J Chron Dis* 38, 733–739
- Carson PE, Anad IS, Win S, Rector T, Haass M, Lopez-Sendon J, Miller A, Teerlink JR, White M, McKelvie RS et al. (2015): The hospitalization burden and post-hospitalization mortality risk in heart failure with preserved ejection fraction: results from the I-PRESERVE trial (Irbesartan in heart failure and preserved ejection fraction). *J Am Coll Cardiol* 3, 429–441
- Casado J, Montero M, Formiga F, Carrera M, Urrutia A, Arevalo JC, Perez-Calvo JI (2013): Clinical characteristics and prognostic influence of renal dysfunction in heart failure patients with preserved ejection fraction. *Eur J Intern Med* 24, 677–683
- Chapman D, Weber KT, Eghbali M (1990): Regulation of fibrillar collagen types I III and basement membrane type IV and collagen gene expression in pressure overloaded rat myocardium. *Circ Res* 67, 787–794
- Cheng W, Li B, Kajstura J, Li P, Wolin MS, Sonnenblick EH, Hintze TH, Olivetti G, Anversa P (1995): Stretch-induced programmed myocyte cell death. *J Clin Invest* 96, 2247–2259
- Cleutjens J, Kandala J, Guarda E, Guntaka R, Weber KT (1995): Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction. *J Mol Cell Cardiol* 27, 1281–1292
- Cook C, Cole G, Asaria P, Jabbour R, Francis DP (2014): The annual global economic burden of heart failure. *Int J Cardiol* 171, 368–376
- Daniels LB, Maisel AS (2007): Natriuretic peptides. *J Am Coll Cardiol* 50, 2357–2368
- Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G (1993): Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 122, 103–111
- Dobaczewski M, Chen W, Frangogiannis NG (2011): Transforming growth factor (TGF)- β signaling in cardiac remodeling. *J Mol Cell Cardiol* 51, 600–606
- Dowdle WE, Robinson JF, Kneist A, Sirerol-Piquer MS, Frints SGM, Corbit KC, Zaghloul NA, Zaghloul NA, van Lijnschoten G, Mulders L et al. (2011): Disruption of a ciliary B9 protein complex causes Meckel syndrome. *Am J Hum Genet* 89, 94–110

- Dunlay SM, Roger VL, Redfield MM (2017): Epidemiology of heart failure with preserved ejection fraction. *Nature Reviews Cardiology*
- Eriksson H, Caidahl K, Larsson B, Ohlson L-O, Welin L, Wilhelmsen L, Svärdsudd K (1987): Cardiac and pulmonary causes of dyspnoea - validation of a scoring test for clinical-epidemiological use: The study of men born in 1913. *Eur Heart J* 8, 1007–1014
- European Society of Cardiology (2016): Pocket-Leitlinie: Herzinsuffizienz. Version 2016, 2. Auflage; ESC 2016
- Feng XH, Derynck R (2005): Specificity and versatility in TGF-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 659–693
- Frangogiannis NG (2012): Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ Res* 110, 159–173
- Frank KF, Bölc B, Brixius K, Kranias E, Schwinger RHG (2002): Modulation of SERCA: implications for the failing human heart. *Basic Res Cardiol* 97, 72–78
- Garcia-Gonzalo FR, Corbit KC, Sirerol-Piquer MS, Ramaswami G, Otto EA, Noriega TR, Seol AD, Robinson JF, Bennett CL, Josifova DJ et al. (2011): A transition zone complex regulates mammalian ciliogenesis and ciliary membrane composition. *Nat Genet* 43, 776–784
- Goumans M-J, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, Dijke P ten (2002): Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J* 21, 1743–1753
- Grimaldi V, Pascale MR de, Zullo A, Soricelli A, Infante T, Mancini FP, Napoli C (2017): Evidence of epigenetic tags in cardiac fibrosis. *J Cardiol* 69, 401–408
- Grossman W, Jones D, McLaurin LP (1975): Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest* 56, 56–64
- Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT (2008): Wound repair and regeneration. *Nature* 453, 314–321
- Haass M, Kitzman DW, Anand IS, Miller A, Zile MR, Massie BM, Carson PE (2011): Body mass index and adverse cardiovascular outcomes in heart failure patients with preserved ejection fraction: Results from the Irbesartan in heart failure with preserved ejection fraction (I-PRESERVE) trial. *Circ Heart Fail* 4, 324–331

- Hamatani Y, Nagai T, Shiraishi Y, Kohsaka S, Nakai M, Nishimura K, Kohno T, Nagatomo Y, Asaumi Y, Goda A et al. (2017): Long-term prognostic significance of plasma B-type natriuretic peptide level in patients with acute heart failure with reduced, mid-range, and preserved ejection fractions. *Am J Cardiol* 121, 731–738
- Hasenfuß G, Reinecke H, Studer R, Meyer M, Peske B, Holtz J, Holubarsch C, Posival H, Hanjörn J, Drexler H (1994): Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res* 75, 434–442
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R (1992): Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* 10, 413–417
- Ho JE, Gona P, Pencina MJ, Tu JV, Austin PC, Vasan RS, Kannel WB, D'Agostino RB, Lee DS, Levy D (2012): Discriminating clinical features of heart failure with preserved vs. reduced ejection fraction in the community. *Eur Heart J* 33, 1734–1741
- Ho KKL, Pinsky JL, Kannel WB, Levy D (1993): The epidemiology of heart failure: The Framingham Study. *J Am Coll Cardiol* 22, A6–A13
- Hollingworth W, Biswas M, Maishman RL, Dayer MJ, McDonagh T, Purdy S, Reeves BC, Rogers CA, Williams R, Pufulete M (2016): The healthcare costs of heart failure during the last five years of life: A retrospective cohort study. *Int J Cardiol* 224, 132–138
- Jalil JE, Doering CW, Janicki JS, Pick R, Shroff SG, Weber KT (1989): Fibrillar collagen and myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat left ventricle. *Circ Res* 64, 1041–1050
- James PA, Oparil S, Carter BL, Cushman WC, Dennison-Himmelfarb C, Handler J, Lackland DT, LeFevre ML, MacKenzie TD, Ogedegbe O et al. (2014): 2014 Evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: Report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *JAMA* 311, 507–520
- Janicki JS, Brower GL (2002): The role of myocardial fibrillar collagen in ventricular remodeling and function. *J Card Fail* 8, S319–25
- Jones PA, Laird PW (1999): Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 21, 163–167

- Kao YH, Chen YC, Cheng CC, Lee TI, Chen YJ, Chen SA (2010): Tumor necrosis factor- α decreases sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase expressions via the promoter methylation in cardiomyocytes. *Crit Care Med* 38, 217–222
- Kimura T, Nakamori M, Lueck JD, Pouliquin P, Aoike F, Fujimura H, Dirksen RT, Takahashi MP, Dulhunty AF, Sakoda S (2005): Altered mRNA splicing of the skeletal muscle ryanodine receptor and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* 14, 2189–2200
- Krum H, Elsik M, Schneider HG, Ptaszynska A, Black M, Carson PE, Komajda M, Massie BM, McKelvie RS, McMurray JJ et al. (2011): Relation of peripheral collagen markers to death and hospitalization in patients with heart failure and preserved ejection fraction: Results of the I-PRESERVE collagen substudy. *Circ Heart Fail* 4, 561–568
- Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, Kai M, Takeshita A, Egashira K, Imaizumi T (2002): Transforming growth factor- β function blocking prevents myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in pressure-overloaded rats. *Circulation* 106, 130–135
- Lam CSP, Donal E, Kraigher-Krainer E, Vasan RS (2011a): Epidemiology and clinical course of heart failure with preserved ejection fraction. *Eur J Heart Fail* 13, 18–28
- Lam CSP, Lyass A, Kraigher-Krainer E, Massaro JM, Lee DS, Ho JE, Levy D, Redfield MM, Pieske BM, Benjamin EJ et al. (2011b): Cardiac dysfunction and noncardiac dysfunction as precursors of heart failure with reduced and preserved ejection fraction in the community. *Circulation* 124, 24–30
- Linzbach AJ (1960): Heart failure from the point of view of quantitative anatomy. *Am J Cardiol* 5, 370–382
- Lipskaia L, Chemaly ER, Hadri L, Lompre A-M, Hajjar RJ (2010): Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase as a therapeutic target for heart failure. *Expert Opin Biol Ther* 10, 29–41
- Lompré A-M, Hajjar RJ, Harding SE, Kranias EG, Lohse MJ, Marks AR (2010): Ca^{2+} cycling and new therapeutic approaches for heart failure. *Circulation* 121, 822–830
- López B, González A, Lindner D, Westermann D, Ravassa S, Beaumont J, Gallego I, Zudaire A, Brugnolaro C, Querejeta R et al. (2013): Osteopontin-mediated myocardial fibrosis in heart failure: A role for lysyl oxidase? *Cardiovasc Res* 99, 111–120
- Mascherbauer J, Marzluf BA, Tufaro C, Pfaffenberger S, Graf A, Wexberg P, Panzenböck A, Jakowitsch J, Bangert C, Laimer D et al. (2013): Cardiac magnetic resonance

- postcontrast T1 time is associated with outcome in patients with heart failure and preserved ejection fraction. *Circ Cardiovasc Imaging* 6, 1056–1065
- Massagué J (2000): How Cells Read TGF-beta Signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 169–178
- Massie BM, Carson PE, McMurray JJ, Komajda M, McKelvie R, Zile MR, Anderson S, Donovan M, Iverson E, Staiger C et al. (2008): Irbesartan in patients with heart failure and preserved ejection fraction. *N Engl J Med* 359, 2456–2467
- Mauviel A (2005): Transforming growth factor-beta: a key mediator of fibrosis. *Methods Mol Med* 117, 69–80
- McAlister FA, Ezekowitz J, Tonelli M, Armstrong PW (2004): Renal insufficiency and heart failure: Prognostic and therapeutic implications from a prospective cohort study. *Circulation* 109, 1004–1009
- Meder B, Haas J, Sedaghat-Hamedani F, Kayvanpour E, Frese K, Lai A, Nietsch R, Scheiner C, Mester S, Martins Bordalo D et al. (2017): Epigenome-wide association study identifies cardiac gene patterning and a novel class of biomarkers for heart failure. *Circulation* 136, 1528–1544
- Mizutani S, Shibata K, Kikkawa F, Hattori A, Tsujimoto M, Ishii M, Kobayashi H (2007): Essential role of placental leucine aminopeptidase in gynecologic malignancy. *Expert Opin Ther Targets* 11, 453–461
- Mullis KB, Faloona FA (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155, 335–350
- Nanayakkara S, Patel HC, Kaye DM (2018): Hospitalisation in patients with heart failure with preserved ejection fraction. *Clin Med Insights Cardiol* 12, 1179546817751609
- Nicoletti A, Heudes D, Hinglais N, Appay M-D, Philippe M, Sassay-Prigent C, Bariety J, Michel J-B (1995): Left ventricular fibrosis in renovascular hypertensive rats effect of Losartan and Spironolactone. *Hypertension* 26, 101–111
- Pagani ED, Alousi AA, Grant AM, Older TM, Dziuban SW, Allen PD (1988): Changes in myofibrillar content and Mg-ATPase activity in ventricular tissues from patients with heart failure caused by coronary artery disease, cardiomyopathy, or mitral valve insufficiency. *Circ Res* 63, 380–385

- Pischon T, Boeing H, Hoffmann K, Bergmann M, Schulze MB, Overvad K, van der Schouw YT, Spencer E, Moons KGM, Tjønneland A et al. (2008): General and abdominal adiposity and risk of death in europe. *N Engl J Med* 359, 2105–2120
- Pitt B, Pfeffer MA, Assmann SF, Boineau R, Anand IS, Claggett B, Clausell N, Desai AS, Diaz R, Fleg JL et al. (2014): Spironolactone for heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med* 370, 1383–1392
- Pollman MJ, Yamada T, Horiuchi M, Gibbons GH (1996): Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis: Countervailing influences of Nitric Oxide and Angiotensin II. *Circ Res* 79, 748–756
- Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, Falk V, González-Juanatey JR, Harjola VP, Jankowska EA et al. (2016): 2016 ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The task force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) developed with the special contribution of the heart failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J* 37, 2129–2200
- Qin W, Liu F, Wan C (2017): A U-shaped association of body mass index and all-cause mortality in heart failure patients: A dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *Cardiovasc Ther* 35, e12232
- Rifkin DB, Mazzei R, Munger JS, Noguera I, Sung J (1999): Proteolytic control of growth factor availability. *APMIS* 107, 80–85
- Rusinaru D, Houpe D, Szymanski C, Lévy F, Maréchaux S, Tribouilloy C (2014): Coronary artery disease and 10-year outcome after hospital admission for heart failure with preserved and with reduced ejection fraction. *Eur J Heart Fail* 16, 967–976
- Sanders-van Wijk S, van Empel V, Davarzani N, Maeder MT, Handschin R, Pfisterer ME, Brunner-La Rocca HP (2015): Circulating biomarkers of distinct pathophysiological pathways in heart failure with preserved vs. reduced left ventricular ejection fraction. *Eur J Heart Fail* 17, 1006–1014
- Sayama H, Nakamura Y, Saito N, Kinoshita M (1999): Why is the concentration of plasma brain natriuretic peptide in elderly inpatients greater than normal? *Coron Artery Dis* 10, 537–540

- Schelbert EB, Fonarow GC, Bonow RO, Butler J, Gheorghiade M (2014): Therapeutic targets in heart failure: Refocusing on the myocardial interstitium. *J Am Coll Cardiol* 63, 2188–2198
- Schelbert EB, Fridman Y, Wong TC. et al. (2017): Temporal relation between myocardial fibrosis and heart failure with preserved ejection fraction: Association with baseline disease severity and subsequent outcome. *JAMA Cardiol* 2, 995–1006
- Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K (2011): Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 11, 426–437
- Sedaj S, Schmidt A, Denegri M, Walther S, Matovina M, Arnstein G, Gutsch E-M, Windhager I, Ljubojević S, Negri S et al. (2014): Subclinical abnormalities in sarcoplasmic reticulum Ca(2+) release promote eccentric myocardial remodeling and pump failure death in response to pressure overload. *J Am Coll Cardiol* 63, 1569–1579
- Shah SJ (2010): Evolving approaches to the management of heart failure with preserved ejection fraction in patients with coronary artery disease. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 12, 58–75
- Sharifov OF, Schiros CG, Aban I, Denney TS, Gupta H (2016): Diagnostic accuracy of tissue doppler index E/e' for evaluating left ventricular filling pressure and diastolic dysfunction/heart failure with preserved ejection fraction: A systematic review and meta-analysis. *J Am Heart Assoc* 5, 1–19
- Sharma A, Lavie CJ, Borer JS, Vallakati A, Goel S, Lopez-Jimenez F, Arbab-Zadeh A, Mukherjee D, Lazar JM (2015): Meta-analysis of the relation of body mass index to all-cause and cardiovascular mortality and hospitalization in patients with chronic heart failure. *Am J Cardiol* 115, 1428–1434
- Shi Y, Massagué J (2003): Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113, 685–700
- Steinberg BA, Zhao X, Heidenreich PA, Peterson ED, Bhatt DL, Cannon CP, Hernandez AF, Fonarow GC (2012): Trends in patients hospitalized with heart failure and preserved left ventricular ejection fraction: Prevalence, therapies, and outcomes. *Circulation* 126, 65–75
- Su MYM, Lin LY, Tseng YHE, Chang CC, Wu CK, Lin JL, Tseng WYI (2014): CMR-verified diffuse myocardial fibrosis is associated with diastolic dysfunction in HFpEF. *JACC Cardiovasc Imaging* 7, 991–997

-
- Swynghedauw B (1999): Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev* 79, 215–262
- Tampe B, Zeisberg M (2014): Evidence for the involvement of epigenetics in the progression of renal fibrogenesis. *Nephrol Dial Transplant* 29 Suppl 1, i1-i8
- Tampe B, Zeisberg M (2018): Chromatin dynamics at the core of kidney fibrosis. *Matrix Biol* 68-69, 194–229
- Tampe B, Tampe D, Zeisberg EM, Müller GA, Bechtel-Walz W, Koziolk M, Kalluri R, Zeisberg M (2015): Induction of Tet3-dependent epigenetic remodeling by low-dose hydralazine attenuates progression of chronic kidney disease. *EBioMedicine* 2, 19–36
- Tampe B, Steinle U, Tampe D, Carstens JL, Korsten P, Zeisberg EM, Müller GA, Kalluri R, Zeisberg M (2017): Low-dose hydralazine prevents fibrosis in a murine model of acute kidney injury-to-chronic kidney disease progression. *Kidney Int* 91, 157–176
- Tromp J, Khan MAF, Klip IT, Meyer S, de Boer RA, Jaarsma T, Hillege H, van Veldhuisen DJ, van der Meer P, Voors AA (2017): Biomarker profiles in heart failure patients with preserved and reduced ejection fraction. *J Am Heart Assoc* 6, 1–11
- Upadhy B, Pisani B, Kitzman DW (2017): Evolution of a geriatric syndrome: Pathophysiology and treatment of heart failure with preserved ejection fraction. *J Am Geriatr Soc* 65, 2431–2440
- van Heerebeek L, Borbély A, Niessen HWM, Bronzwaer JGF, van der Velden J, Stienen GJM, Linke WA, Laarman GJ, Paulus WJ (2006): Myocardial structure and function differ in systolic and diastolic heart failure. *Circulation* 113, 1966–1973
- van Veldhuisen DJ, Linssen GCM, Jaarsma T, van Gilst WH, Hoes AW, Tijssen JGP, Paulus WJ, Voors AA, Hillege HL (2013): B-type natriuretic peptide and prognosis in heart failure patients with preserved and reduced ejection fraction. *J Am Coll Cardiol* 61, 1498–1506
- Walker SA, Kupzig S, Bouyoucef D, Davies LC, Tsuboi T, Bivona TG, Cozier GE, Lockyer PJ, Buckler A, Rutter GA et al. (2004): Identification of a Ras GTPase-activating protein regulated by receptor-mediated Ca^{2+} oscillations. *EMBO J* 23, 1749–1760
- Wang M, Yip GWK, Wang AYM, Zhang Y, Ho PY, Tse MK, Lam PKW, Sanderson JE (2003): Peak early diastolic mitral annulus velocity by tissue Doppler imaging adds independent and incremental prognostic value. *J Am Coll Cardiol* 41, 820–826

- Watson CJ, Collier P, Tea I, Neary R, Watson JA, Robinson C, Phelan D, Ledwidge MT, McDonald KM, McCann A et al. (2014): Hypoxia-induced epigenetic modifications are associated with cardiac tissue fibrosis and the development of a myofibroblast-like phenotype. *Hum Mol Genet* 23, 2176–2188
- Weber KT, Brilla CG, Janicki JS (1993): Myocardial fibrosis: functional significance and regulatory factors. *Cardiovasc Res* 27, 341–348
- Weber KT, Sun Y, Katwa LC, Cleutjens JPM (1997): Tissue repair and angiotensin II generated at sites of healing. *Basic Res Cardiol* 92, 75–78
- Weber M, Davies JJ, Wittig D, Oakeley EJ, Haase M, Lam WL, Schübeler D (2005): Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat Genet* 37, 853–862
- Westermann D, Kasner M, Steendijk P, Spillmann F, Riad A, Weitmann K, Hoffmann W, Poller W, Pauschinger M, Schultheiss HP et al. (2008): Role of left ventricular stiffness in heart failure with normal ejection fraction. *Circulation* 117, 2051–2060
- Wilkinson EL, Backman H, Hecht HH (1952): Cardiovascular and renal adjustments to a hypotensive agent. *J Clin Invest* 31, 872–879
- Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP (2013): Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques* 54, 314–320
- Wuytack F, Raeymaekers L, Missiaen L (2002): Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. *Cell Calcium* 32, 279–305
- Xu X, Tan X, Tampe B, Nyamsuren G, Liu X, Maier LS, Sossalla S, Kalluri R, Zeisberg M, Hasenfuß G et al. (2015): Epigenetic balance of aberrant *Rasall* promoter methylation and hydroxymethylation regulates cardiac fibrosis. *Cardiovasc Res* 105, 279–291
- Xu X, Tan X, Hulshoff MS, Wilhelmi T, Zeisberg M, Zeisberg EM (2016): Hypoxia-induced endothelial-mesenchymal transition is associated with RASAL1 promoter hypermethylation in human coronary endothelial cells. *FEBS Lett* 590, 1222–1233
- Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE, Drazner MH, Fonarow GC, Geraci SA, Horwich T, Januzzi JL et al. (2013): 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: A report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association task force on practice guidelines. *Circulation* 128, e240-327

- Yusuf S, Pfeffer MA, Swedberg K, Granger CB, Held P, McMurray JJV, Michelson EL, Olofsson B, Östergren J (2003): Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and preserved left-ventricular ejection fraction: The CHARM-Preserved Trial. *Lancet* 362, 777–781
- Zeisberg EM, Zeisberg M (2013): The role of promoter hypermethylation in fibroblast activation and fibrogenesis. *J Pathol* 229, 264–273
- Zeisberg EM, Zeisberg M (2016): A rationale for epigenetic repurposing of hydralazine in chronic heart and kidney failure. *J Clin Epigenet* 2, 1
- Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, Chandraker A, Yuan X, Pu WT, Roberts AB et al. (2007): Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med* 13, 952–961
- Zhou D, Huang Y, Fu M, Cai A, Tang S, Feng Y (2018): Prognostic value of tissue Doppler E/e' ratio in hypertension patients with preserved left ventricular ejection fraction. *Clin Exp Hypertens* 5, 1–6
- Zile MR, Baicu CF, Gaasch WH (2004): Diastolic heart failure-abnormalities in active relaxation and passive stiffness of the left ventricle. *N Engl J Med* 350, 1953–1959
- Statistisches Bundesamt (2017): Todesursachen in Deutschland. http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_start_neu/&p_aid=i&p_aid=56773036&nummer=516&p_sprache=D&p_indsp=4065&p_aid=57052877#SOURCES, Statistisches Bundesamt, abgerufen am: 29.1.2018